

**PERBANDINGAN DAN KORELASI EKSPRESI TENASCIN C
DENGAN JUMLAH DAN DIAMETER SEL OTOT JANTUNG
TIGA KELOMPOK USIA TIKUS**

TESIS

**dr. RADIANA DHEWAYANI ANTARIANTO
NPM : 0606000195**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER BIOMEDIK
JAKARTA
OKTOBER 2008**

**PERBANDINGAN DAN KORELASI EKSPRESI TENASCIN C
DENGAN JUMLAH DAN DIAMETER SEL OTOT JANTUNG
TIGA KELOMPOK USIA TIKUS**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik

dr. RADIANA DHEWAYANI ANTARIANTO
NPM : 0606000195



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER BIOMEDIK
JAKARTA
OKTOBER 2008**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : dr. Radiana D Antarianto

NPM : 0606000195

Tanda Tangan :



Tanggal : 4 Oktober 2008

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : dr. Radiana D Antarianto
NPM : 0606000195
Program Studi : Magister Biomedik Kekhususan Histologi
Judul Tesis : Perbandingan dan Korelasi Ekspresi Tenascin C dengan jumlah dan diameter sel otot jantung tiga kelompok usia tikus

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Magister Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. dr. Jeanne Adiwinata Pawitan, PhD

(.....)

Pembimbing II : dr. Ahmad Aulia Jusuf, PhD

(.....)

Penguji I : dr. Sugito Wonodirekso, MS

(.....)

Penguji II : Prof. Drs Purnomo Suharso, MS, PhD

(.....)

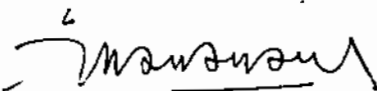
Penguji III : Dra. Rih Kodariah, MS

(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 7 November 2008

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biometrik



Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil alamin.

Syukur kepada Allah SWT karena berkat dan rahmat-Nya penelitian dan penulisan tesis ini dapat terselesaikan. Penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak selama masa perkuliahan, penelitian, sampai terselesaikannya tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. dr. Jeanne Adiwinata Pawitan, PhD selaku pembimbing akademik sekaligus pembimbing I tesis, untuk seluruh waktu, bimbingan, dedikasi pemikiran, bantuan dan dukungan dalam keseluruhan proses akademis di Magister Ilmu Biomedik FKUI.
2. dr. Ahmad Aulia Jusuf, PhD selaku pembimbing II tesis sekaligus Ketua Departemen Histologi FKUI, untuk seluruh bantuan, pemikiran, dan dukungan moral maupun material untuk penulis selama menempuh keseluruhan proses akademis di Magister Ilmu Biomedik FKUI.
3. Dekanat FKUI dan Manajer SDM dan Keuangan FKUI, yang telah memberikan kesempatan lewat beasiswa S2 FKUI untuk melanjutkan studi ke jenjang yang lebih tinggi bagi penulis.
4. Dr.rer.physiol. Septelia Inawati Wanandi, Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI untuk seluruh bantuan dan dukungan dalam keseluruhan proses pendidikan S2 ini.
5. Dewan Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia, yang telah mendanai Riset Tesis S2 ini.
6. dr.Sugito Wonodirekso, MS atas inisiasi ide penelitian dan dorongan untuk menempuh pendidikan lebih lanjut.
7. dr. Lia Damayanti, M.Biomed, Sp.PA yang dengan suka rela membuka wawasan penulis tentang proses pewarnaan imunohistokimia dan membantu penulis memulai pengerjaan imunohistokimia tenascin C.
8. Kepada dr. Isnani A Suryono, MS; dr. Atikah C Barasilla, MBIomed; dr.R Soeharto, Sp.THT; dr. Siti NS; dr.Rulliana Agustin, MMedEd; dr. Dewi Sukmawati, MKes; dr.Soenanto Roewijoko, MS, Sp.A; terima kasih atas niche yang hangat, stimulatif dan kondusif hingga seluruh proses akademik S2 mampu dilintasi. Ibu Isbandiyah, Bpk Dina S, Ibu Mini, Mas

Kanto, Mas Mugi, Mbak Ike terima kasih banyak atas bantuan dan kerja samanya.

9. Dra. Ria Kodariah, MS yang mendedikasikan waktu dan pemikirannya untuk membimbing dalam proses pengerjaan imunohistokimia di Lab Immunopatologi Patologi Anatomi FKUI.
10. Prof. dr. Samsuridjal Djauzi, Sp.PD. KAI, PhD yang mendonasi dana untuk memulai pewarnaan imunohistokimia Tenascin C.
11. Drs. Cornelius Adimunca selaku kepala Laboratorium Hewan Coba dan Toksikologi PusLitBang Biomedis dan Farmasi DepKes yang telah membantu dalam penyediaan hewan coba untuk subyek penelitian ini.
12. Ibunda tercinta, Hj. Elma Sumbogo dan adik tersayang, drg. Radiati Dhewayanti A terhatur terima kasih terdalam atas seluruh bantuan, pengawasan dan dukungan sepanjang proses akademik ini. Untuk papa tercinta Ir.H. Sumbogo Antarianto, MSc (alm), tesis ini nana persembahkan sebagai metamorfosis utuh dari modul *incinerator* yang kita kerjakan bersama (proyek ilmiah akhir di SMU 8).
13. Jaharuddin, SE , pendamping dan motivator terbaik di setiap kesempatan. Untuk dukungan moral, material dan semangatnya sehingga keseluruhan proses akademik termasuk penelitian dapat terselesaikan. Untuk buah hati dan sumber inspirasi ummi, M Dzakwan Alif dan M Zaky Taqyudin, terima kasih atas kerelaan membagi sebagian masa kebersamaan kita sehingga ummi dapat menyelesaikan studi dan tesis.
14. Keluarga dan sahabat yang telah memberikan banyak dukungan moral untuk terselesaikannya tesis ini. Terima kasih khusus kepada Ny. Hj. Eleanor Martigora Emzita yang telah mengawali pembiayaan tesis ini.
15. Kepada rekan-rekan biomedik, terutama satu kekhususan dr. Veronika MS terima kasih atas kerja sama dan bantuan selama ini sehingga penelitian tesis bisa diselesaikan.

Semoga Allah SWT meridhoi setiap langkah kita dalam mengamalkan ilmu-Nya.

Jakarta, 4 Oktober 2008

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr.Radiana D Antarianto
NPM : 0606000195
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Perbandingan dan Korelasi Ekspresi Tenascin C dengan jumlah dan diameter sel otot jantung tiga kelompok usia tikus

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 4 Oktober 2008

Yang menyatakan

(dr.Radiana D Antarianto)

ABSTRAK

Nama : Radiana D Antarianto
Perguruan Tinggi : Program Pascasarjana
Universitas Indonesia

Judul : Perbandingan dan Korelasi Ekspresi Tenascin C dengan jumlah dan diameter sel otot jantung tiga kelompok usia tikus

Kekhususan : Histologi, Program Studi Ilmu Biomedik

Latar Belakang: Penemuan sel stem jantung (CSC, *cardiac stem cells*) membuktikan jantung sebagai organ dengan pergantian sel-sel parenkim dan non-parenkim di bawah pengaturan kompartemen sel stem. Kemampuan regenerasi jantung berkurang dengan bertambahnya usia. Penyebab penuaan sel stem jantung adalah perubahan pada lingkungan mikro (*niche*) jantung yang mempengaruhi keberlangsungan hidup sel stem jantung. Tenascin C adalah molekul di *niche* jantung yang berperan dalam remodeling jaringan jantung dan angiogenesis, dua komponen penting dalam regenerasi jantung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah dan diameter sel otot jantung di jantung tikus yang berbeda usia, menilai ekspresi Tenascin C dan mengetahui hubungan antara ekspresi tenascin C dan perubahan morfometri sel otot jantung.

Metode: Desain penelitian ini adalah komparatif potong lintang dengan 6 tikus neonatus (usia 1-4 hari), 9 tikus dewasa muda (usia 3-4 bulan) dan 9 tikus dewasa (usia 12-16 bulan). Proses pembuatan sediaan mikroskopik dilanjutkan dengan pewarnaan HE dan imunohistokimia Tenascin C (*sc-9871*, *sc-2023*). Mikrofografi jantung (HE) dipilih 2 lpb atrium dan 2 lpb ventrikel. Hasil mikrofotograf dimasukkan dalam format jpeg dan dianalisis dengan Digimizer Image Analyzer. Jumlah sel otot jantung dihitung per lpb dengan *tagging system* dan diameter sel otot jantung diukur berdasar unit kalibrasi skala mikrometer. Mikrofotograf tenascin C lewat software DP2BSW dalam format tif. Dihitung 100 sel otot jantung atrium dan 100 sel ventrikel untuk masing-masing subyek. Imunoreaktivitas tenascin C di sel otot jantung dinyatakan lokasi ekspresi dan skor intensitas. Lokasi ekspresi adalah positif intra sel, ekstra sel, kombinasi keduanya dan negatif. Intensitas pewarnaan tenascin C diberi skor 1 (lemah) sampai 3 (kuat). Analisis statistik menggunakan SPSS 13.

Hasil : Jumlah sel otot jantung per lpb terbesar di kelompok neonatus (Atrium= 73.4 ± 4.87 ; Ventrikel= 152.5 ± 3.6) dan paling sedikit di kelompok dewasa (Atrium= 26 ± 1.5 ; Ventrikel= 43.7 ± 2.8). Diameter sel otot jantung terkecil di kelompok neonatus (Atrium= $6.1 \mu\text{m} \pm 0.28$; Ventrikel= $7.39 \mu\text{m} \pm 0.3$) dan paling besar di kelompok dewasa (Atrium= $17.42 \mu\text{m} \pm 0.42$; Ventrikel= $23.44 \mu\text{m} \pm 0.74$). Ekspresi tenascin C ditemukan pada jantung tikus neonatus, dewasa muda dan dewasa. Pola ekspresi tenascin C yang sering ditemukan di kelompok neonatus adalah pola kombinasi (Atrium= 43.17 ± 9.4 , Ventrikel= 56.83 ± 8.5) dan pola intra

sel (Atrium= 41.33 ± 13.4 ; Ventrikel= 33.67 ± 6.7). Pola ekspresi tenascin C ekstra sel lebih sering ditemukan di kelompok dewasa muda (Atrium= 11.56 ± 3.2 ; Ventrikel= 12.11 ± 7.4) dan dewasa (Atrium= 9.22 ± 3.5 ; Ventrikel= 11.67 ± 3.9) dibandingkan kelompok neonatus (Atrium= 3.33 ± 1.8 ; Ventrikel= 2.5 ± 1.4). Ekspresi tenascin C negatif paling sering ditemukan di ventrikel jantung dewasa muda (74.44 ± 8.2) dan dewasa (67.33 ± 7.6). Intensitas pewarnaan tenascin C kuat (skor 3) paling sering ditemukan di kelompok neonatus (Atrium= 42.83 ± 13.6 ; Ventrikel= 59.33 ± 9). Skor 1 paling sering ditemukan di ventrikel jantung kelompok dewasa (16.11 ± 5.3). Dari analisis korelasi bivariat Pearson ditemukan korelasi positif yang bermakna antara pola ekspresi tenascin C kombinasi di atrium dengan jumlah sel otot jantung atrium ($p=0.016$); pola ekspresi tenascin C intra sel di ventrikel dengan jumlah sel otot jantung ventrikel ($p=0.01$) dan pola ekspresi kombinasi di ventrikel dengan jumlah ($p=0.00$) dan diameter sel otot jantung ventrikel ($p=0.026$). Ditemukan pula korelasi positif yang bermakna antara skor 3 intensitas pewarnaan tenascin C di atrium dengan jumlah sel otot jantung atrium ($p=0.035$); skor 3 di ventrikel dengan jumlah sel otot jantung ventrikel ($p=0.00$). Korelasi negatif yang bermakna ditemukan antara skor 3 di ventrikel dengan diameter sel otot jantung ventrikel ($p=0.001$).

Kesimpulan : Semakin bertambah usia jantung, jumlah sel/lpb semakin berkurang dan diameter semakin besar. Gambaran ini menandakan terjadinya hipertrofi sel otot jantung. Ekspresi tenascin C ditemukan di jantung neonatus, dewasa muda dan dewasa. Semakin bertambah usia jantung terjadi penurunan jumlah sel otot jantung yang positif mengekspresikan tenascin C dan berkurangnya intensitas pewarnaan tenascin C. Di atrium dan ventrikel jantung, semakin banyak jumlah sel otot dengan pola ekspresi tenascin C kombinasi maka semakin banyak jumlah sel otot jantung. Di ventrikel, pola ekspresi kombinasi juga berkorelasi positif dengan diameter sel otot jantung. Semakin tinggi jumlah sel dengan skor intensitas 3 maka jumlah sel otot jantung semakin banyak dan diameter sel otot jantung yang kecil.

Kata kunci : *Tenascin C, morfometri jantung, niche jantung, penuaan*

ABSTRACT

Name : Radiana D Antarianto
University : University of Indonesia
Title : Comparison and correlation between Tenascin C expression and cardiomyocytes number and diameter in three age groups rat cardiac
Major : Histology (Biomedical Science)

Background: Discovery of Cardiac Stem Cells (CSC) showed the heart as renewable organ with parenchymal and non-parenchymal cells turnover governed by stem cells compartments. Cardiac regenerative ability decreases with advancing age. The cause of CSC's aging is the changes in cardiac microenvironment (niche) that surrounds CSC. Tenascin C is a major glycoprotein in cardiac niche that plays a vital role in cardiac remodelling and angiogenesis, two main components of cardiac regeneration. This study aims to compare immunoreactivity of tenascin C, cardiomyocytes number and diameter in three age groups rat cardiac and determine the correlation between tenascin C immunoreactivity and cardiomyocyte's morphometric changes.

Methods: Design of this study is comparative cross sectional with 6 neonate rats (age 1-4 days), 9 young adult rats (age 3-4 months), and 9 adult rats (age 12-16 months). The subjects underwent intravital fixation and cardiac organ was removed. Microscopic specimens were made and stained with hematoxylin-Eosin and tenascin C immunohistochemistry (sc-9871, sc-2023). From cardiac microphotograph (HE stained) two high power field (hpf) was selected for atrium and two hpf for ventricle. Microphotographs was transferred into digital format (jpeg) and analysed with Digimizer Image Analyzer. Cardiomyocyte number was determined using tagging system and measurement of cardiomyocyte diameter was calibrated with micrometre scale using Digimizer Image Analyzer. Immunohistochemistry results were documented with DP2BSW as microphotographs in digital format (tif). 100 cardiomyocytes in the atrium and in the ventricle from each subject was analysed. Immunoreactivity of tenascin C was classified based on expression pattern and staining intensity. The expression pattern was positive intra cellular, positive extra cellular, positive combination (both intra and extra cellular) and negative. Staining intensity was scored 1 (weak) to 3 (strong). Statistical analysis was performed with SPSS 13.

Result : The most abundant cardiomyocyte number per high power field (hpf) was found in neonate cardiac (Atrium= 73.4 ± 4.87 ; Ventrikel= 152.5 ± 3.6) and the least abundant was in adult cardiac (Atrium= 26 ± 1.5 ; Ventrikel= 43.7 ± 2.8). Cardiomyocyte diameter was smallest in neonate cardiac (Atrium= $6.1 \mu\text{m} \pm 0.28$; Ventrikel= $7.39 \mu\text{m} \pm 0.3$) and largest in adult group (Atrium= $17.42 \mu\text{m} \pm 0.42$; Ventrikel= $23.44 \mu\text{m} \pm 0.74$). Tenascin C immunoreactivity was found in neonate, adolescence and adult cardiac. Tenascin C expression pattern most frequently found in neonate cardiac was positive combination (Atrium= 43.17 ± 9.4 , Ventrikel= 56.83 ± 8.5) and positive intra cellular (Atrium= 41.33 ± 13.4 ;

Ventrikel= 33.67 ± 6.7). Tenascin C positive extra cellular was commonly found in young adult cardiac (Atrium= 11.56 ± 3.2 ; Ventrikel= 12.11 ± 7.4) and adult cardiac (Atrium= 9.22 ± 3.5 ; Ventrikel= 11.67 ± 3.9). Negative tenascin C was more frequently found in young adult ventricle (74.44 ± 8.2) and adult cardiac (67.33 ± 7.6). High score for tenascin C staining intensity (score 3) was frequently found in neonate cardiac (Atrium= 42.83 ± 13.6 ; Ventrikel= 59.33 ± 9). Score 1 was frequently found in adult ventricle (16.11 ± 5.3). Pearson bivariate correlation revealed significant correlation between positive combination tenascin C pattern in the atrium with atrial cardiomyocytes number ($p=0.016$); positive intra cellular tenascin C pattern in the ventricle with ventricular cardiomyocytes number ($p=0.01$) and positive combination in the ventricle with ventricular cardiomyocytes number ($p=0.00$) and diameter ($p=0.026$). Significant correlation was also found between score 3 in the atrium with atrial cardiomyocytes number ($p=0.035$); score 3 in the ventricle with ventricular cardiomyocytes number ($p=0.00$). Negative correlation was found significant between score 3 in the ventricle with ventricular cardiomyocytes diameter ($p=0.001$).

Conclusions : With advancing age, cardiomyocyte number per hpf decreases while the diameter increases. This resembles hypertrophy of cardiomyocyte. Tenascin C immunoreactivity was found in neonate, adolescence and adult cardiac tissue. With advancing age, we found reduced number of cardiomyocytes expressing tenascin C and decreased staining intensity. In cardiac atrium and ventricle, increased number of positive combination tenascin C expression showed increased cardiomyocytes number. In ventricle, increased number of positive combination showed increased cardiomyocytes diameter. Increased number of cardiomyocytes with score 3 tenascin C staining intensity showed higher cardiomyocytes number and smaller diameter.

Keywords : *Tenascin C, cardiomyocyte morphometry, cardiac niche, aging*

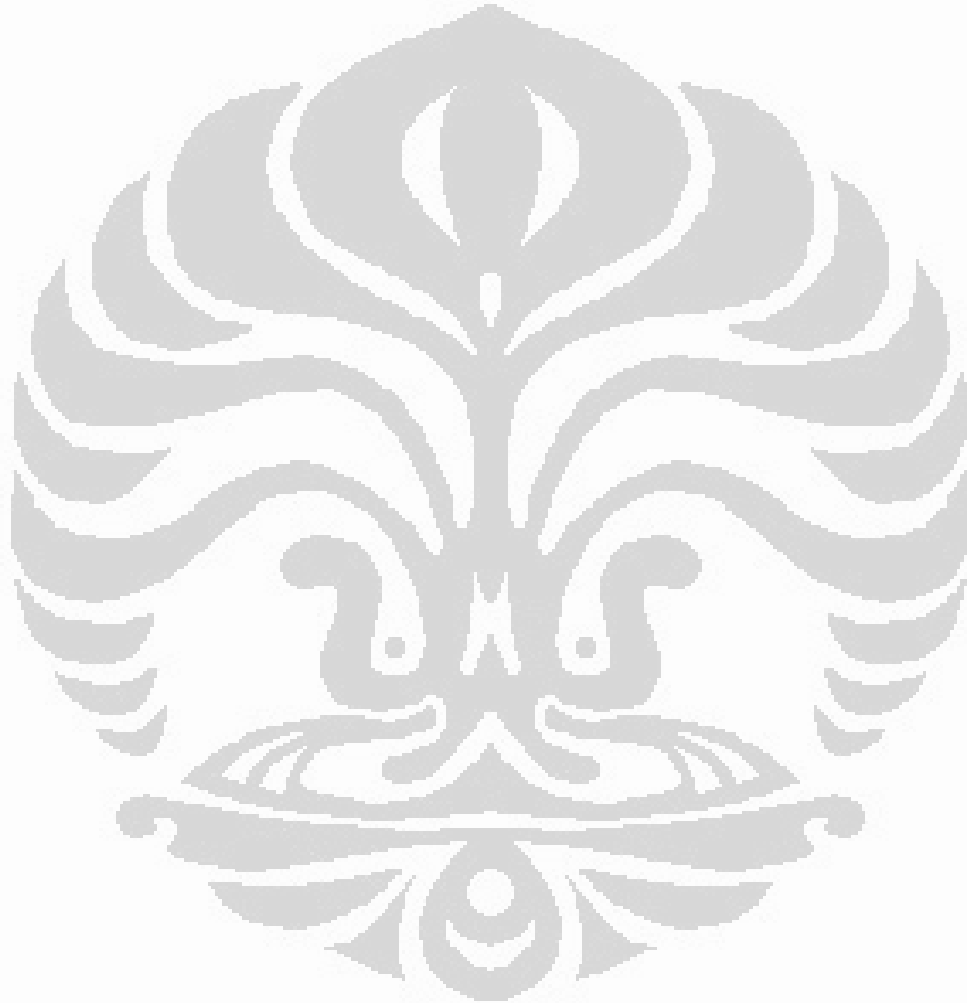
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR GRAFIK.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	4
1.3. Tujuan penelitian.....	4
1.4. Hipotesis penelitian.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Pendahuluan.....	5
2.2. Histologi Jantung.....	6
2.3. Histodinamika Jantung.....	8
2.3.1. Penanda Histodinamika Jantung.....	8
2.3.2. Keberadaan sel stem jantung sebagai penanda histodinamika jantung	10
2.3.3. Lingkungan mikro sel stem jantung (Niche Jantung)	11
2.4. Kaitan antara Tenascin C dengan Niche Jantung.....	14
2.5. Peran Tenascin C dalam Regenerasi Otot Jantung.....	16
2.5.1. Peran Tenascin C dalam Remodeling Jantung.....	16
2.5.2. Tenascin C sebagai agen neovaskularisasi jantung.....	18
2.6. Kajian Pustaka tentang Subyek Penelitian.....	19
2.7. Prinsip Dasar Pewarnaan Imunohistokimia.....	21
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....	23
3.1. Desain Penelitian.....	23
3.2. Tempat Penelitian.....	23
3.3. Hewan Percobaan.....	23
3.4. Alat dan Bahan.....	24
3.5. Protokol Penelitian.....	25
3.5.1. Protokol Penelitian Tesis.....	25
3.5.2. Pembuatan preparat Histologi.....	28
3.5.3. Pewarnaan HE.....	30
3.5.4. Pewarnaan Imunohistokimia Tenascin C.....	30
3.6. Pengumpulan Data.....	32

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1. Hasil Fiksasi Intravital.....	35
4.2. Gambaran Histologi Jantung ketiga kelompok usia.....	37
4.3. Perbedaan Jumlah Sel otot Jantung per lpb di ketiga kelompok usia.....	40
4.4. Perbedaan Diameter Sel Otot Jantung antara ketiga kelompok usia.....	43
4.5. Ekspresi Tenascin C di jantung tikus Neonatus, Remaja dan Dewasa.....	45
4.6. Hubungan antara ekspresi tenascin C dengan histomorfometri Jantung (jumlah dan diameter sel otot jantung).....	57
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
5.1. Kesimpulan.....	60
5.2. Saran.....	60
Daftar Pustaka.....	62
Daftar Riwayat Hidup.....	71
Lampiran	

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Perbandingan usia tikus dengan usia manusia.....	20
Tabel 4.1. Resume Fiksasi Intravital Subyek Penelitian.....	35
Tabel 4.2. Korelasi bivariat pola ekspresi tenascin C dengan morfometri sel otot jantung.....	57
Tabel 4.3. Korelasi bivariat intensitas pewarnaan tenascin C dengan morfometri sel otot jantung.....	58

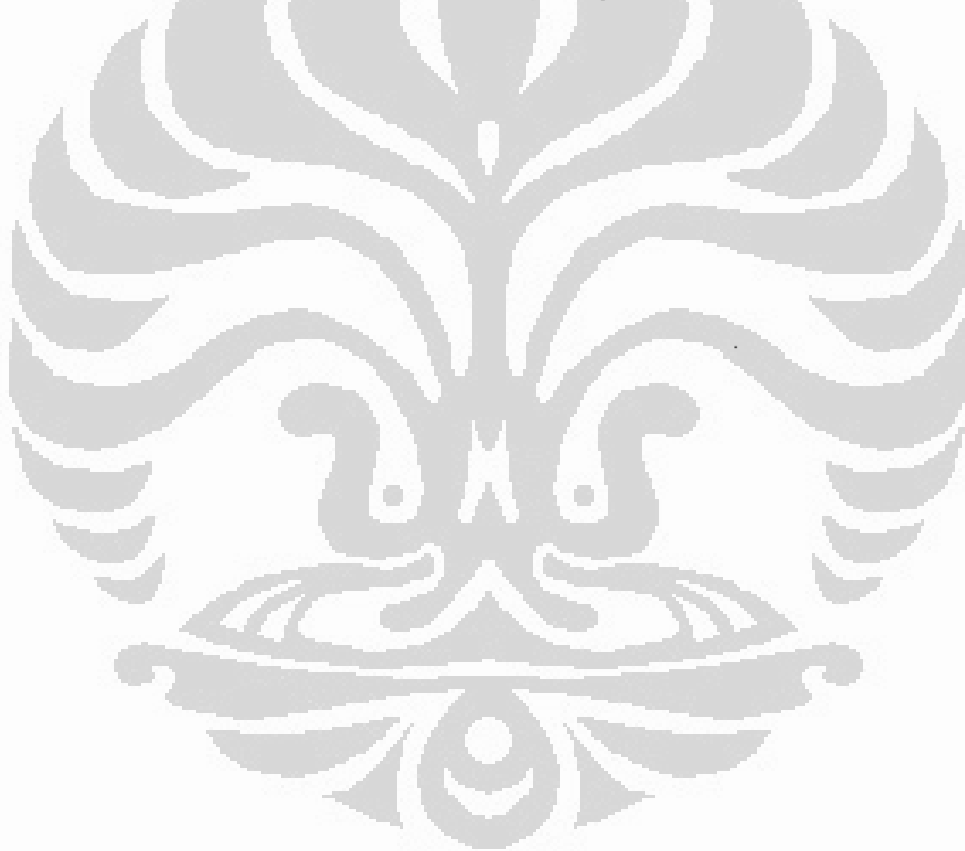


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Niche Jantung.....	12
Gambar 2.2. Skema dari Niche jantung.....	13
Gambar 2.3. Struktur biokimia Tenascin C.....	14
Gambar 2.4. Transduksi Sinyal diinisiasi Tenascin C.....	17
Gambar 2.5. Skema Organ Visera Tikus.....	19
Gambar 2.6. Proses Imunohistokimia.....	22
Gambar 3.1. Foto Subyek Penelitian	24
Gambar 3.2. Torakotomi Subyek 16.....	26
Gambar 3.3. Inseri wing needle Subyek 22.....	27
Gambar 3.4. Kekakuan otot subyek 4.....	27
Gambar 3.5. Wadah larutan fiksatif.....	27
Gambar 3.6. Proses pembuatan sediaan histologi.....	28
Gambar 3.7. Oven untuk lilin parafin.....	28
Gambar 3.8. Pengecoran blok parafin.....	29
Gambar 3.9. Peletakan organ ke dalam cetakan.....	29
Gambar 3.10. Blok histoplast.....	29
Gambar 3.11. Rangkaian larutan Xylool dan alkohol.....	30
Gambar 3.12. Persiapan pemanasan dengan mikrowave.....	31
Gambar 3.13. Penetesan Antibodi Sekunder dengan mikropipet.....	32
Gambar 3.14. Piranti Mikrofotografi di Lab Imunopatologi.....	33
Gambar 4.1 Potongan memanjang otot jantung tikus	38
Gambar 4.2 Jantung Neonatus: HE, kontrol negatif, IHK TN-C.....	45
Gambar 4.3 Jantung Remaja : HE, kontrol negatif, IHK TN-C.....	45
Gambar 4.4 Jantung Dewasa: HE, kontrol negatif, IHK TN-C.....	45
Gambar 4.5 Pola ekspresi Tenascin C.....	47
Gambar 4.6. Skoring intensitas pewarnaan IHK TN-C.....	51
Gambar 4.7. Skema hipotesis peran tenascin C dalam remodeling jantung	55
Gambar 4.8. Skema aktivasi gen tenascin C di sel otot jantung.....	56
Gambar 4.9 Sel miofibroblas yang aktif sintesis TN-C.....	57

DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1 Jumlah sel otot jantung /lpb di ketiga kelompok usia.....	41
Grafik 4.2 Diameter Sel Otot Jantung Atrium di ketiga kelompok usia.....	43
Grafik 4.3. Diameter sel otot jantung ventrikel di ketiga kelompok usia.....	44
Grafik 4.4 Kisaran Jumlah Sel Otot Jantung Atrium Positif TN-C.....	48
Grafik 4.5 Kisaran Jumlah sel otot jantung ventrikel Positif TN-C.....	48
Grafik 4.6 Kisaran Jumlah Sel otot jantung Positif Intrasel.....	49
Grafik 4.7 Kisaran Jumlah Sel otot jantung Positif Ekstra sel.....	49
Grafik 4.8 Kisaran Jumlah sel otot jantung Positif Kombinasi.....	50
Grafik 4.9 Kisaran jumlah sel otot jantung negatif TN-C.....	50
Grafik 4.10 Kisaran Jumlah sel otot jantung Skor intensitas 3.....	52
Grafik 4.11 Kisaran Jumlah sel otot jantung skor intensitas 2.....	52
Grafik 4.12 Kisaran Jumlah sel otot jantung dengan skor intensitas 1.....	53



DAFTAR SINGKATAN

CSC = Cardiac Stem Cells
VEGF= Vascular Endothelial Growth Factor
PDGF=Platelet Derived Growth Factor
SDF-1= Stromal Derived Factor-1
IGF-1= Insulin-like Growth Factor-1
EGF= Epidermal Growth Factor
MMP-1= Matrix Metallo-Protein 1
TGF= Transforming growth factor
d/eHAND= deciduum/extraembryonic, heart, autonomic nervous system, neural crest derived tissues
MEF2= Myocyte enhancing binding factor-2
FGF= Fibroblast growth factor
Sca-1=Stem cell antigen 1
EGFP= Enhanced green fluorescent protein
hgf= Hepatocyte growth factor
ATP= Adenosine Tri Phosphate
ROS= Reactive Oxygen Species
TNC= Tenascin C
TNR= Tenascin R
TNX= Tenascin X
TNY= Tenascin Y
TNW= Tenascin W
TA= Tenascin assembly domain
FNIII= Fibronectin type III
Fbg= Fibrinogen
GMEM= Glioma mesenchymal extracellular matrix
HUVEC= Human Umbilical Vein Endothelial Cells
PEO= Pro-Epicardial Organ
DCM= Dilated Cardiomyopathy
ELISA=Enzyme linked Immunosorbent Assay
NYHA=New York Heart Association
mRNA=messenger Ribo Nucleic Acid
PI3K=Phospo-Inositol 3-Kinase
FAK=Focal Adhesion Kinase
CAM=Cell Adhesion Molecules
EPC=Endothelial Progenitor Cells
WT=Wild Type
HE=Hematoxylin Eosin
PBS = Phosphate buffered saline
FKUI = Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
H₂O₂=Hidrogen Peroksida
SPSS = Statistical Package for the Social Sciences
LSAB=Linked StreptAvidin Biotin
ABC= Avidin Biotin Complex
IHK=Imunohistokimia

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Kita semua berasal dari satu sel tunggal (zigot) yang merupakan hasil fertilisasi ovum dan sperma. Zigot akan berkembang menjadi embrio, yang melalui proses diferensiasi selanjutnya menjadi berbagai macam sel, jaringan, organ, sistem organ dan keseluruhan organisme. Sel-sel embrio memiliki kemampuan diferensiasi menjadi seluruh jenis jaringan di tubuh kita, bersifat totipotensial dan dinamakan sel stem. Namun keberadaan sel stem tidak terbatas pada embrio saja. Selain jaringan ekstra-embrional seperti plasenta dan tali pusat, sel stem juga berada di hampir semua organ dewasa. Ditemukannya *adult stem cells* di beberapa organ antara lain sumsum tulang, kulit, susunan saraf pusat, hepar, traktus gastrointestinal dan otot skelet mendorong pencarian *adult stem cells* di organ-organ lain, termasuk jantung.¹

Konsep jantung sebagai organ berdiferensiasi terminal, yang tidak memiliki kemampuan regenerasi kini perlu ditinjau kembali. Jantung sebagai organ yang dapat memperbaharui dirinya sendiri dengan pergantian sel-sel parenkim dan non-parenkim jantung diatur oleh kompartemen sel stem dan kemampuan sel-sel stem tersebut untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi. Regenerasi mengikuti hierarki tipe-tipe sel yaitu: sel stem yang membelah diri dengan lambat menurunkan sel-sel progenitor *lineage restricted* yang aktif berproliferasi secara cepat, yang kemudian menurunkan prekursor-prekursor berkomitmen yang pada akhirnya berhenti berkembang (*growth arrest*) dan mengalami diferensiasi terminal.²

Usaha pertama untuk menjelaskan keberadaan sel stem jantung dilakukan oleh Rudnicki dan kawan-kawan, yang mengisolasi populasi sel *Hoechst effluxing* dari jantung mencit berusia 2 bulan. Sel-sel serupa yang mengekspresikan MDR1 atau transporter ABC sebanding telah ditemukan di organ-organ lain dan disebut populasi sel-sel cadangan. Sel-sel yang diduga sel stem jantung ini tidak mengekspresikan penanda sel-sel hematopoetik. Sel-sel tersebut ketika dikultur di medium metilselulose membentuk koloni dan setelah dikultur bersama sel otot jantung matur, berdiferensiasi menjadi sel otot jantung yang mengekspresikan connexin43.³

Proliferasi sel otot jantung berbanding lurus dengan jumlah sel otot jantung, tidak terdapat metodologi lain untuk menyatakan penambahan jumlah sel otot jantung yang menandakan regenerasi jantung selain morfologi kuantitatif (*Quantitative morphology*). Penanda biokimia, molekuler, fisiologis, autoradiografi hanya dapat memberi kesan terjadinya regenerasi.⁴

Kemampuan regenerasi jantung berkurang dengan bertambahnya usia, dan faktor risiko penyakit jantung yang signifikan adalah usia lanjut. Potensi terapi sel stem memberikan harapan baru untuk penderita penyakit jantung yang membutuhkan transplantasi jantung. Kini, terapi sel stem pada infark miokard akut telah dilakukan dengan cara isolasi sel stem dari darah perifer, purifikasi dan kultur *ex vivo* kemudian diinjeksikan intrakoroner ke pasien infark miokard (Strauer et al,⁵ TOPCARE-AMI,⁶ Boost, Fernando-Aviles⁷). Potensi regenerasi sel stem residen jantung sendiri secara endogen berperan dalam homeostasis jantung dan mekanisme reparasi jantung. Namun demikian tampaknya hal tersebut tidak cukup untuk menangani penyakit jantung pada lansia, karena diduga terjadi perubahan yang berkaitan dengan penuaan pada sel stem residen jantung dan sel progenitor jantung. Perubahan ini meliputi berkurangnya jumlah dan fungsi sel-sel progenitor endotel yang bersirkulasi. Sel-sel progenitor endotel tersebut berperan dalam neovaskularisasi.

Kematian sel terjadi akibat akumulasi kerusakan oksidatif, pemendekan telomere dan hilangnya kemampuan proliferasi sel. Anversa dan kawan-kawan⁸ memulai penelitian tentang efek penuaan dan perubahan senilis pada populasi sel stem jantung. Pemeriksaan histologi jaringan jantung pasien-pasien dengan penyakit kardiovaskuler menunjukkan sel stem jantung *c-kit*⁺ mengalami apoptosis dan mengekspresikan *cyclin dependent kinase p16^{INK4a}*. Pada mencit, apoptosis CSC (*Cardiac Stem Cells*) lebih sering ditemukan di hewan-hewan tua, dan panjang telomere CSC juga berkurang dengan pertambahan usia. Penelitian ini menyatakan bahwa sel stem jantung juga mengalami perubahan senilis dengan bertambahnya usia, mirip dengan sel-sel sel otot jantung dewasa. Hal ini kontradiktif dengan kemampuan sel stem untuk memperbaharui diri (*self-renewing*) atau mengembalikan jumlah populasinya. Penyebab perubahan senilis sel stem jantung diduga adalah berubahnya lingkungan mikro (*CSC niche*) akibat proses penuaan. Perubahan lingkungan mikro tersebut dapat menghambat kemampuan sel stem. Oleh karenanya

penelitian tentang perubahan-perubahan yang terjadi pada lingkungan mikro sel stem jantung akibat proses penuaan dapat memberikan dasar pengembangan terapeutik yakni meningkatkan kemampuan regenerasi sel stem residen jantung sendiri lewat transfer faktor pertumbuhan, sitokin atau protein tertentu.¹¹

Di antara faktor-faktor pertumbuhan, sitokin dan protein yang diduga meningkatkan fungsi regenerasi sel stem jantung dan sel progenitor jantung adalah: VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), estrogen, tenascin C, SDF-1 (*Stromal Derived Growth factor-1*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) dan obat golongan statin (*3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors*). Dari seluruh faktor yang disebutkan di atas, tenascin C adalah molekul di matriks ekstrasel jantung yang memiliki beberapa aksi terutama meningkatkan angiogenesis dan regenerasi sel otot jantung yang berasal dari sel stem jantung.^{9,10,11}

Tenascin C merupakan protein heksamer yang disatukan oleh ikatan disulfida antara subunit-subunitnya dengan berat molekul masing-masing subunitnya antara 120–300 kD, tergantung perbedaan ekspresi isoform antar spesies. Salah satu subunitnya mempunyai aktivitas mirip *epidermal growth factor (EGF-like)* dengan sifat yang merangsang pertumbuhan. Ekspresi Tenascin-C di jaringan normal, awalnya diisolasi dari jaringan embrional. Di antara molekul matriks ekstrasel, tenascin-C (TNC) dikenal sebagai regulator berbagai fungsi sel selama embriogenesis, penyembuhan luka atau perkembangan ke arah kanker.¹² Tenascin C telah digunakan sebagai penanda lingkungan mikro sel stem neuron atau sel progenitor saraf di ventrikel otak/zona hipokampus.¹³

Pada jantung, TNC muncul di beberapa tahap perkembangan embrionik penting seperti dimulainya diferensiasi sel otot jantung atau angiogenesis/vaskulogenesis koroner. TNC ekspresinya kembali muncul setelah cedera miokardium dan mengatur respon sel selama remodeling jaringan dengan cara mengubah perlekatan sel otot jantung ke jaringan ikat, meningkatkan migrasi dan diferensiasi miofibroblas dan menginduksi enzim matrix metallo-proteinase 1 (MMP-1). Beberapa penelitian menggunakan TNC sebagai penanda remodeling jantung pada infark miokard (Imanaka-Yoshida et al, 2001).¹⁴ Percobaan Ballard dan kawan-kawan tahun 2006 menunjukkan tenascin-C berperan penting dalam

angiogenesis jantung post natal, yakni sebagai regulator di lingkungan mikro terhadap aktivitas endotel jantung atau aktivitas sel progenitor endotel jantung.¹⁵

Ekspresi tenascin C menurun di sumsum tulang yang mengalami penuaan, tapi bagaimana ekspresinya di jaringan jantung dalam proses perkembangan pasca lahir belum pernah diteliti sebelumnya.

1. 2. Rumusan Permasalahan

1. Bagaimana ekspresi tenascin C di jaringan jantung tikus tiga kelompok usia?
2. Bagaimana jumlah dan diameter sel otot jantung di jaringan jantung tikus tiga kelompok usia?
3. Bagaimana hubungan antara ekspresi tenascin C dengan jumlah dan diameter sel otot jantung di jaringan jantung tikus tiga kelompok usia?

1.3. Tujuan

1. Mengetahui distribusi ekspresi tenascin C di jaringan jantung tikus tiga kelompok usia
2. Mengetahui perubahan akibat penuaan terhadap jumlah dan diameter sel otot jantung
3. Mengetahui hubungan antara ekspresi tenascin C terhadap perubahan jumlah dan diameter sel otot jantung akibat penuaan.

1.4. Hipotesis

1. Terdapat perbedaan ekspresi tenascin C di jaringan jantung tikus tiga kelompok usia.
2. Terdapat perbedaan jumlah dan diameter sel otot jantung tikus tiga kelompok usia.
3. Penurunan ekspresi tenascin C dengan bertambahnya usia jantung diikuti oleh penurunan jumlah sel otot jantung dan penambahan diameter sel otot jantung.

1. 5. Makna Riset

Dengan memberikan gambaran histologis dalam proses penuaan terhadap ekspresi tenascin C di jaringan jantung dapat menjadi dasar untuk pengembangan terapi untuk mencegah CSC *senescence* dan optimalkan kemampuan regenerasi jantung yang dihasilkan oleh CSC dengan penambahan tenascin C secara eksogen.

Dengan membuktikan keberadaan tenascin C di lingkungan mikro jaringan jantung diharapkan dapat memberikan penanda baru untuk identifikasi sel stem jantung (marker imunohistokimia untuk CSC *niche*), ini perlu dibuktikan lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pendahuluan

Jika selama ini tata laksana kedokteran menangani gejala penyakit dan menghilangkan penyebab penyakit, para ilmuwan dan sebagian klinisi menargetkan terapi yang lebih revolusioner. Kedokteran regeneratif bertujuan mengembalikan fungsi dan struktur organ yang rusak akibat penyakit. Regenerasi berkaitan dengan homeostasis jaringan dan melibatkan penggantian sel-sel yang usang atau rusak akibat cedera. Kapasitas regenerasi organ adalah ciri penting makhluk hidup dengan batas usia yang panjang, menjaga keutuhan jaringan di organ dan integritas fungsi organ tersebut menentukan keberlangsungan hidup makhluk hidup. Penyakit atau trauma menghalangi pemulihan jaringan (*restitutio ad integrum*) yang berakhir dengan pembentukan jaringan parut. Pembentukan jaringan parut (*scar formation*) terutama untuk menangani kerusakan meluas, dengan cara melingkupi lesi (daerah kerusakan jaringan), mencegahnya meluas ke jaringan sehat, dan mencegah kaskade reaksi kimia yang merusak jaringan. Namun, jaringan parut tidak memiliki ciri fisik, biokimia dan fungsi yang sama dengan jaringan sehat; dengan kata lain menurunkan fungsi organ secara keseluruhan.

Jantung selama lebih dari 60 tahun dianggap sebagai organ berdiferensiasi terminal pasca mitosis (*terminally differentiated postmitotic organ*) yang tidak memiliki kemampuan regenerasi. Perubahan dramatis terhadap konsep jantung sebagai organ yang mampu beregenerasi diawali oleh penelitian pada tahun 1940 dan bukti-bukti terus menumpuk menunjukkan adanya kemampuan regenerasi jantung pada keadaan normal maupun patologis. Namun, perdebatan terus berlangsung hingga kini. Dengan ditemukannya sel stem di jantung tahun 2004 mengubah perspektif lama tentang jantung. Jantung sebagai organ dinamis yang memiliki sel stem residen yang dapat menghasilkan sel otot jantung, sel endotel dan sel otot polos dari pembuluh darah koroner.

2.2. HISTOLOGI JANTUNG^{16,17}

Jantung adalah organ pemompa darah dari dan ke seluruh tubuh kita. Terletak di rongga dada, dalam ruang yang kanan dan kirinya berbatasan dengan paru, bagian depan berbatasan dengan tulang sternum dan iga, belakang dengan esophagus dan alat-alat mediastinum lainnya, bawah dengan diafragma.

Jantung memiliki empat ruangan : atrium kanan dan kiri (menerima darah), ventrikel kanan dan kiri (memompa darah keluar jantung). Vena kava inferior dan superior mengembalikan darah dari seluruh tubuh ke atrium kanan. Selanjutnya darah akan menuju ke ventrikel kanan melalui katup trikuspid. Sementara darah yang telah teroksigenasi dari paru akan menuju ke atrium kiri jantung melalui vena pulmonalis. Dari atrium kiri darah menuju ventrikel kanan melalui katup bikuspid. Proses pengisian dan pengosongan atrium kanan dan kiri terjadi bersamaan. Kemudian secara bersamaan pula ventrikel kanan berkontraksi memompa darah ke paru-paru, dan ventrikel kiri memompa darah ke seluruh tubuh. Lalu siklus pengisian dan kontraksi berulang kembali.

Dinding jantung terdiri atas tiga lapisan yaitu endokardium, miokardium, dan epikardium. Endokardium adalah kelanjutan dari tunika intima pembuluh darah yang masuk dan keluar jantung. Terdiri atas endotel yang merupakan sel epitel selapis gepeng dan jaringan ikat fibroelastis tersebar di bawah endotel. Lebih dalam dari jaringan ikat fibroelastis terdapat jaringan ikat padat mengandung banyak serat elastis diselingi oleh sel-sel otot polos. Setelah itu terdapat lapisan subendokardium yang tersusun atas jaringan ikat longgar dengan pembuluh darah kecil, saraf, dan serat Purkinje yang menghantarkan rangsang listrik jantung (terutama di ventrikel). Lapisan subendokardium membentuk batas antara endokardium dan endomisium (selubung) sel otot jantung (sel otot jantung). Miokardium, lapisan di tengah dinding jantung yang paling tebal, terdiri atas sel-sel otot jantung (sel otot jantung) tersusun menjadi spiral-spiral kompleks sekitar orifise masing-masing ruang jantung. Beberapa sel otot jantung menempel pada rangka fibrosa jantung. Juga ada beberapa menjadi sel-sel khusus sekresi endokrin, terletak paling banyak di dinding atrium dan septum interventrikular. Menghasilkan sekret peptida seperti atriopeptin, polipeptida atrial natriuretik, kardiodilatin dan kardionatrin yang dilepas ke kapiler sekitar sel-sel tersebut. Hormon-hormon ini membantu mempertahankan

keseimbangan elektrolit dan menurunkan tekanan darah. Dan beberapa lainnya khusus untuk hantar rangsang dan pembangkit rangsang jantung.

Panjang sel otot jantung saat istirahat rata-rata $80\mu\text{m}$ dengan diameter $15\mu\text{m}$. Tiap sel memiliki satu inti sel berbentuk oval terletak di tengah-tengah sel, kadang-kadang terdapat dua inti sel. Ujung sel-sel otot jantung membentuk taut yang sangat istimewa dikenal dengan diskus interkalaris. Membran sel yang turut dalam taut ini merapat satu sama lain, sehingga jarak antara keduanya sekitar 15 sampai 20 nm. Diskus interkalaris memiliki bagian transversal tempat melekatnya fasia adherents dan desmosom, sementara bagian lateral kaya dengan taut salur (*gap junction*). Di bagian membran diskus interkalaris arah sitoplasma, miofilamen tipis menempel ke fasia adherentes (analog dengan garis Z otot rangka). Taut salur yang berfungsi untuk komunikasi antar sel. Retikulum sarkoplasmik sel otot jantung berupa terminal kecil yang mendekati tubulus T. Formasinya membentuk dyad, terletak dekat diskus interkalaris. Tubulus T sel otot jantung diameternya 2,5 kali lipat tubulus T otot rangka dan dibatasi oleh lamina eksterna. Epikardium lapisan paling luar dari dinding jantung juga dikenal sebagai lapisan perikardium viseral, tersusun oleh sel-sel epitel selapis gepeng (mesotelium). Antara miokardium dan perikardium viseral adalah lapisan subepikardium yang disusun oleh jaringan ikat longgar tempat pembuluh koroner, saraf dan ganglia. Lapisan subepikardium juga merupakan tempat penyimpanan jaringan lemak di permukaan luar jantung. Di pangkal pembuluh aorta dan vena cava jantung, perikardium viseral bertemu dengan perikardium parietal (lapis serosa). Kedua lapisan perikardium ini membentuk ruang perikardial yakni ruang antara perikardium viseral dan parietal berisi sedikit cairan serosa sebagai pelumas.

Pada perbatasan antara atrium dan ventrikel, di subepikardium, dapat dikenali potongan pembuluh darah koroner baik arteri maupun vena. Dinding pembuluh arteri koroner berbeda dari arteri pada umumnya. Pembuluh ini tata bangun lapisan dindingnya istimewa. Lapisan medianya terpisah menjadi dua dan lebih tebal dibandingkan arteri yang setingkat. Kadang-kadang dapat ditemukan seberkas lapisan otot longitudinal di bawah endotel.

2.3. Histodinamika Jantung

Konsep tradisional tentang jantung sebagai organ statis yang tidak mengalami mitosis dan regenerasi cukup lama diterima sebagai kebenaran. Menurut konsep tersebut jumlah sel-sel otot jantung ditetapkan pada saat kelahiran dan tak tergantung sepanjang hidup. Sel-sel otot jantung yang terbentuk selama masa embrio dan janin bertanggung jawab dalam menjaga fungsi dan kinerja jantung anak, dewasa dan orang tua. Apoptosis sel otot jantung adalah kejadian yang sangat langka atau bahkan tidak pernah terjadi, karena bila terjadi jantung akan segera kehilangan banyak sel dan hanya menyisakan sekelompok kecil sel otot jantung untuk mempertahankan kinerja jantung. Sel-sel yang tersisa terus bekerja secara fisiologis dengan mengalami hipertrofi. Konsep yang berkembang kini adalah jantung sebagai organ yang dapat beregenerasi, sel-selnya berganti secara dinamis sepanjang hayat.¹⁸

2.3.1. Penanda Histodinamika Jantung

Akhir tahun 1960, Linzbach mengemukakan hasil penelitiannya : jantung dengan berat sama dengan atau lebih dari 500 g mekanisme penambahan massa otot berasal dari proliferasi sel otot jantung. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah panjang sel otot jantung (diukur berdasar jarak antara dua inti sel berdekatan) dan diameter sel otot jantung diukur pada potongan sel otot jantung melewati inti. Variabel-variabel tersebut dikenali dalam sediaan histologi rutin. Dari hasil pengukuran tersebut dengan mengetahui bentuk sel otot jantung silinder maka dapat dihitung volume dari satu sel otot jantung. Sedangkan secara makroskopis volume dinding jantung dapat ditentukan. Perbandingan antara volume dinding jantung dibagi dengan volume sel otot jantung maka didapatkan jumlah sel otot jantung. Hasil penelitian tersebut baru dapat dikonfirmasi oleh laboratorium lain dengan teknik yang disempurnakan beberapa tahun kemudian. Ditemukan bahwa jantung dengan berat 500 g atau lebih memiliki jumlah sel otot jantung yang meningkat, mekanisme ini lebih nyata dibanding hipertrofi sel otot jantung, dan peristiwa adaptasi ini terjadi pada ventrikel kanan dan kiri.¹⁹

Pertengahan dan akhir tahun 1990-an, penelitian-penelitian baru tentang jantung manusia dilakukan untuk menentukan distribusi sel otot jantung dengan satu inti dan dua inti sel pada 72 jantung sehat dan 176 jantung berpenyakit. Penuaan, hipertrofi jantung dan

kardiomiopati iskemik ditandai dengan minimnya perubahan proporsi sel otot jantung berinti satu dan dua pada miokardium ventrikel, temuan ini menegaskan kembali bahwa mekanisme yang terjadi adalah proliferasi sel otot jantung bukan hiperplasia inti tanpa diikuti pembelahan sel otot jantung. Sel-sel otot jantung berinti satu terdapat sebanyak 75% dari total sel otot jantung di jantung manusia, berbeda signifikan dengan mencit, tikus, anjing dan babi. Sel-sel tersebut berukuran lebih kecil dari sel otot jantung berinti dua, dan komponen sel-sel ini mempengaruhi kemampuan sel otot jantung untuk bermitosis.²⁰

Sel otot jantung manusia yang berukuran lebih dari 30,000 μm^3 tidak dapat memasuki siklus sel dan berproliferasi. Oleh karenanya, sel otot jantung yang mampu bermitosis dan proliferasi paling banyak adalah sel-sel otot jantung yang kecil dan berinti satu. Persentase sel kecil berinti satu yang berproliferasi (BrdU positif) lebih tinggi daripada sel besar berinti dua (3.1% vs 0.8%; $P < 0.05$), dan sel kecil berinti satu memiliki aktivitas telomerase lebih tinggi dibanding sel besar berinti dua.²¹

Proliferasi sel otot jantung berbanding lurus dengan jumlah sel otot jantung, tidak terdapat metodologi lain untuk menyatakan penambahan jumlah sel otot jantung yang menandakan regenerasi jantung selain morfologi kuantitatif (*Quantitative morphology*). Penanda biokimia, molekuler, fisiologis, autoradiografi hanya dapat memberi kesan terjadinya regenerasi.²²

Regenerasi jantung menantang konsep hipertrofi sel otot jantung yang telah mendominasi bidang kardiologi molekuler dan transduksi sinyal selama 25 tahun.²⁶ Gagal jantung menunjukkan peningkatan jumlah sel otot jantung antara 20%–100% atau lebih. Fenomena ini tidak dipengaruhi usia.²³

10 – 12 tahun terakhir, gambaran mitosis sel otot jantung telah ditemukan pada kasus-kasus kardiomiopati akut dan iskemia kronis, kardiomiopati dilatasi yang tidak diketahui penyebabnya, stenosis aorta kronis dengan disfungsi ventrikel derajat sedang, penuaan miokardium, akromegali dan diabetes.^{24,25} Frekuensi mitosis sel otot jantung diperiksa di bawah mikroskop konfokal dengan beberapa spesimen jantung yang berasal dari jantung manusia, mencit dan tikus adalah $14/10^6$ sel otot jantung pada jantung manusia, $37/10^6$ sel otot jantung pada jantung mencit dan $85/10^6$ sel otot jantung jantung tikus. Nilai fibroblas interstisial yang berproliferasi mirip dengan kisaran tersebut. Berdasar

data ini, ~350, 140, dan 60 mm² jaringan perlu diperiksa untuk menentukan proliferasi sel otot jantung di jantung manusia, mencit dan tikus.^{26,27}

2.3.2. Keberadaan Sel Stem Jantung sebagai penanda histodinamika jantung

Ditemukannya sel stem dewasa di beberapa organ antara lain sumsum tulang, kulit, susunan saraf pusat, hepar, traktus gastrointestinal dan otot skelet mendorong pencarian sel stem dewasa di organ-organ lain, termasuk jantung. Keberadaan sel stem jantung dapat menjawab pertanyaan mengenai asal sel otot jantung yang berproliferasi dan peningkatan mitosis dan sitokinesis sel otot jantung pada kondisi patologis yang bersifat akut maupun kronik.²⁸

Keberadaan sel stem jantung yang belum berdiferensiasi ini dengan turunan-turunan sel yang sudah berkomitmen menunjukkan sel stem jantung berperan dalam keseimbangan dan regenerasi miokardium yang mengalami stressor. Pengamatan ini menjadi dasar penelitian-penelitian selanjutnya yang berakhir dengan identifikasi dan penentuan sifat-sifat sel stem residen jantung (CSC, *Cardiac Stem Cells*). Model biologi baru dan menarik dari perkembangan, penuaan dan kematian sel-sel jantung kini bermunculan. Jantung sebagai organ yang dapat memperbaharui dirinya sendiri dengan penggantian sel-sel parenkim dan non-parenkim jantung diatur oleh kompartemen sel stem dan kemampuan sel-sel stem tersebut untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi. Regenerasi mengikuti hierarki tipe-tipe sel : sel stem yang membelah diri dengan lambat menurunkan sel-sel progenitor *lineage restricted* yang aktif berproliferasi, yang kemudian menurunkan precursor-prekursor berkomitmen yang pada akhirnya berhenti berkembang (*growth arrest*) dan mengalami diferensiasi terminal.²⁹

Usaha pertama untuk menjelaskan keberadaan sel stem jantung dilakukan oleh Rudnicki dan kawan-kawan,³⁰ yang mengisolasi populasi sel *Hoechst effluxing* dari jantung mencit berusia 2 bulan. Sel-sel serupa yang mengekspresikan MDR1 atau transporter ABC sebanding telah ditemukan di organ-organ lain dan disebut populasi sel-sel cadangan. Sel-sel yang diduga sel stem jantung ini tidak mengekspresikan penanda sel-sel hematopoetik (CD34, c-kit, Sca-1, Flk-2, dan Thy1.1). Sel-sel tersebut ketika dikultur di medium metilselulose membentuk koloni dan setelah dikultur bersama sel otot jantung matur, berdiferensiasi menjadi sel otot jantung yang mengekspresikan connexin43.

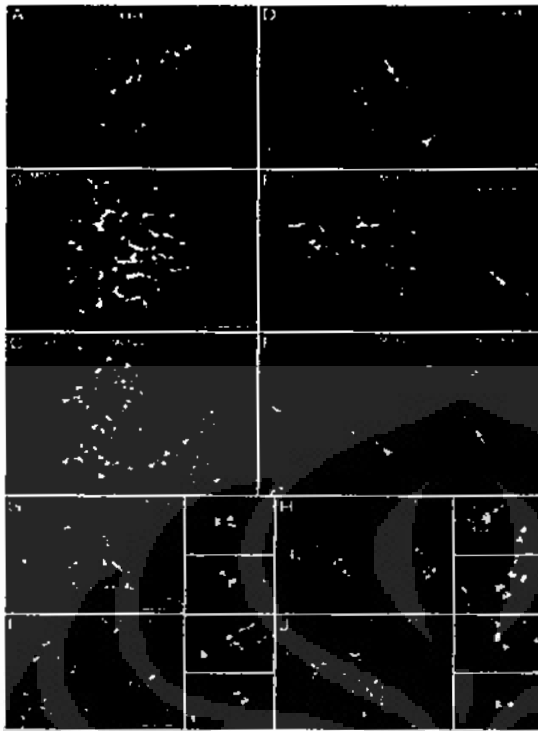
Kini, sel stem jantung didefinisikan sebagai sel-sel belum berdiferensiasi yang mengekspresikan antigen terkait sel stem di permukaan membran seperti c-kit, MDR1, dan Sca-1, dengan beragam kombinasinya. Sel stem jantung dipisahkan berdasar masing-masing antigen sel stem yang dimilikinya karena kemampuan perkembangan dan diferensiasinya tampak berbeda secara *in vitro*. Mengenai potensi diferensiasi ketiga klas antigen sel stem secara *in vivo* belum diketahui saat ini. Analisis FACS memisahkan sel stem berdasarkan antigen permukaan membrane(epitop).³¹

Data kuantitatif pada jantung mencit, tikus, anjing dan manusia setelah diteliti ditemukan ada satu sel stem jantung per 30,000–40,000 sel-sel otot jantung: 65% sel stem jantung memiliki tiga antigen sel stem(c-kit, MDR1, Sca-1); 20% memiliki dua antigen sel stem dan 15% hanya memiliki satu antigen. Namun, hasil penelitian ini tidak menjawab pertanyaan tentang pengaruh keragaman distribusi penanda permukaan terhadap perbedaan fungsi sel.³²

Kelompokan sel-sel stem jantung (*cardiac stem cells*, CSC) tersebar di seluruh miokardium, dengan lokalisasi di tempat-tempat tertentu akibat pengaruh tekanan dinding. Bahkan, frekuensi kelompokan sel stem jantung berbanding terbalik dengan beban hemodinamik yang dialami dinding jantung: terakumulasi pada atrium dan apeks dan ditemukan dalam jumlah lebih sedikit pada basis jantung dan bagian pertengahan ventrikel kiri. Dengan cara yang sama seperti senyawa kimia (sitokin dan hormon) , gaya lokal(tekanan fisik, deformitas mekanik dan tekanan tinggi pada dinding jantung) dapat memicu transduksi sinyal intrasel yang mengubah pola migrasi, proliferasi, diferensiasi dan kematian sel. Beberapa *growth factor* yang telah dikenali reseptornya pada permukaan sel stem jantung adalah *hepatocyte growth factor(hgf)* dengan reseptor c-met dan *insulin-like growth factor 1 (igf1)*.³³

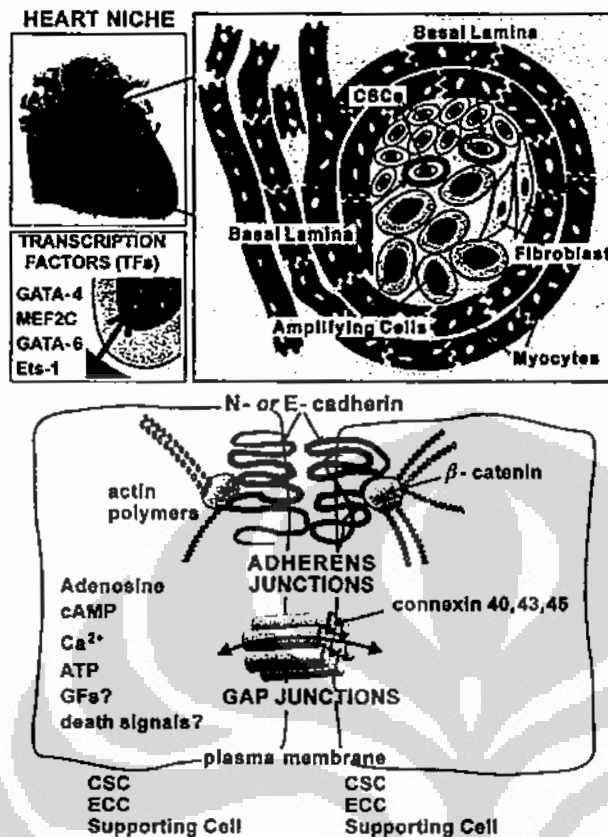
2.3.3. Lingkungan mikro sel stem jantung (Niche jantung)

Niche definisinya adalah struktur berbentuk elips yang letaknya acak, disusun oleh komponen sel dan matriks ekstrasel. Sejumlah 50 niche masing-masing diukur di regio atrium, basis-*midregion*, dan apeks. Volume rata-rata niche adalah $\approx 11.000 \mu\text{m}^3$. Niche di atrium ≈ 2 x lipat lebih besar daripada niche ventrikel. Jumlah niche per mm^3 atrium dan apeks miokard ≈ 8 x lipat lebih tinggi dibandingkan regio basis- *midregion*.³³



Gambar 2.1. Niche jantung terdiri atas kelompokan sel stem jantung-sel komitmen galur jantung bersama sel pengasuh dikelilingi matriks ekstra sel. Niche terletak di interstisial miokardium.³³

Susunan sel stem jantung –sel komitmen galur jantung dan sel-sel penyokong di niche jantung mirip dengan yang ditemukan di sumsum tulang dan otak, memberikan analogi untuk organ-organ tersebut. Pada sumsum tulang, osteoblas dan sel stroma berfungsi sebagai sel penyokong. Analogi sel tersebut di jantung adalah sel otot jantung dan fibroblas. Sel-sel endotel tidak berperan sebagai sel pengasuh di jantung, tapi merupakan kandidat sel pengasuh di otak dan fungsinya dapat dibandingkan di sumsum tulang. Lamina basalis yang utuh memisahkan niche endotel dan saraf (sawar-darah otak), hal ini tidak ditemukan di sumsum tulang maupun jantung.³³



Gambar 2.2. Skema dari Niche jantung. Terlihat taut antar sel berupa *adherens junction* (taut lekat) dan *gap junction* (taut imbas).³³

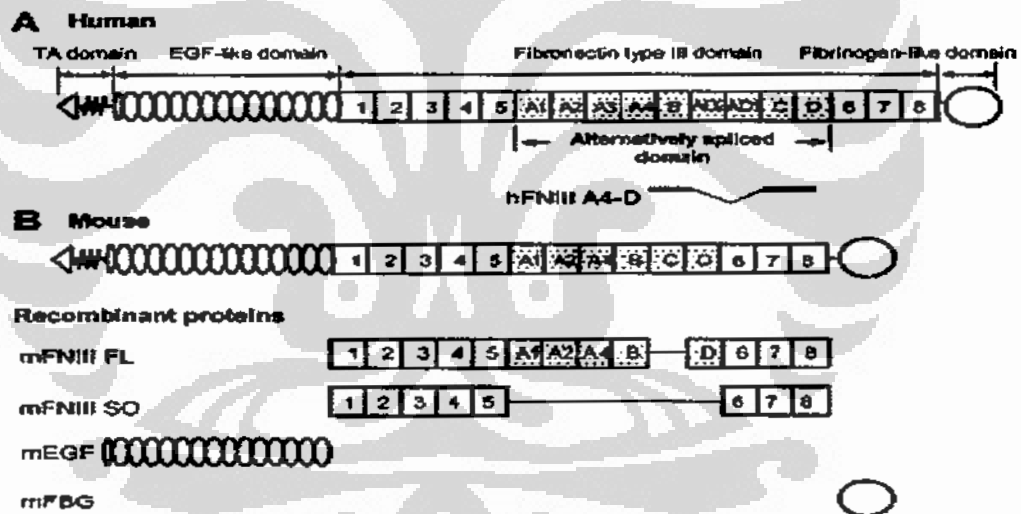
Integrin adalah molekul reseptor adesi untuk perlekatan sel-sel ke protein ekstrasel yakni fibronektin dan laminin. β_1 -Integrin paling sering ditemukan pada permukaan membran sel stem dan sel komitmen galur dalam niche. Fibronektin dan rantai α_2 laminin adalah ligan untuk $\alpha_4\beta_1$ -integrin. Lokalisasi bersamaan dari rantai α_2 laminin dan fibronektin dengan α_4 -integrin terbatas untuk sel stem jantung yang tidak memiliki peanda galur (*Lin⁻ CSCs*), menandakan ikatan α_4 -integrin mungkin berhubungan dengan preservasi *stemness* dari sel stem jantung. Laminin-8/9 dan -10/11 jarang ditemukan di jantung. Pada niche jantung, rantai α_2 laminin dan fibronektin mentransduksi sinyal mekanik dari kompartemen ekstrasel lewat kompleks reseptor $\alpha_4\beta_1$ -integrin, yang mengaktifkan jalur efektor melawan program komitmen dan diferensiasi sel stem jantung.³³

2.4. Kaitan antara Tenascin C dengan Niche jantung

Tenascin C masuk dalam keluarga matriks ekstrasel berupa glikoprotein bernama tenascin yang membentuk dua, tiga hingga enam struktur lengan dan memiliki tipe domain struktural yang sama. Lima anggota keluarga tenascin telah ditemukan pada vertebrata sampai saat ini : tenascin/cytotactin (tenascin-C, TNC), restrictin/J1-160-180(tenascin-R, TNR), tenascin-X (TNX), tenascin-Y (TNY) dan tenascin W (TNW).³⁴

Tenascin-C (TN-C), adalah molekul matriks ekstrasel yang diekspresikan tinggi selama masa embrionik dan jaringan kanker, juga sebagai respon terhadap jejas, diketahui mempengaruhi aktivitas bermacam-macam sel. Tiap subunit dari glikoprotein heksamer ini disusun oleh TA (*tenascin assembly domain*), 14 *1/2 epidermal growth factor (EGF)-like repeats*, fibronektin tipe III (FN III)-*like repeats* dengan jumlah yang bervariasi, dan domain yang terkait fibrinogen (*Fbg*)-*related domain* pada C terminal.³⁵

Gen yang mengkode tenascin C terletak pada kromosom manusia 9; 9q33.³⁶



Gambar 2.3. Skema struktur biokimia protein tenascin C.³⁵

Ukuran monomer tenascin C bervariasi sebagai hasil *alternative splicing* di daerah repetisi FN III pada tingkat pre-mRNA. Terdapat delapan repetisi FN III yang dipertahankan (*conserved*) disimbolkan dengan nomor 1-8. Pada manusia terdapat sembilan alternatif *splice* di repetisi FN III disimbolkan dengan huruf A-D, disisipkan antara repetisi yang dipertahankan no 5 dan 6. Pada orang dewasa, varian terkecil TN-C

membuang domain yang di-*splice* alternatif dan ini terdapat di jaringan statis, sementara varian besar mengandung domain FN III yang di-*splice* alternatif dalam kombinasi yang bervariasi dan ditemukan pada jaringan yang berkembang, keadaan patologis, remodeling jaringan, dan juga regenerasi, inflamasi dan tumorigenesis.³⁴

Ekspresi dari tenascin C bersifat spasial dan temporal, terbatas pada jaringan tertentu. Tenascin C pada jaringan embrio terutama di mesenkim padat sekitar epitel yang berkembang dan tulang rawan serta tulang yang berkembang. Pada orang dewasa, tenascin terdapat di tendon dan perbatasan otot-tendon (disebut juga *myotendinous antigen*) di perikondrium dan periosteum, juga di jaringan otot polos. Ekspresi tenascin C ditemukan juga di pembuluh darah baru (*neovasculature*) dan stroma tumor yang tidak berdiferensiasi. Nama lain dari tenascin C adalah hexabrachion, cytotactin, myotendinous antigen (MI) dan glioma mesenchymal extracellular matrix (GMEM).³⁶

Kerja dari tenascin C antara lain meningkatkan pertumbuhan, hemaglutinasi, immunosupresi sel limfosit T, meningkatkan angiogenesis dan kondrogenesis. Selain itu memiliki efek anti-adesi (perlekatan) pada banyak tipe sel dan meningkatkan motilitas atau migrasi sel. Ekspresi tenascin C yang tinggi pada jejas akut diketahui berperan penting dalam proses inflamasi dan reparasi di tempat jejas. Induksi tenascin C yang menonjol dapat dilihat di berbagai keadaan reaktif, seperti inflamasi dan penyembuhan luka dan di stroma berbagai karsinoma.³⁵

Penelitian terhadap kerja spesifik tenascin C pada berbagai jenis sel, seringkali menunjukkan efek kontradiksi. Tenascin C meningkatkan perlekatan sel-sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVEC) dan fibroblas *in vitro*, tapi menjadi anti perlekatan untuk oligodendrosit dan sel-sel krista neuralis. Tenascin-C meningkatkan migrasi dari HUVEC dan sel-sel endotel retina *bovine* tapi menghambat migrasi sel-sel glioma dan oligodendrosit. *In vivo*, tenascin C sering ditemukan sebagai komponen lingkungan migrasi sel-sel motil seperti sel-sel progenitor hematopoetik dan sel-sel neuron di embrio, tapi dapat mewakili zona restriksi yang tak dapat dilewati sel misalnya di separuh anterior somit. Beragam kerja tenascin C menyesuaikan dengan jenis sel dan lingkungan disebabkan oleh beberapa faktor di antaranya partner ikatan yang tersedia, variasi isoform tenascin C yang diekspresikan, dan proses enzimatik terhadap isoform oleh berbagai proteinase, contohnya MMP, yang dapat mengekspos atau menghancurkan berbagai domain yang mengatur aktivitas sel.³⁷

Pada jantung, ekspresi TN-C muncul saat tahap awal perkembangan embrio. TN-C secara singkat diekspresikan pada tahap-tahap penting perkembangan jantung : (1) sel-sel mesoderm prekardial berdiferensiasi menjadi sel-sel otot jantung dan sel-sel endokardium pada E 7.5 - 8.5; (2) sel-sel otot jantung di *outflow tract* pada E 8.5 - 12; (3) sel-sel endokardium membentuk jaringan *cushion* pada E 9.5 - 13; dan (4) sel-sel mesenkim di organ pro-epikardia (*proepicardial organ* (PEO)), yakni precursor pembuluh koroner pada E 9.5. Ketika sel-sel PEO dipindahkan ke permukaan jantung, ekspresi TNC diturunkan, namun ekspresinya secara spesifik terlihat saat transformasi sel-sel epitel mesenkim dari PEO di ruang subepikardial menjadi sel-sel interstisial miokardium. Sementara TNX (komplementer tenascin C = tenascin X) ekspresinya meningkat pada E 11. TNX berperan dalam vaskulogenesis koroner, namun tidak dapat mengkompensasi hilangnya TNC. Pada mencit defisien TNC jantung masih dapat berkembang normal.³⁸

Berdasarkan temuan di atas, maka tenascin C berperan penting dalam transformasi sel-sel epitel mesenkim PEO menjadi sel-sel interstisial miokardium, yang kini kita ketahui sebagai sel-sel di niche jantung.³⁹

2.5. Peran Tenascin C dalam regenerasi otot jantung

2.5.1. Peran Tenascin C dalam remodeling jantung

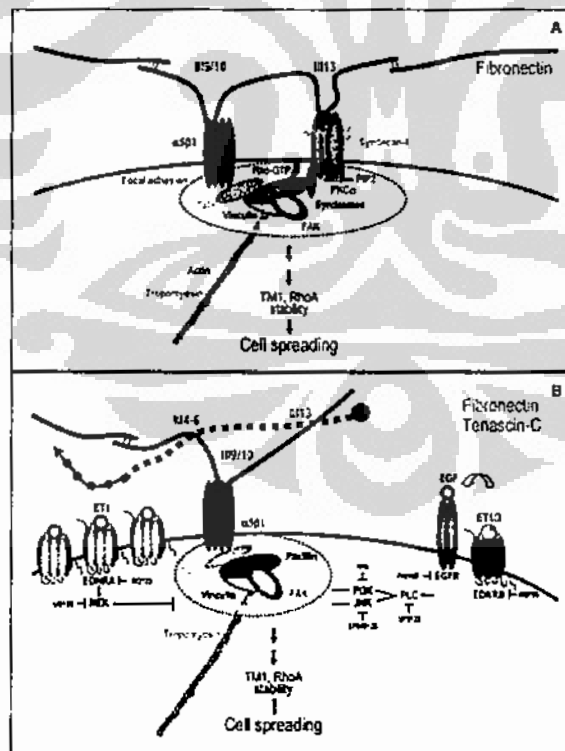
Ekspresi tenascin C di jantung tidak terbatas pada masa embrionik. Pada jantung orang dewasa normal, tidak ditemukan ekspresi tenascin C. Namun, ekspresi TNC ditemukan kembali setelah jejas miokardium dan mengatur remodeling jaringan dengan mengubah perlekatan sel-sel otot jantung ke jaringan ikat, peningkatan migrasi dan diferensiasi miofibroblas dan menginduksi MMP (matriks metalo proteinase). TNC juga berinteraksi dengan molekul matriks ekstrasel lainnya dan dapat mengubah progresivitas fibrosis. Lebih lanjut, kadar TNC dapat digunakan sebagai penanda aktivitas penyakit yang mengenai miokardium seperti infark miokard akut, miokarditis akut dan beberapa kasus kardiomiopati.⁴⁰

Penelitian Miyagawa-Tomita dan kawan-kawan menemukan peningkatan kadar tenascin C dalam serum 107 pasien DCM (*Dilated Cardio Myopathy*) menandakan tingkat keparahan gagal jantung, disfungsi ventrikel kiri dan remodeling jantung. Kadar TNC serum diukur dengan kit ELISA. Terdapat korelasi bermakna antara peningkatan kadar

TNC serum dengan stadium gagal jantung berdasar klasifikasi NYHA (*New York Heart Association functional class*), kadar natriuretik tipe B, rasio jantung: thorax dalam X-ray, diameter ventrikel kiri pada akhir sistol dan diastol.⁴¹

Eksresi tenascin C diregulasi dengan ketat di jaringan orang dewasa. In vitro, PDGF (*Platelet Derived Growth Factors*) menginduksi ekspresi protein dan mRNA TNC pada tingkat transkripsi via jalur sinyal PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt. *Overexpression* Sp1, Ets1, atau Ets2 mengaktifkan promotor TNC dan superinduksi aktivitas promotor TNC dirangsang oleh PDGF. Analisis lanjutan menunjukkan Sp1, Ets1, dan Ets2 membentuk kompleks transkripsi aktif. Hasil penelitian tersebut menunjukkan *upregulation* ekspresi TN-C oleh PDGF melibatkan faktor transkripsi dari kerabat Ets, bekerja sama dengan Sp1. *Upregulation* tenascin-C pada tepi jejas jaringan menginduksi fenotip motilitas sel, dan longgarnya ikatan dengan matriks ekstra sel. Fungsi TNC di tempat tersebut untuk menghambat kontraksi matriks dan mencegah deposisi ekstensif matriks fibronektin yang baru disintesis.⁴²

Tenascin C memprogram jalur sinyal ke intrasel melalui perubahan aktivasi RhoA dan FAK, dengan efek *downstream* pada sitoskeleton aktin.⁴³



Gambar 2.4. Transduksi sinyal diinisiasi tenascin C.⁴³

Setelah infark miokard, ekspresi TNC muncul selama fase akut, di perbatasan antara daerah infark dan miokardium yang intak. TNC dapat melonggarkan taut antar sel-sel otot jantung dan jaringan ikat dan karenanya membantu remodeling jaringan pada tepi sisa-sisa miokard intak. Terdapat miofibroblas dengan penanda α -smooth muscle actin (α -SMA)-positif di area TN-C-positif dan rekrutment mereka didahului oleh penumpukan TN-C.⁴⁴

Miofibroblas adalah fibroblas khusus yang memiliki sifat seperti sel otot polos dan mengekspresikan α -SMA. Sel tersebut berperan penting dalam penyembuhan luka dengan mensintesis kolagen dan memberikan gaya kontraksi yang kuat untuk meminimalisir luasnya luka. Pada mencit dengan *knockout* gen TNC, jejas miokardium lambat penyembuhannya, hal ini disebabkan oleh minimnya rekrutment miofibroblas yang berperan dalam pembentukan dan kontraksi jaringan parut.⁴⁴

Tenascin C adalah molekul kunci dalam mengendalikan keseimbangan respon sel yang menguntungkan dan merugikan dalam remodeling jantung. Respon sel yang menguntungkan antara lain : rekrutmen miofibroblas pada tahap awal reparasi jaringan miokardium akan meningkatkan kekuatan kontraksi untuk menghindari dilatasi ventrikel, selama remodeling jaringan TN-C melonggarkan perlekatan sel-sel otot jantung, merangsang ekspresi MMP dan mengurai integrin untuk memudahkan modifikasi interaksi sel dengan matriks ekstrasel. Respon merugikan : inhibisi kontraksi sel karena penekanan aktivitas FAK dan RhoA di matriks fibrinogen-fibronektin, potensi tergelincirnya sel-sel otot jantung di zona perbatasan mengakibatkan dilatasi ventrikel.⁴⁴

2. 5. 2. TN-C sebagai agen neovaskularisasi jantung

Secara fungsional, tenascin-C menghambat penyebaran sel endotel jantung dan meningkatkan migrasi sebagai respon terhadap faktor pertumbuhan angiogenik. Analisis thrombus di arteri koroner manusia mengungkapkan ekspresi tenascin-C bersamaan dengan *endothelial cell/EPC marker Tie-2* di kanal intratrombus. Dengan pewarnaan imunohistokimia terhadap jantung tikus ditemukan tenascin C letaknya bersamaan dengan tempat induksi angiogenik jantung, tempat bermigrasinya sel progenitor endotel (EPC).⁴⁵

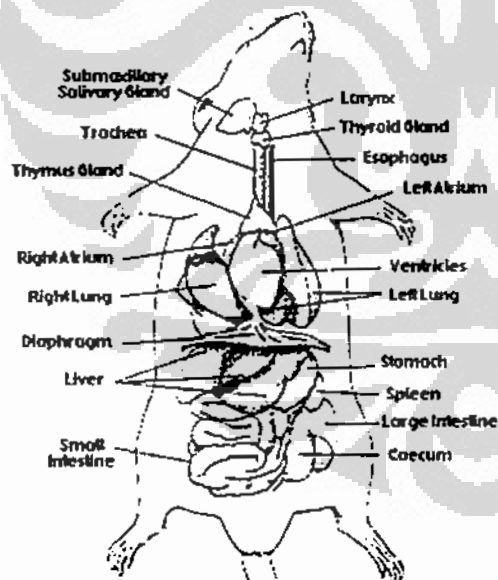
Pada perbandingan model transplantasi jantung mencit WT dan tenascin-C^{-/-}, mencit tanpa ekspresi TN-C gagal mendarahi allograft jantungnya. Disimpulkan bahwa tenascin C adalah regulator lingkungan mikro untuk aktivitas endotel jantung/EPC. TN-C

meningkatkan angiogenesis jantung lewat mekanisme sistemik dan lokal. Penambahan tenascin C secara eksogen untuk mengembalikan fungsi angiogenik jantung pada pasien lanjut usia merupakan pengembangan terapi yang potensial. Bisa dimanfaatkan pada fase akut infark miokard atau kondisi stroke, yang memerlukan neovaskularisasi cepat.⁴⁵

TN-C berperan dalam *angiogenic switch*, memfasilitasi menyatunya sel-sel progenitor endotel atau sel-sel endotel lokal ke pembuluh darah yang mengalami remodeling dan meningkatkan migrasi sel-sel tersebut. Oleh karenanya, TN-C memiliki peran penting dalam mekanisme reparasi vaskuler jantung.⁴⁶

2. 6. Kajian pustaka tentang subyek penelitian

Tikus Sprague Dawley adalah strain tikus yang merupakan biakan tikus lab albino termasuk dalam spesies *Rattus norvegicus*. Awalnya dibiakkan dari strain tikus Wistar.⁴⁷ Alasan pemilihan strain tikus Sprague Dawley adalah karena tikus ini cukup tenang, mudah ditangani dan memiliki struktur anatomi jantung yang mirip dengan manusia. Jantung tikus terletak di tengah rongga dada, memiliki 4 ruang seperti jantung manusia. Dua ruang yang berwarna gelap di sebelah atas disebut atria (tunggal:atrium) dan dua ruang di sebelah bawah disebut ventrikel. Jantung tikus dibungkus oleh selaput tipis disebut perikardium.



Gambar 2.5. Skema Organ Visera dada dan abdomen sesuai letak anatomi tikus.⁴⁸

Jenis kelamin tikus dipilih jantan untuk menghindarkan pengaruh estrogen terhadap niche jantung, mengingat estrogen juga merupakan faktor di lingkungan mikro (niche) jantung yang dianggap berperan dalam regenerasi dan proliferasi sel stem dan sel

progenitor jantung. Namun demikian, faktor-faktor lingkungan mikro jantung lainnya tidak dapat dikendalikan dalam penelitian ini.

Kelompok usia tikus ditentukan berdasarkan tahap-tahap perkembangan penting dalam rentang hidup tikus. Rata-rata rentang hidup tikus berkisar antara 2 hingga 3.5 tahun. Dalam sebuah survei tentang rentang hidup tikus di Inggris, nilai mean adalah 21.6 bulan, dan 95% populasi meninggal di usia 3 tahun. Tikus mencapai kematangan seksual di usia 6 minggu, tapi kematangan sosial diperoleh beberapa bulan kemudian di usia 5 atau 6 bulan. Masa dewasa, tiap bulan usia tikus ekuivalen dengan dua setengah tahun usia manusia. Perkembangan pasca lahir dimulai saat baru lahir atau dalam periode neonatus (0-5 hari). Tahap perkembangan jantung kedua yang akan diteliti pada penelitian ini adalah dewasa muda yakni usia tikus 3-4 bulan (setara dengan usia manusia 15-17 tahun). Sedangkan tahap perkembangan ketiga adalah usia dewasa. Pada manusia, onset penyakit jantung pada laki-laki lebih dini dibanding wanita yakni usia 30 tahun ke atas. Oleh karenanya, pada penelitian ini diteliti gambaran histologi jantung tikus jantan usia 12-16 bulan (setara dengan usia manusia 30-40 tahun) untuk mengetahui perubahan struktural yang dapat mendasari perjalanan penyakit jantung.⁴⁹

Usia tikus (bulan)	Setara dengan usia manusia (tahun)
1.5	12.5
6	18
12	30
18	45
24	60
30	75
36	90
42	105
45	113
48	120

Tabel 2.1. Perbandingan usia tikus dengan usia manusia.⁴⁹

2.7. Prinsip dasar pewarnaan imunohistokimia⁵⁰

Imunohistokimia memperlihatkan komponen jaringan atau sel secara *in situ* melalui interaksi spesifik antigen-antibodi kemudian antibodi dilabel untuk visualisasi. Marker visualisasi dapat berupa zat fluoresens, koloid logam, hapten, zat radioaktif atau enzim.

Imunohistokimia menunjukkan dengan tepat lokasi komponen target di sel dan jaringan berdasarkan rasio sinyal-latar belakang non spesifik (*noise*) yang tinggi. Amplifikasi sinyal disertai pengurangan latar belakang non spesifik adalah strategi utama untuk memperoleh hasil optimal dan layak untuk diinterpretasi.

Metode deteksi dibagi menjadi dua kelompok besar:

1. *Direct conjugate-labeled antibody method*

Metode pewarnaan satu langkah dan label secara kimia dikonjugasi ke antibodi yang langsung diaplikasikan ke preparat (antibodi primer). Kelebihan metode ini adalah kecepatan dan kemudahan pelaksanaannya. Kekurangan metode ini kurang sensitif karena tidak ada amplifikasi sinyal, tidak dapat untuk mendeteksi beberapa antigen dan antibodi primer banyak terpakai (digunakan dalam konsentrasi tinggi).

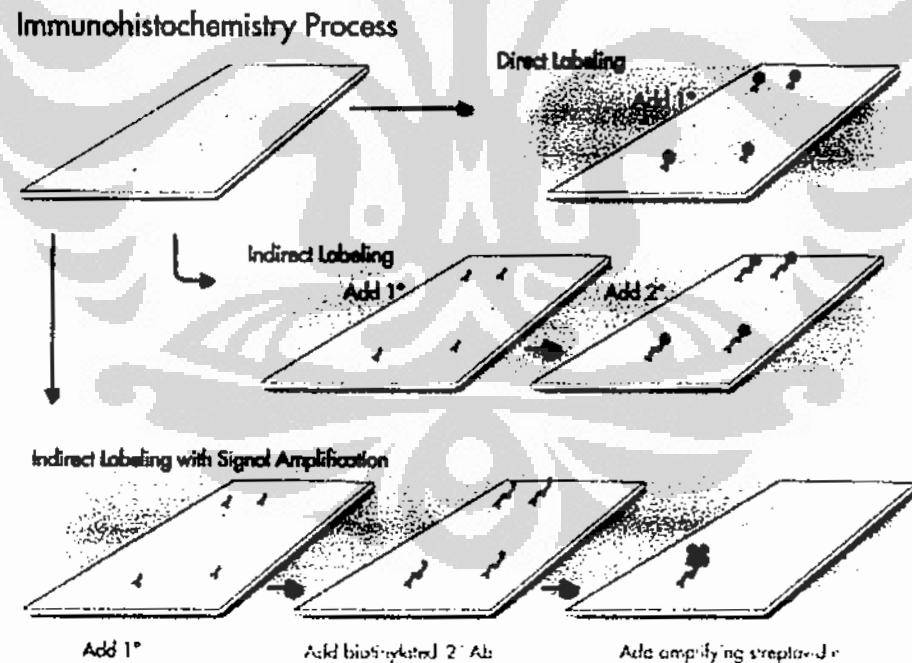
2. *Indirect labeled methods (Sandwich)*

Metode indirek terdiri atas antibodi primer yang tidak dilabel (lapisan pertama) bereaksi dengan antigen di spesimen diikuti penambahan antibodi sekunder yang dikonjugasi label (lapisan kedua). Antibodi sekunder adalah anti-IgG terhadap sumber antibodi primer. Metode ini lebih sensitif karena amplifikasi sinyal terjadi lewat beberapa reaksi antibodi sekunder dengan determinan antigen dari antibodi primer. Selain itu, satu lapisan antibodi sekunder dapat digunakan untuk mendeteksi beberapa antibodi primer (bersumber dari hewan yang sama). Label antibodi sekunder dapat berupa zat fluoresen seperti FITC, rhodamine atau *Texas red* dan teknik ini disebut metode imunofluoresensi. Selain itu, label antibodi sekunder dapat berupa enzim seperti peroksidase, alkalin fosfatase atau glukosa oksidase dan metode ini dikenal sebagai metode imunoenzim. Metode imunoenzim dan imunofluoresensi ada yang langsung mengikat label ke antibodi sekunder dan ada yang mengikat enzim ke kompleks biotin-avidin (ABC) atau biotin-streptavidin (BSA) untuk amplifikasi sinyal.

Kedua metode amplifikasi sinyal ABC dan LSAB (*Labelled StreptAvidin-Biotin*) dipakai dalam penelitian ini.

Metode ABC adalah metode standar dan salah satu metode yang paling sering digunakan dalam imunohistokimia. Avidin, adalah glikoprotein besar yang dilabel dengan peroksidase dan memiliki afinitas sangat tinggi terhadap biotin. Biotin adalah vitamin dengan berat molekul rendah yang dapat dikonjugasi ke berbagai molekul termasuk antibodi sekunder. Metode ABC membentuk tiga lapisan. Lapisan pertama adalah antibodi primer yang tidak dilabel. Lapisan kedua adalah antibodi sekunder yang dilabel biotin. Lapisan terakhir adalah avidin-peroksidase yang kemudian membentuk kompleks dengan biotin dari lapisan kedua. Peroksidase kemudian diperlihatkan dengan substrat kromogen DAB.

Metode LSAB juga membentuk tiga lapisan seperti metode ABC. Perbedaannya terletak pada molekul streptavidin sebagai pengganti avidin. Molekul streptavidin relatif tidak bermuatan dibandingkan avidin yang memiliki titik isoelektrik 10. Hal ini menyebabkan hilangnya ikatan elektrostatik dengan jaringan (mengurangi latar belakang non spesifik). Selain itu, streptavidin tidak berikatan dengan lektin jaringan, ikatan dengan lektin jaringan menimbulkan latar belakang non spesifik.



Gambar 2.6. Proses Imunohistokimia. ⁵⁰

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *comparative cross sectional* dengan membandingkan parameter yang diukur antara ketiga kelompok usia hewan percobaan. Perlakuan pada penelitian ini adalah usia dari kelompok hewan coba: neonatus (1-4 hari), dewasa muda (3-4 bulan) dan dewasa tua (12-16 bulan).

3.2. Tempat Penelitian

Semua hewan coba dikandangkan dalam Animal House FKUI. Pengambilan organ jantung dari hewan coba, pembuatan preparat, pewarnaan HE dan optimalisasi pewarnaan imunohistokimia tenascin C dilakukan di Laboratorium Histologi FKUI. Mikrofotografi, scanning dan penggunaan software Image Analyzer dilakukan di ruang computer dan mikrofotografi histologi FKUI. Pengerjaan imunohistokimia hingga selesai dan dokumentasi digital hasil imunohistokimia dilakukan di Lab Imunopatologi Patologi Anatomi FKUI. Penelitian dilakukan selama 9 bulan, dari tanggal 7 Desember 2007 sampai 24 September 2008 .

3.3. Hewan Percobaan

Subyek penelitian adalah tikus Sprague-Dawley jantan. Penentuan jumlah subyek penelitian menggunakan rumus Federer, yaitu:

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15, \quad t = \text{jumlah perlakuan}, \quad n = \text{jumlah sampel}$$

Penelitian ini memiliki tiga kelompok usia hewan coba (neonatus, dewasa muda dan dewasa), sehingga $t=3$. Maka ,

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

$$(n - 1) \geq 7.5$$

$$n \geq 8.5, \text{ diambil angka } 9.$$

Jumlah subyek penelitian tiap kelompok usia adalah 9 ekor tikus. Total jumlah subyek adalah $9 \times 3 = 27$ ekor tikus. Subyek penelitian diperoleh dari Lab Hewan Coba PuslitBang Biomedis dan Farmasi DepKes RI.



Gambar 3.1. Foto subyek penelitian : tikus neonatus usia 1 hari (kiri) dan dewasa muda usia 3 bulan (kanan).

3.4. Alat dan Bahan

Alat

1. Fasilitas kandang hewan di Animal House
2. Set diseksi mikroanatomi
3. Pinset jaringan
4. Ruang sungkup eter
5. Meja untuk operasi hewan percobaan
6. Kapas
7. Kain Kassa
8. Jarum pentul
9. Pompa siringe untuk fiksasi intravital
10. Wadah untuk fiksasi jaringan jantung
11. Pembakar Bunsen
12. Batang besi bentuk huruf L untuk blok paraffin
13. Mikrotom
14. Kaca Penutup
15. Kaca preparat
16. Mikroskop cahaya
17. Mikroskop foto merek Cannon
18. Film Fuji ASA 100
19. *Moist Chamber*
20. *Staining Jar*
21. *Coplin Jar*

22. Microwave Oven
23. *Plastic slide holder*
24. Mikropipet eppendorf
25. Tip mikropipet
26. Pap Pen Dako
27. Mikroskop foto digital Olympus + DP2BSW

Bahan

1. Es Serut
2. Eter
3. Ketamine (Ketalar®, 1 vial, 10 ml; 100 mg/ml)
4. Fiksatif:neutral buffer formalin
5. Larutan NaCl 0.9%
6. Alkohol : 70%, 80%,90%,95%,100%
7. Benzyl Benzoat
8. Benzol
9. Histoplast
10. Balsam Kanada atau entelan
11. Pewarnaan HE(*Hematoxylin Eosin*)
12. H₂O₂ 30%
13. Methanol
14. Antibodi primer tenascin C : *Goat polyclonal anti-human TN-C sc-9871*(Santa Cruz Biotechnology)
15. *Antibody dilluent with background reducing components S3022* (Dako Cytomation)
16. Kit LSAB k-0679 (Dako Cytomation)
17. *Goat ABC Staining System sc-2023*(Santa Cruz Biotechnology)
18. PBS
19. Tris EDTA
20. *Normal horse serum*

3. 5. Protokol Penelitian

3. 5.1. Protokol Penelitian Tesis

Jumlah subyek penelitian tesis adalah 27 subyek selanjutnya diberi nama subyek 4 sampai subyek 30.

Penelitian tesis dilaksanakan mulai tanggal 9 Desember 2007.

Anestesi tikus percobaan

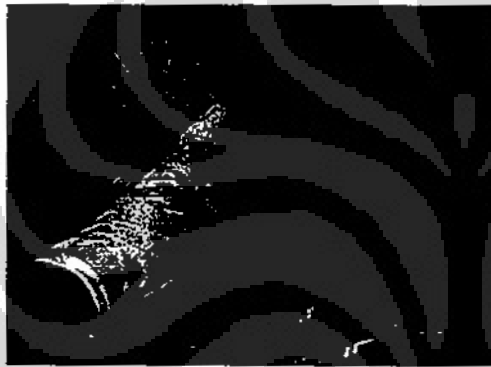
Kesembilan tikus neonatus dianestesi dengan metode hipotermi seperti yang dikerjakan pada percobaan pendahuluan.

Sembilan tikus dewasa muda dan sembilan tikus dewasa dianestesi dengan metode injeksi intraperitoneal ketamine dengan dosis 75 mg/kg berat badan. Perhitungan dosis anestesi untuk kedelapan belas tikus percobaan dapat dilihat di lampiran 3.

Fiksasi Intravital

Setelah tikus tertidur, diletakkan di meja untuk operasi hewan percobaan

Kemudian dilakukan torakotomi dengan insisi kulit, jaringan otot di garis tengah dada dan pemotongan tulang rawan iga (di costosternal joint) bilateral dan pengangkatan sternum.



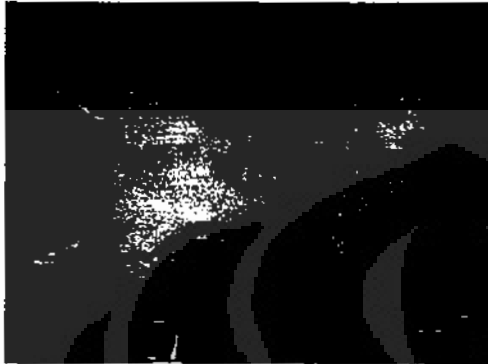
Gambar 3.2. Torakotomi Subyek 16 (dewasa usia 14 bulan)

Setelah rongga dada terbuka, tampak jantung berdenyut. Kemudian diidentifikasi bagian-bagian jantung terutama atrium kanan dan ventrikel jantung. Dilakukan pengguntingan atrium kanan, darah keluar dari atrium kanan. Lalu diinsersikan *wing needle* selang infus dari pompa syringe ke ventrikel jantung (tepatnya di ventrikel kiri jantung) untuk infus cairan fiksatif intravital. Fiksasi *wing needle* di ventrikel kiri. Jantung terus berdenyut normal seiring aliran infus cairan fiksatif.



Gambar 3.3. Inseri dan fiksasi *wing needle* Subyek 22 (dewasa muda usia 4 bulan)

Cairan fiksatif (10% neutral buffer formalin) mengalir dari gelas beker ke mesin pompa menuju jarum yang telah difiksir di ventrikel kiri jantung. Tanda-tanda fiksasi intravital telah merata antara lain : fasikulasi otot-otot ekstremitas tikus, kekakuan kuduk (otot leher belakang) dan kekakuan ekor tikus. Jantung kemudian berhenti berdenyut. Proses ini berlangsung selama 15 sampai 30 menit.

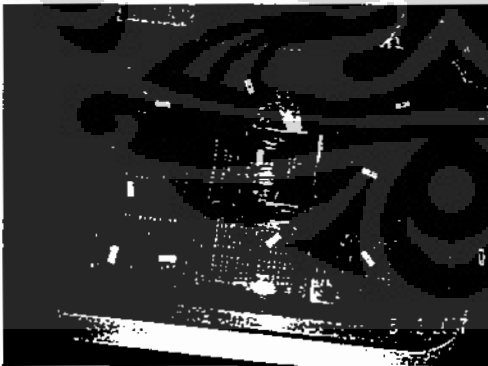


Gambar 3.4. Kekakuan otot pada Subyek 4 (dewasa usia 13 bulan) saat fiksasi intravital.

Prosedur pengambilan Organ Jantung

Setelah fiksasi intravital selesai dilakukan, bekuan darah yang mengisi rongga dada subyek dibilas di bawah kran air mengalir. Kemudian subyek diletakkan kembali ke meja operasi.

Jantung dipisahkan dari jaringan sekitar dan pembuluh darah sehingga terlepas dari rongga dada. Jantung dibelah menjadi 2 bagian yang sama besar (khusus untuk jantung tikus dewasa muda dan dewasa, jantung neonatus ukurannya sudah kecil sehingga tidak perlu dibelah dua) lalu diletakkan dalam wadah berisi 10% neutral buffer formalin diberi label sesuai nomor subyek (S1 sampai dengan S30).



Gambar 3.5. Beberapa wadah berisi organ subyek penelitian dalam larutan fiksatif Didiamkan dalam suhu ruangan selama 24 jam.

Sisa jenazah tikus dikumpulkan dan dimakamkan. Perlengkapan, sisa larutan dan darah kemudian dibereskan.

3.5.2. Pembuatan preparat Histologi

Dehidrasi bertahap dengan menggunakan alkohol dengan konsentrasi yang makin meningkat. Rangkaian penggantian larutan adalah sebagai berikut : Alkohol 70% (1 hari) → alkohol 80% (1 hari) → alkohol 90% (1 hari) → alkohol 95%(1 hari) → alkohol 100% (1 hari) → alkohol 100% (1 hari) → alkohol 100% (1 hari).



Gambar 3.6. Wadah-wadah berlabel S1 sampai S30 berisi organ dalam larutan yang diganti setiap hari.

Tahap berikutnya adalah pembersihan (*Clearing*):

Benzyl benzoat I (24 jam) → Benzyl Benzoat II (2-3 jam) → Benzol-Histoplast di dalam Oven (1/2 -1 jam).



Gambar 3.7. Oven yang digunakan dalam suhu 54-60 °C (kiri). Rak ke-2 oven terdiri atas wadah-wadah dengan benzol-histoplast di dalamnya dengan perbandingan 1:1 (kanan).

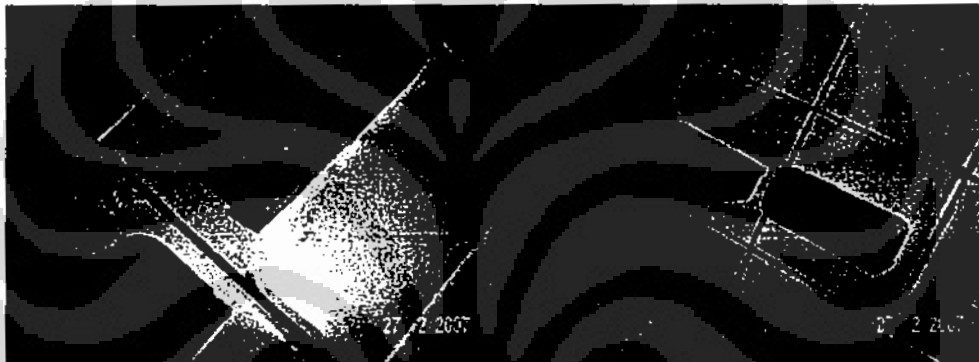
Organ dicelupkan ke dalam wadah berisi benzol-histoplast dan didiamkan dalam oven selama ½ -1 jam.

Selanjutnya dalam tahap pembedahan (*Embedding*) , organ dibenamkan dalam wadah berisi histoplast cair di dalam oven selama 1 – 2 jam. Lihat gambar sebelah kanan, rak ke-3 terdiri atas wadah-wadah berisi histoplast cair di dalamnya.

Pengecoran (*Blocking*) : potongan jaringan diletakkan dalam kubus dari dua besi Leuckheart, dituangkan histoplast cair ke dalam kubus tersebut.



Gambar 3.8. Kubus dari besi Leuckheart (kiri) dan penuangan histoplast cair ke dalamnya (kanan)



Gambar 3.9. Peletakan organ ke dalam cetakan
Hasil adalah blok histoplast dengan potongan jaringan di dalamnya.



Gambar 3.10. Blok histoplast

Time table penggantian larutan sampai pengecoran S1 – S30 dapat dilihat di lampiran 4.

- Pemotongan (*Sectioning*) : Blok dipotong dengan mikrotom, dihasilkan pita-pita histoplast dengan ketebalan 5 μ m.

- Peretakan ke kaca obyek (*Mounting*): di dalam penangas air (*water bath*), dengan sengkeli pita histoplast direkatkan ke kaca obyek. Sediaan siap diwarnai.

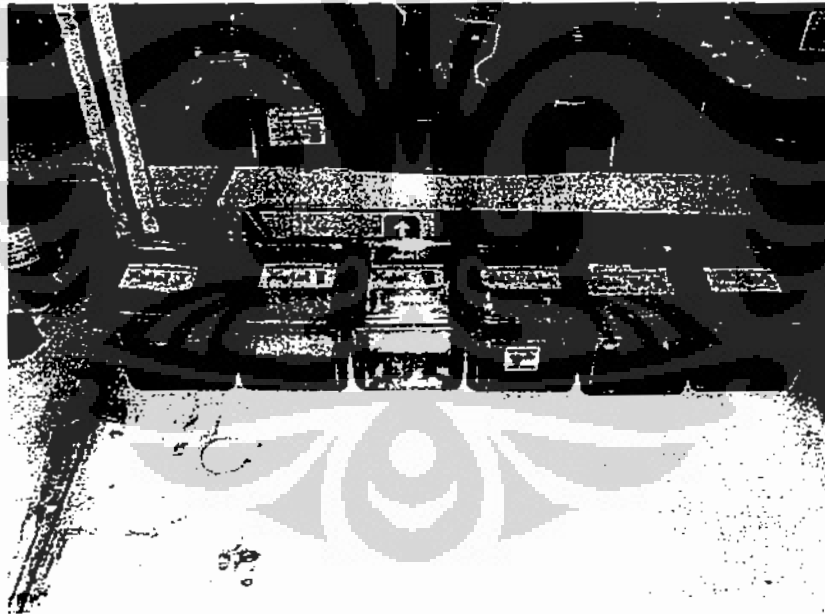
3. 5.3. Pewarnaan HE

Deparafinisasi dalam xylol. Hidrasi dalam larutan alkohol dengan gradasi yang menurun dari 100%-95%-90%-80%-70%. Inkubasi dalam larutan hematoksilin Harris selama 15 min. Bilas dalam air mengalir, celup dalam campuran asam-alkohol secara cepat 3-10 celup. Bilas dalam air mengalir, celup sebanyak 3-5 kali dalam larutan ammonium atau lithium karbonat. Cuci dalam air mengalir selama 10-20 menit. Inkubasi dalam eosin(15 detik-2 menit). Dehidrasi dalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat secara perlahan, masing-masing selama 2 menit. Inkubasi dalam xylol 2x2menit. Tutup dengan kaca penutup.

3. 5.4. Pewarnaan Imunohistokimia Tenascin C

Protokol pewarnaan imunohistokimia yang optimal:

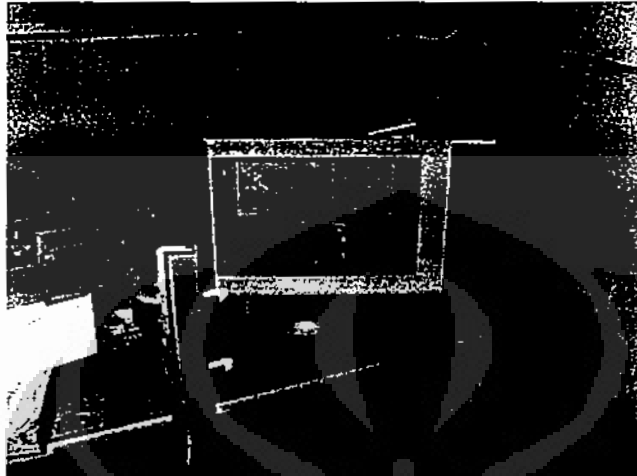
1. Deparafinisasi: xylol I, xylol II, xylol III @5 menit
2. Rehidrasi bertahap: Alkohol absolut 5 menit, Alkohol 96% 5 menit, Alkohol 80% 5 menit



Gambar 3.11. Rangkaian larutan Xylol dan alkohol

3. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit
4. Bloking aktivitas endogen peroksidase menggunakan 0.5% v/v H_2O_2 (3.2 ml H_2O_2 30%) dalam methanol(200 ml) selama 30menit

5. Cuci dengan PBS 2x5 menit
6. Pemulihan epitop antigen (*Antigen Retrieval*) : Slide diletakkan dalam kotak plastik berisi larutan TRIS EDTA dan dipanaskan dalam microwave. Pemanasan pertama : *power level 8* selama 3 menit. Pemanasan kedua: *power level 1* selama 5 menit.



Gambar 3.12. Persiapan pemanasan dengan microwave.

7. Dinginkan dalam suhu ruangan selama 45 menit
8. Cuci dengan PBS sebanyak 2x5 menit
9. Bloking aktivitas non spesifik dengan *normal horse serum* (10% v/v serum dalam PBS) selama 30 menit
10. Antibodi primer diencerkan 1:300 dengan *antibody diluent with background reducing component* (Dako)
11. Inkubasi slide dengan antibodi primer dalam *moist chamber* semalaman pada suhu 4^o C (kulkas).
12. Keesokan harinya, slide dicuci dengan PBS sebanyak 2x5 menit
13. Inkubasi dengan antibodi sekunder *biotinylated donkey anti-goat IgG* (Santa Cruz). Ditetes sampai menutup seluruh spesimen. Inkubasi dalam suhu ruang (dalam *moist chamber*) selama 30 menit



Gambar 3.13. Penetesan antibodi sekunder dengan mikropipet.

14. Cuci dengan PBS sebanyak 2x5 menit
15. Teteskan ABC staining system (Santa Cruz) menutupi spesimen, inkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit.
16. Cuci dengan PBS 2x5 menit
17. Inkubasi dengan substrat peroksidase (1.6ml dH₂O, 5 tetes 10x substrate buffer, 1 tetes 5% DAB, 1 tetes 50x peroxidase substrate) dalam *moist chamber* selama 10 menit.
18. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit
19. *Counterstain* dengan Hematoxylin Lili Mayer selama 2 menit.
20. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat : Alkohol 95% selama 5 menit, alkohol absolute selama 5 menit, alkohol absolute II selama 5 menit
21. Pembeningan dengan Xylol selama 2x5menit
22. Tutup dengan entelan

3.6. Pengumpulan Data

Proses pengumpulan data dikerjakan dalam dua tahap:

Tahap pertama mengambil 4 lapang pandang besar (lpb, pembesaran mikroskop 10x40) dari tiap sediaan jantung (dua di atrium dan dua di ventrikel) yang diwarnai HE. Mikrofotografi dengan mikroskop foto Canon. Seluruh hasil mikrofotografi dimasukkan ke dalam arsip komputer dalam format jpg.

Dengan Digimizer Image Analyzer (versi 3.6.1, Belgium) dinilai :

- Jumlah sel-sel otot jantung. Sel-sel otot jantung terpotong melintang dalam satu mikrofotograf (satu lpb) dihitung dengan sistem *tagging* . Data yang diperoleh berupa data numerik.
- Diameter serat otot jantung. Caranya dengan membuat garis yang melintasi pertengahan sel otot jantung potongan melintang, kemudian Digimizer akan mengukur jarak garis tersebut. Pengukuran diameter serat otot jantung dilakukan dua kali untuk masing-masing mikrofotograf, dan diambil nilai rata-ratanya. Hasil berupa data numerik.

Pengumpulan data tahap I dikerjakan di Laboratorium dan Ruang Komputer Histologi FKUI.



Gambar 3.14. Piranti mikrofotografi di Lab Imunopatologi

Pengumpulan data tahap kedua mengambil 4-6 lapang pandang besar dari tiap sediaan jantung (2-3 lpb yang mewakili atrium dan 2-3 lpb di ventrikel) yang telah diwarnai imunohistokimia tenascin C. Mikrofotografi menggunakan mikroskop foto Olympus yang tersambung langsung ke komputer dan disimpan dalam format tif. dengan software DP2-BSW. Dari foto-foto mikro jantung tikus, dihitung sampai 100 sel otot jantung di atrium dan 100 sel otot jantung di ventrikel. Penilaian untuk masing-masing sel otot jantung adalah sebagai berikut :

- Pola ekspresi tenascin C di sel otot jantung : positif intra sel, positif ekstra sel, positif kombinasi (intra dan ekstra sel) dan negatif. Data yang diperoleh berupa data numerik yakni jumlah sel otot jantung yang positif intra sel, ekstra sel, kombinasi atau negatif.
- Intensitas pewarnaan imunohistokimia tenascin C. Berdasarkan skoring intensitas pewarnaan IHC *World Scoring*; 1 = *weak staining*, 2 = *moderate staining*, 3 = *strong*

staining, 0=negatif. Data yang diperoleh adalah data numerik yakni jumlah sel otot jantung dengan skor intensitas 0, 1, 2, atau 3.

- Perhitungan dilakukan menggunakan *cell counter* dan secara manual. Sel-sel lain yang mengekspresikan tenascin C dideskripsikan morfologi sel dan letaknya.

Pengumpulan data tahap II dilakukan di Lab Imunopatologi Departemen Patologi Anatomi FKUI.

3.7. Analisa Statistik menggunakan SPSS 13 (SPSS Inc, Chicago, IL)

Data yang dikumpulkan berupa data-data numerik. Data-data tersebut diuji homogenitas dan normalitas sebarannya dengan uji Levene dan Kolomogorov-Smirnov. Untuk menilai signifikansi perbedaan data antara kelompok usia (data normal dan homogen) diketahui dengan uji *Anova One-way*. Perbandingan data antar beberapa kelompok usia dianalisis dengan uji LSD. Hubungan antara ekspresi tenascin C dengan jumlah dan diameter sel otot jantung menggunakan uji korelasi bivariat Pearson. Perbedaan secara statistic dianggap signifikan bila interval kepercayaan (*CI/ Confidence Interval*) < 0.05 .

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Fiksasi Intravital

Tabel berikut menjelaskan fiksasi intravital untuk masing-masing subyek.

Tanggal	Subyek nomor	Rincian	Fiksasi intravital (Berhasil/Gagal)	Alasan kegagalan fiksasi
9 Desember 2007	Subyek 4	Dewasa, 13 bulan	Berhasil	-
10 Desember 2007	Subyek 5	Dewasa muda, 4 bulan	Berhasil	-
11 Desember 2007	Subyek 6	Dewasa muda, 4 bulan	Berhasil	-
	Subyek 7	Neonatus, 3 hari	Berhasil	-
	Subyek 8	Neonatus, 4 hari	Berhasil	-
	Subyek 9	Neonatus, 1 hari	Gagal	Kesalahan insersi <i>wing needle</i> , menembus jantung ke subkutis punggung
12 Desember 2007	Subyek 10	Neonatus, 1 hari	Berhasil	-
	Subyek 11	Neonatus, 1 hari	Berhasil	-
	Subyek 12	Neonatus, 1 hari	Berhasil	-
	Subyek 13	Neonatus, 1 hari	Berhasil	-
	Subyek 14	Neonatus, 1 hari	Berhasil	-
	Subyek 15	Neonatus, 1 hari	Berhasil	-
	Subyek 16	Dewasa, 14 bulan	Berhasil	-
13 Desember 2007	Subyek 17	Dewasa, 12 bulan	Berhasil	-
	Subyek 18	Dewasa muda, 4 bulan	Berhasil	-
	Subyek 19	Dewasa muda, 4 bulan	Berhasil	-
	Subyek 20	Dewasa muda, 4 bulan	Berhasil	-
	Subyek 21	Dewasa muda, 3 bulan	Berhasil	-
14 Desember 2007	Subyek 22	Dewasa muda, 4 bulan	Berhasil	-
	Subyek 23	Dewasa muda, 3 bulan	Berhasil	-
	Subyek 24	Dewasa muda, 3 bulan	Berhasil	-
	Subyek 25	Dewasa, 16 bulan	Berhasil	-
15 Desember 2007	Subyek 26	Dewasa, 13 bulan	Berhasil	-
	Subyek 27	Dewasa, 13 bulan	Gagal	Larutan fiksatif sudah lama, dibuat yang baru
16 Desember 2007	Subyek 28	Dewasa, 13 bulan	Berhasil	-
	Subyek 29	Dewasa, 16 bulan	Gagal	Slang infus copot dari mesin pompa
	Subyek 30	Dewasa, 14 bulan	Gagal	Aliran infus dari mesin pompa kurang kuat

Tabel 4.1. Resume Fiksasi Intravital

Tingkat keberhasilan fiksasi intravital dalam penelitian tesis ini adalah

$$23/27 \times 100\% = 85.18 \%$$

Kelebihan metode fiksasi intra vital adalah sebagai berikut: a) fiksasi dimulai sesaat setelah peredaran darah sistemik berhenti, hal ini meminimalisir perubahan struktur sel akibat perubahan pasca kematian, b) dalam keadaan in situ, perfusi lewat pembuluh darah menghasilkan penyebaran cairan fiksatif yang merata ke seluruh jaringan melalui anyaman kapiler, hal ini meningkatkan kedalaman dan laju infiltrasi cairan fiksatif, c) perlakuan yang berakibat kerusakan jaringan setelah peredaran sistemik berhenti dan sebelum difiksasi dapat diminimalisir, hal ini mengurangi jumlah artefak yang terbentuk, d) segenap jaringan dan organ hewan coba difiksasi pada saat yang bersamaan dengan efektif, oleh karenanya seluruh jaringan dan organ hewan tersebut dapat dimanfaatkan secara maksimal dalam penelitian, e) untuk pewarnaan imunohistokimia yang membutuhkan kondisi fiksasi yang menghasilkan artefak autolisis yang sedikit dan translokasi komponen sel yang minimal sehingga imunoreaktivitas jaringan terhadap antibodi primer tetap dipertahankan.⁵²

Penerapan fiksasi intra vital untuk meneliti organ jantung telah banyak dikerjakan, di antaranya dalam penelitian ultra struktur sel-sel nodus sino-atrial jantung,⁵³ penelitian jantung embrio,⁵⁴ morfometri jantung,⁵⁵ patologi katup jantung,⁵⁶ perkembangan endokardium pre-natal,⁵⁷ stres oksidatif pada jantung tikus *knock-out* gen apolipoprotein E,⁵⁸ ekto-5'-nukleotidase yang dihasilkan sel perisit dan fibroblas jantung,⁵⁹ proteksi obat lamipril terhadap nekrosis sel otot jantung,⁶⁰ efek pemberian obat penghambat reseptor endotelin A terhadap remodeling jantung,⁶¹ penebalan dinding arteri dan fibrosis interstisial jantung.⁶²

Penelitian Sukura dan kawan-kawan⁶³ membandingkan perubahan dini autolisis sel otot jantung kelompok tikus yang difiksasi intra vital dan kelompok tikus yang dimatikan secara lege artis kemudian organ jantungnya difiksasi imersi. Perubahan autolisis tampak di sel otot jantung yang difiksasi imersi yakni pemendekan sarkomer, peningkatan kerapatan miofibril, penurunan kadar glikogen, pembengkakan mitokondria. Pita I yang jelas hanya dapat ditemukan di sel otot jantung yang difiksasi intra vital. Ini membuktikan keunggulan metode fiksasi intra vital dibandingkan fiksasi imersi.

Dengan metode fiksasi intra vital dipertahankan kontur internal dan eksternal dinding ventrikel jantung embrio manusia, struktur dan organisasi ruang antar selnya.⁵³ Penelitian lain oleh Schmiedl dan kawan-kawan⁵⁴ membandingkan fiksasi intra vital lewat pembuluh koroner jantung anjing dengan fiksasi imersi. Hasilnya dengan fiksasi intra vital

volume sel otot jantung serupa dengan keadaan hidup, banyak sarkomer dalam keadaan istirahat, dan mitokondria tidak membengkak sehingga struktur sel otot jantung paling terjaga kondisinya untuk analisis lanjutan.

Kesalahan yang terjadi dalam prosedur intra vital penelitian ini diantaranya adalah: a) jarum perfusi menembus jantung, b) larutan fiksatif yang sudah lama, c) slang infus copot dari mesin pompa, d) aliran infus dari mesin pompa kurang kuat. Kesalahan yang bersumber dari operator diatasi dengan latihan dan seringnya melakukan prosedur fiksasi intra vital. Kesalahan yang timbul akibat laju aliran infus cairan fiksatif dari mesin pompa dapat diminimalisir. Penelitian Smolich dan kawan-kawan⁶⁴ menggunakan alat pengontrol tekanan mesin pompa. Rostgard dan kawan-kawan⁶⁵ menggunakan transduser tekanan yang memonitor tekanan dalam ventrikel kiri jantung dan menyampaikan umpan balik ke mesin pompa.

4.2. Gambaran Histologi Jantung ketiga kelompok usia

Hasil mikrofotografi sajian mikroskopik (pewarnaan Hematoxylin Eosin) memberikan gambaran histomorfometri jantung. Dari 27 subyek yang dapat dianalisis 24 jantung. Kedua puluh empat sediaan jantung tersebut terdiri atas 6 jantung neonatus, 9 jantung dewasa muda dan 9 jantung dewasa.

Gambaran histologi jantung tikus SD neonatus memperlihatkan tiga lapisan jantung yakni endokardium (dilapisi endotel), miokardium yang langsung berbatasan dengan endokardium (tanpa subendokardium) dan epikardium (subepikardium belum berkembang). Sel-sel otot jantung di lapisan miokardium memiliki inti berukuran besar di tengah, ruang kitar inti belum ada, diskus interkalaris ada namun sulit dibedakan dengan gurat lintang sel, jarak antar inti sel berdekatan.

Gambaran histologi jantung tikus SD dewasa muda serupa dengan gambaran jantung tikus SD dewasa. Dinding jantung terdiri atas tiga lapisan: endokardium, miokardium, dan epikardium. Selain itu di bawah endokardium terdapat lapisan subendokardium yang di daerah ventrikel terisi oleh serat Purkinje (modifikasi sel otot jantung yang berfungsi menghantarkan impuls listrik). Antara miokardium dan epikardium terdapat lapisan subepikardium yang disusun oleh jaringan ikat longgar dan pembuluh darah koroner. Sel-sel otot jantung tikus SD dewasa muda dan dewasa berbeda dalam jumlah dan diameter sel. Morfologi sel otot jantung tikus SD dewasa muda dan dewasa

serupa. Dengan inti sel di tengah, dikelilingi ruang kitar inti, diskus interkalaris yang jelas, dan jarak antar inti sel yang berjauhan.



Gambar 4.1. Potongan memanjang otot jantung tikus. Dari atas ke bawah: jantung tikus neonatus, dewasa muda dan dewasa (Pembesaran 400x)

Penelitian Nguyen dkk⁶⁶ perubahan struktur jantung akibat penuaan diteliti menggunakan model tikus *Fischer 344 - Brown Norway hybrid*. Pemeriksaan *ultrasound* pada dinding ventrikel kiri jantung usia 6, 18 dan 24 bulan untuk menilai kekakuan dinding jantung, selain itu dengan analisis histologi dinilai kandungan kolagen di matriks ekstra sel jantung. Terjadi peningkatan kekakuan dinding jantung dan kandungan kolagen di jantung yang mengalami penuaan. Penelitian lain oleh Hacker dkk⁶⁷ menggunakan tikus F344 berusia 12, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 dan 39 bulan. Perubahan terjadi pada matriks ekstra sel jantung yakni peningkatan fibrosis interstisial. Terjadi peningkatan persentase jaringan ventrikel kiri jantung yang mengalami fibrosis seiring bertambahnya usia. Fibrosis lebih sering ditemukan di lapisan endokardium dibandingkan epikardium.

Percobaan Linn tahun 2008⁶⁸ menunjukkan penurunan ketebalan dinding ventrikel kiri jantung mencit tua dibandingkan dengan mencit dewasa, fibrosis interstisial tampak seperti titik-titik namun jumlahnya meningkat dua kali dibandingkan jantung dewasa.

Hasil penelitian ini menampilkan gambaran histologi jantung tikus neonatus (usia 1-4 hari), dewasa muda (usia 3-4 bulan) dan dewasa (usia 12-16 bulan) dengan pewarnaan rutin (Hematoxylin-Eosin). Lapisan subendokardium dan subepikardium tidak ditemukan di jantung neonatus. Hal ini menunjukkan belum berkembang sempurna seluruh lapisan jantung neonatus. Di ventrikel jantung dewasa muda dan dewasa lapisan subendokardium terdiri atas sel-sel purkinje yang berfungsi khusus untuk hantar rangsang jantung. Struktur sel-sel purkinje tidak ditemukan di jantung neonatus, nampaknya proses hantar rangsang listrik di jantung neonatus terjadi antar sel karena jarak antara dua sel otot jantung yang dipisahkan diskus interkalaris sangat berdekatan (dinilai dari jarak dua inti sel yang berdekatan). Lapisan subepikardium jantung dewasa muda dan dewasa mengandung jaringan lemak putih (sel-sel lemak univakuolar), hal ini tidak ditemukan di jantung neonatus karena cadangan lemak neonatus terlokalisir di jaringan lemak coklat (sel-sel lemak multivakuolar).

Tidak dilakukan pengukuran ketebalan dinding jantung seperti penelitian-penelitian yang disebutkan di atas. Untuk mengetahui peningkatan kandungan kolagen dari gambaran histologi perlu dilakukan pewarnaan khusus terhadap serat kolagen seperti pewarnaan trikrom, pada pewarnaan trikrom serat kolagen akan tampak berwarna biru. Dengan pewarnaan HE akan sulit membedakan komponen serat dalam matriks ekstra sel yang terletak di ruang antar sel otot jantung.

Ruang antar sel otot jantung dari seluruh gambaran histologi jantung di penelitian ini tidak memperlihatkan adanya matriks ekstra sel. Inti sel fibroblas dan sel darah dapat terlihat di ruang ekstra sel namun substansi dasar dan serat-serat sebagai komponen matriks ekstra sel yang merupakan latar belakang ruang ekstra sel tampak kosong. Hal ini disebabkan hilangnya komponen matriks ekstra sel saat pembuatan sediaan histologi jantung. Schmiedl dan kawan-kawan⁶⁹ menggunakan metode penjepitan silang aorta, pembuatan kondisi iskemia jantung dalam suhu 5⁰C selama 10 menit saat fiksasi intra vital dan potong beku untuk mempertahankan integritas area interstisium (ruang antar sel-sel otot jantung).

4.3. Perbedaan Jumlah sel Otot Jantung per lapang pandang besar (lpb) di ketiga kelompok usia

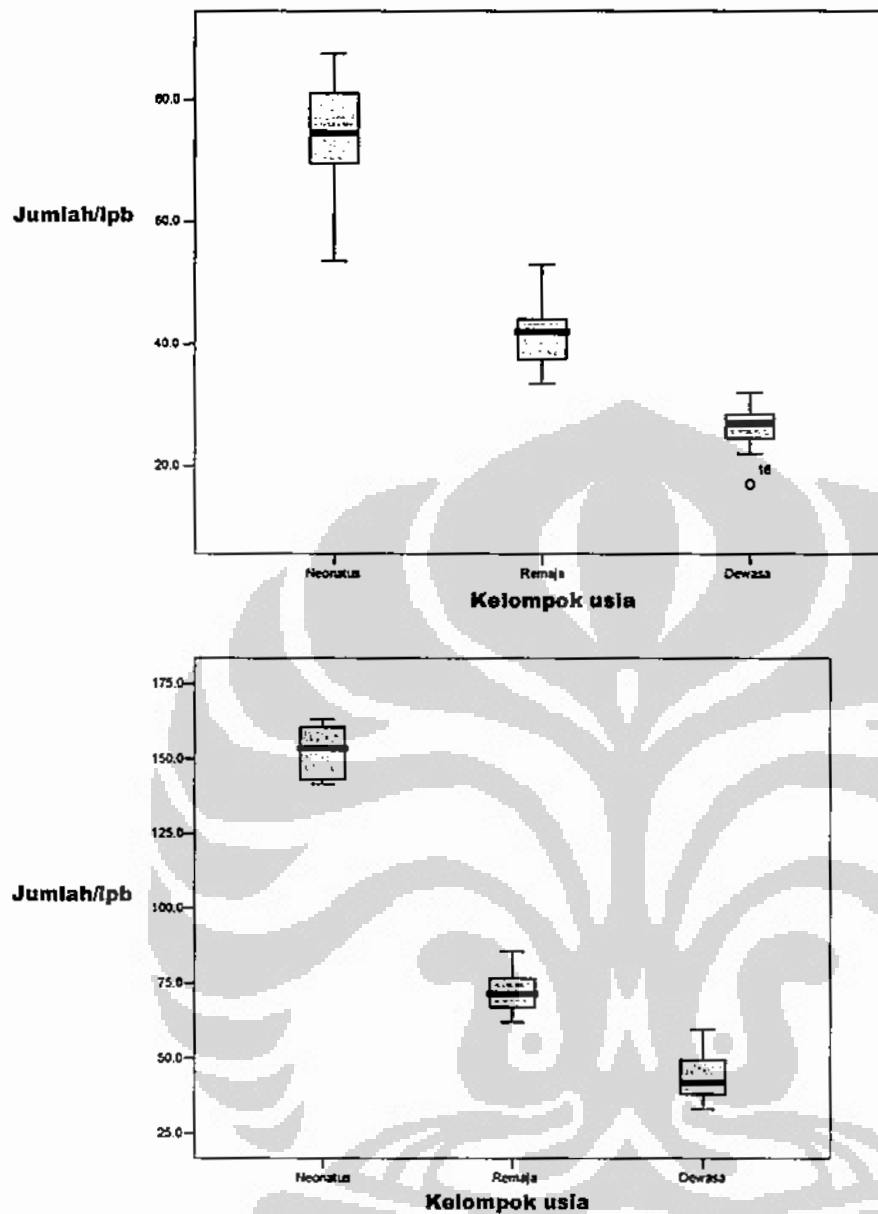
Uji normalitas data (*One-Sample K-S*) menunjukkan data jumlah sel otot jantung atrium dan ventrikel pada ketiga kelompok usia terdistribusi normal. Uji homogenitas data menunjukkan data pada ketiga kelompok usia adalah homogen. Uji statistik yang dipilih untuk menilai perbedaan jumlah sel otot jantung atrium dan ventrikel pada ketiga kelompok usia tersebut signifikan atau tidak adalah One-Way Anova.

Hasilnya adalah perbedaan jumlah sel otot jantung atrium dan ventrikel antar kelompok sangat signifikan (tabel analisis statistik di Lampiran 5). Hal ini berarti jumlah sel otot jantung atrium dan ventrikel per lpb di kelompok neonatus, dewasa muda dan dewasa berbeda bermakna.

Jumlah sel otot jantung atrium dan ventrikel per lpb paling banyak di kelompok usia neonatus, jumlahnya menurun di kelompok usia dewasa muda dan mengalami penurunan yang sangat signifikan setelah dewasa. Jumlah sel otot jantung per lpb terbesar di kelompok neonatus (Atrium= 73.4±4.87; Ventrikel= 152.5±3.6) dan paling sedikit di kelompok dewasa (Atrium= 26±1.5; Ventrikel= 43.7±2.8).

Analisis perbandingan (*multiple comparison*) dengan LSD menunjukkan perbedaan antar kelompok usia satu dengan yang lain. Semuanya menunjukkan perbedaan yang bermakna (lihat lampiran 5).

Perbedaan jumlah sel otot jantung per lpb ketiga kelompok usia dapat dilihat dari grafik di halaman berikut.



Grafik 4.1. Jumlah sel otot jantung per lpb di ketiga kelompok usia. Grafik atas menggambarkan jumlah sel otot jantung atrium dan grafik bawah menggambarkan jumlah sel otot jantung ventrikel

Perubahan jumlah sel otot jantung baik di atrium maupun ventrikel jantung memiliki pola sebagai berikut ; paling banyak jumlahnya pada saat baru lahir, berkurang saat tumbuh menjadi dewasa muda dan menurun signifikan setelah dewasa. Hasil ini memberikan kesan terjadinya proses degenerasi, seiring dengan pertambahan usia jumlah

sel semakin berkurang. Namun interpretasi hasil jumlah sel/lpb ini perlu dicermati, karena perhitungan jumlah sel/lpb mewakili lapang pandang yang dianalisis. Belum dapat mewakili jumlah sel otot jantung untuk seluruh jantung.

Hasil penelitian ini selaras dengan hasil penelitian Linn dkk⁶⁸ tahun 2008 yang menemukan sarkopenia sel otot jantung akibat penuaan. Morfometri jantung diikuti dengan model matematika untuk pengukuran struktur dan faal jantung. Jumlah sel otot jantung mencit senilis berkurang dibandingkan dengan jumlah sel otot jantung mencit dewasa. Penurunan jumlah sel otot jantung diikuti dengan penambahan fibrosis interstisium.

Mekanisme berkurangnya jumlah sel otot jantung akibat penuaan adalah apoptosis dan atau nekrosis.⁶⁷ Nekrosis diikuti reaksi inflamasi yang ditandai oleh infiltrasi makrofag, aktivasi fibroblas dan terbentuknya jaringan parut. Disfungsi mitokondria dapat menginisiasi jalur apoptosis mitokondria. Mutasi DNA mitokondria menumpuk dengan bertambahnya usia. Dan mutasi tersebut mengaktifasi apoptosis sel otot jantung tikus.⁶⁷

Hasil penelitian ini juga menunjukkan jumlah sel otot jantung ventrikel per lpb melebihi jumlah sel otot jantung per lpb atrium. Hasil ini juga diungkapkan Cardoso dkk⁷⁰ yang melakukan morfometri miokardium jantung manusia diambil post-mortem (usia 67 - 78 tahun). Ditemukan bahwa jumlah sel otot jantung per unit volume jantung lebih rendah di atrium dibandingkan ventrikel.

Untuk mengetahui jumlah sel otot jantung di seluruh jantung perlu dilakukan morfometri miokardium jantung. Sulit untuk membandingkan data morfometri jantung yang dikerjakan peneliti-peneliti yang belum terstandarisasi. Terdapat lebih dari 100 parameter morfometri jantung, namun hanya dua sampai tiga parameter yang benar-benar bermakna. Persyaratan utama adalah penentuan besar koefisien melisutnya jaringan akibat proses pembuatan sediaan histologi. Selain itu, belum ada kesepakatan tentang pengukuran volume sel otot jantung, rasio inti-sitoplasma sel pada potongan melintang dan membandingkan parameter ke masing-masing unit potongan sediaan merupakan pelanggaran aturan stereometri.⁷¹

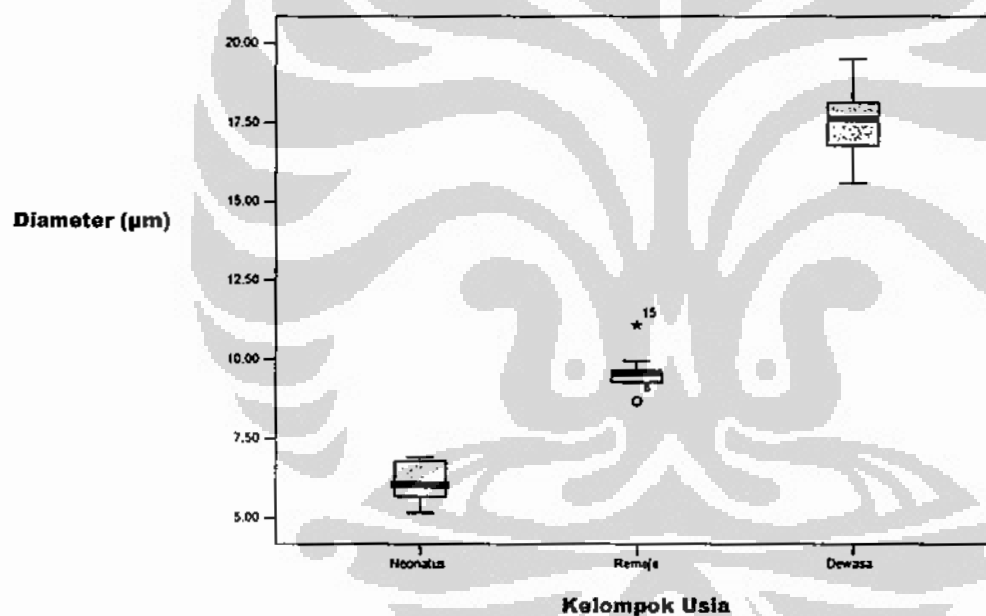
Hasil penelitian Linzbach dkk¹⁹ menemukan penambahan jumlah sel otot jantung pada proses penuaan. Hal ini disebabkan morfometri Linzbach belum sesuai standar. Linzbach mendapatkan jumlah sel otot jantung dari hasil pembagian volume makroskopik jantung dengan volume satu sel otot jantung (diukur diameter sel dan jarak antar dua diskus interkalaris).

Morfometri jantung yang terkini menggunakan mikroskop diseksi dengan mikrometer okuler tersambung ke program komputasi khusus,⁷² mikroskop multi-foton yang dilengkapi dengan alat pemotongan jaringan otomatis,⁷³ kisi-kisi mikroskopik khusus⁷⁴. Keterbatasan alat menjadi keterbatasan teknik morfometri penelitian ini.

4.4. Perbedaan Diameter Sel Otot Jantung antara ketiga kelompok usia

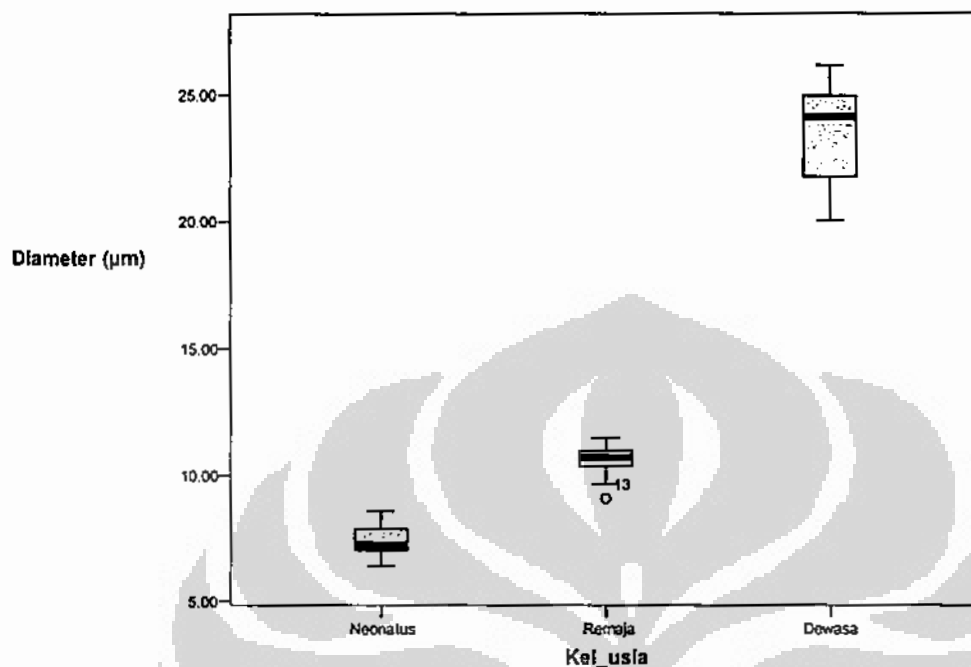
Uji normalitas dan homogenitas data menunjukkan distribusi normal dan data diameter sel otot jantung atrium dan ventrikel ketiga kelompok usia homogen. Hasil Uji Anova adalah perbedaan diameter sel otot jantung atrium dan ventrikel antar kelompok sangat signifikan (tabel analisis statistik di Lampiran 5). Analisis perbandingan (*multiple comparison*) dengan LSD menunjukkan perbedaan antar kelompok usia satu dengan yang lain. Semuanya menunjukkan perbedaan yang bermakna (lihat lampiran 5).

Hasil pengukuran diameter sel otot jantung di atrium jantung ketiga kelompok usia adalah sebagai berikut



Grafik 4.2. Diameter sel otot jantung atrium di ketiga kelompok usia

Perbedaan diameter sel otot jantung di ventrikel ketiga kelompok usia dapat dilihat dari grafik di bawah ini :



Grafik 4.3 Perbandingan Diameter sel otot jantung ventrikel

Diameter sel otot jantung terkecil di kelompok neonatus (Atrium= $6.1\mu\text{m}\pm 0.28$; Ventrikel= $7.39\mu\text{m}\pm 0.3$) dan paling besar di kelompok dewasa (Atrium= $17.42\mu\text{m}\pm 0.42$; Ventrikel= $23.44\mu\text{m}\pm 0.74$).

Perubahan diameter sel otot jantung baik di atrium maupun ventrikel menggambarkan proses hipertrofi sel otot jantung. Sel otot jantung tikus neonatus berukuran kecil (diameter paling kecil dibandingkan dua kelompok usia lainnya) karena masih imatur. Sel otot jantung dewasa muda adalah sel otot jantung pada masa pertumbuhan dan perkembangan, memiliki diameter yang lebih besar dari sel otot jantung baru lahir namun lebih kecil dari sel otot jantung dewasa. Sel otot jantung dewasa sudah mengalami maturasi lengkap sehingga diameternya paling besar di antara ketiga kelompok usia.

Hipertrofi sel otot jantung merupakan ciri dari jantung yang mengalami proses penuaan dibuktikan oleh Hacker dkk⁶⁶ dan Nguyen dkk.⁶⁵

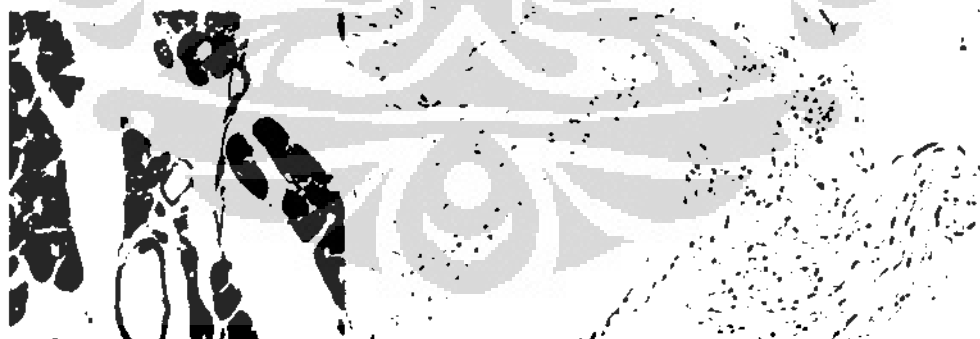
4.5. Ekspresi Tenascin C di Jantung Tikus Neonatus, Dewasa muda dan Dewasa



Gambar 4.2. Jantung Neonatus. Dari kiri ke kanan : Pewarnaan HE, Kontrol Negatif dan Immunohistokimia Tenascin C



Gambar 4.3. Jantung Dewasa muda. Dari kiri ke kanan: Pewarnaan HE, kontrol negatif dan imunohistokimia Tenascin C



Gambar 4.4. Jantung Dewasa. Dari kiri ke kanan: Pewarnaan HE, kontrol negatif dan imunohistokimia Tenascin C

Ekspresi tenascin C dari hasil penelitian ini ditemukan di sel otot jantung tikus neonatus, dewasa muda dan dewasa dengan pola ekspresi dan intensitas pewarnaan yang berbeda. Ballard dkk menemukan ekspresi tenascin C di jantung tikus neonatus dengan pewarnaan imunohistokimia.¹⁵ Sato I dan Shimada K menemukan ekspresi tenascin C yang tinggi di korda tendinae penghubung katup anterior dan m. Papilare ventrikel kiri jantung manusia tua (usia 80-90 tahun) yang diambil post-mortem dan dianalisis menggunakan mikroskop konfokal *laser scanning*.⁷⁵

Ekspresi tenascin C di jantung dewasa muncul kembali pada keadaan patologis. Imunohistokimia tenascin C di jaringan hasil biopsi endokardium jantung pasien kardiomiopati dilatasi menunjukkan perimisium dan endomisium sel otot jantung yang membesar positif terwarnai tenascin C, dan di sepanjang jaringan parut.⁸¹ Imanaka-Yoshida dkk menemukan tenascin C di fibroblas interstisial di zona perbatasan infark miokard dan setelah penyembuhan ditemukan di ekstra sel otot jantung yang tersisa.¹⁴

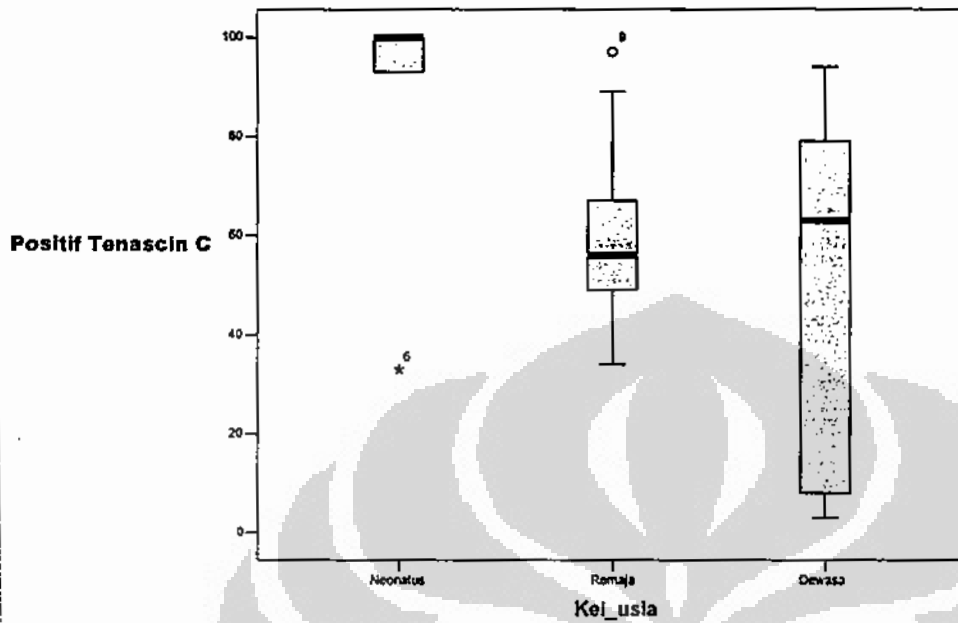
Hasil penelitian ini menunjukkan sel otot jantung di miokardium dewasa muda dan dewasa normal positif untuk pewarnaan tenascin C. Perbedaan hasil ini disebabkan oleh pemilihan antibodi primer tenascin C. Antibodi primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah *goat polyclonal anti-human tenascin C* pada N terminus(sc-9871) untuk pewarnaan imunofloresen. Sedangkan penelitian sebelumnya memakai anti-tenascin c yang secara spesifik mengenali domain *conserved fibronectin type III (FNIII)-like repeats* dan domain *the fibrinogen (Fbg)-like*⁴⁴. Kemungkinan reaksi silang antara antibodi primer yang dipakai dalam penelitian ini dengan epitop jaringan yang memiliki kemiripan belum dapat dihindarkan. Perlu dipertimbangkan untuk pemakaian antibodi primer yang spesifik untuk domain di atas dan khusus untuk imunohistokimia blok parafin.

Pola ekspresi tenascin C secara imunohistokimia memberikan gambaran proses sintesis dan transpor protein tenascin C di sel otot jantung. Ekspresi tenascin C di intra sel (sitoplasmik) sel otot jantung menandakan tenascin C disintesis di sel otot jantung. Ekspresi tenascin C di ekstra sel (membran sel otot jantung) menandakan transpor protein tenascin C dari sel otot jantung ke matriks ekstra sel jantung. Ekspresi tenascin C di intra dan ekstra sel otot jantung menandakan sel otot jantung tersebut aktif mensintesis dan mentranspor tenascin C ke matriks ekstra sel otot jantung.

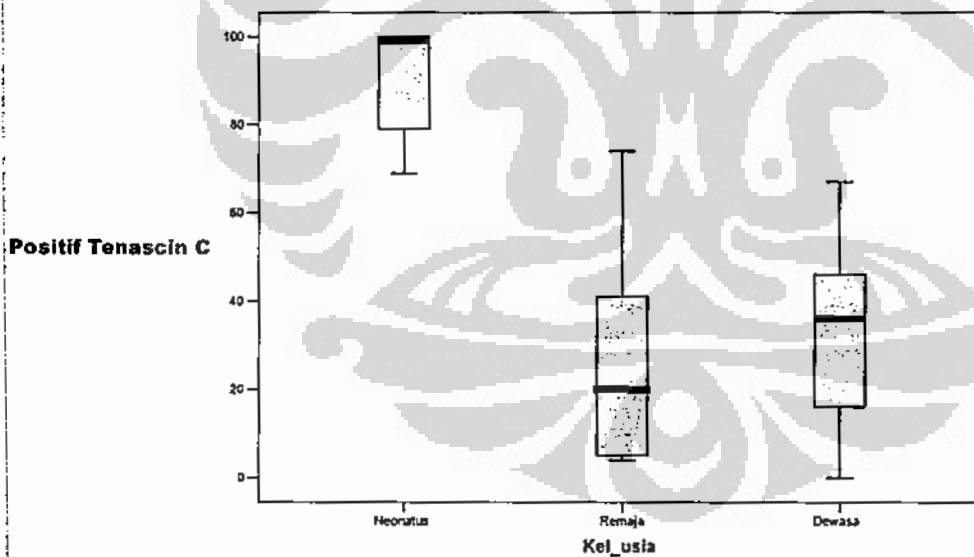


Gambar 4.5. Pola ekspresi tenascin C. Dari atas ke bawah: intra sel, ekstra sel dan kombinasi (ekstra dan intra sel)

Hasil perhitungan dari 100 sel di atrium dan 100 sel di ventrikel jantung tikus neonatus, dewasa muda dan dewasa adalah sebagai berikut :

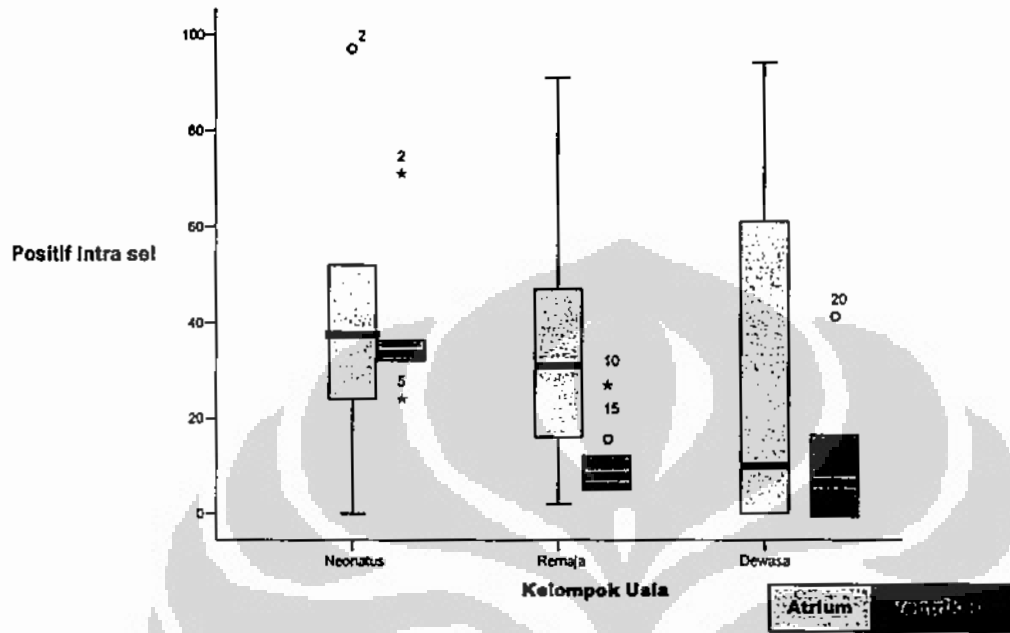


Grafik 4.4. Kisaran jumlah sel otot jantung atrium yang positif tenascin C berdasarkan kelompok usia

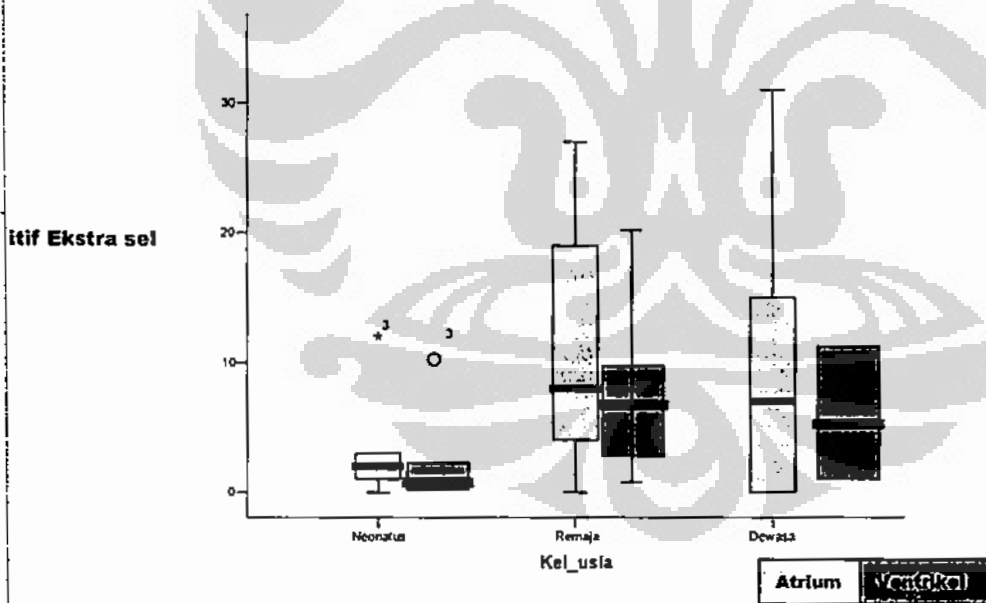


Grafik 4.5. Kisaran jumlah sel otot jantung ventrikel yang positif tenascin C berdasarkan kelompok usia

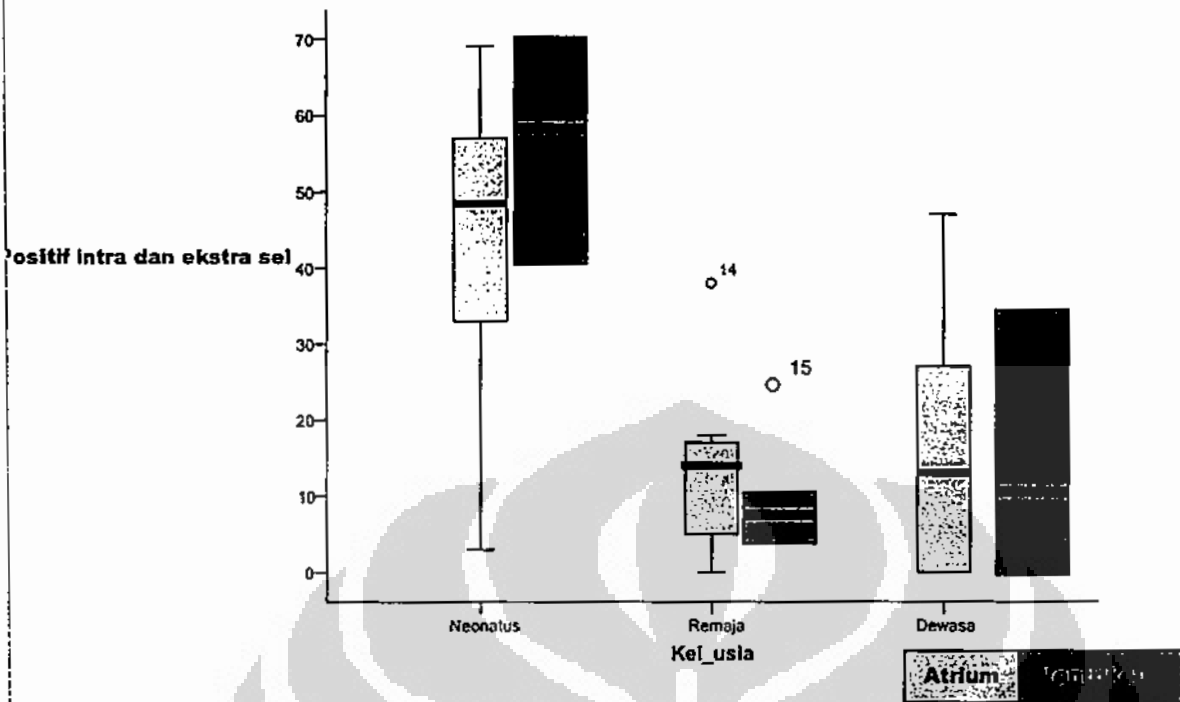
Hasil positif tenascin C dibagi lagi berdasarkan pola ekspresinya menjadi positif intra sel, positif ekstra sel dan kombinasi. Berikut adalah grafik kisaran jumlah sel otot jantung berdasarkan pola ekspresi tenascin C.



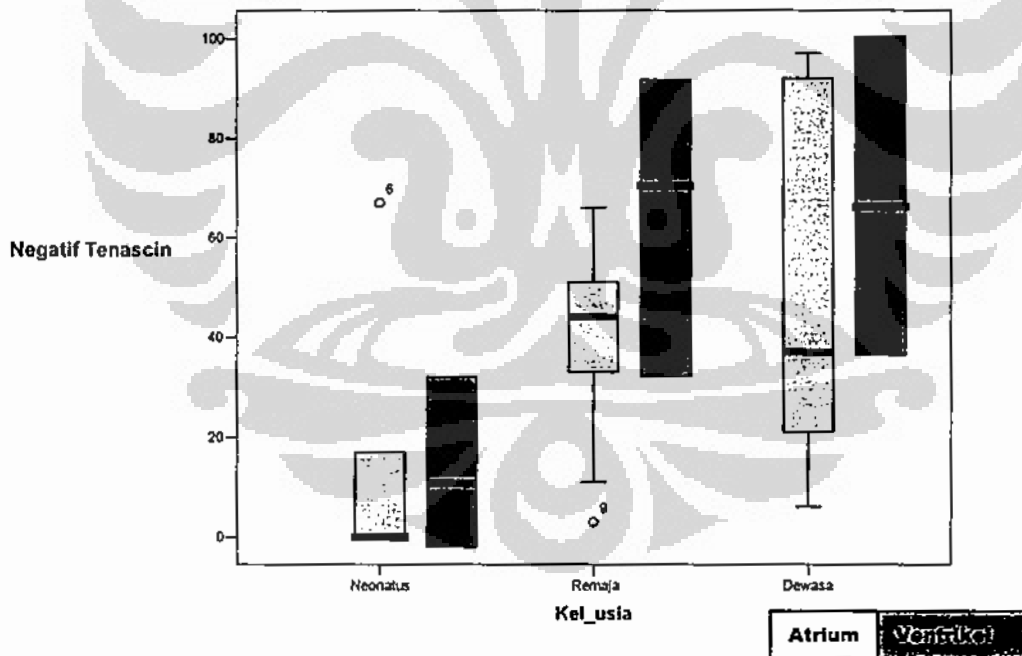
Grafik 4.7. Kisaran jumlah sel otot jantung dengan ekspresi tenascin C intra sel berdasarkan kelompok usia



Grafik 4.8. Kisaran jumlah sel otot jantung dengan ekspresi tenascin C ekstra sel berdasarkan kelompok usia



Grafik 4.8. Kisaran jumlah sel otot jantung dengan ekspresi tenascin C di intra dan ekstra sel atrium jantung berdasarkan kelompok usia



Grafik 4.9. Kisaran jumlah sel otot jantung negatif ekspresi tenascin C di jantung berdasarkan kelompok usia

Ekspresi tenascin C ditemukan pada jantung tikus neonatus, dewasa muda dan dewasa. Pola ekspresi tenascin C yang sering ditemukan di kelompok neonatus adalah pola kombinasi (Atrium= 43.17 ± 9.4 , Ventrikel= 56.83 ± 8.5) dan pola intra sel (Atrium= 41.33 ± 13.4 ; Ventrikel= 33.67 ± 6.7). Pola ekspresi tenascin C ekstra sel lebih sering ditemukan di kelompok dewasa muda (Atrium= 11.56 ± 3.2 ; Ventrikel= 12.11 ± 7.4) dan dewasa (Atrium= 9.22 ± 3.5 ; Ventrikel= 11.67 ± 3.9) dibandingkan kelompok neonatus (Atrium= 3.33 ± 1.8 ; Ventrikel= 2.5 ± 1.4). Ekspresi tenascin C negatif paling sering ditemukan di ventrikel jantung dewasa muda (74.44 ± 8.2) dan dewasa (67.33 ± 7.6).

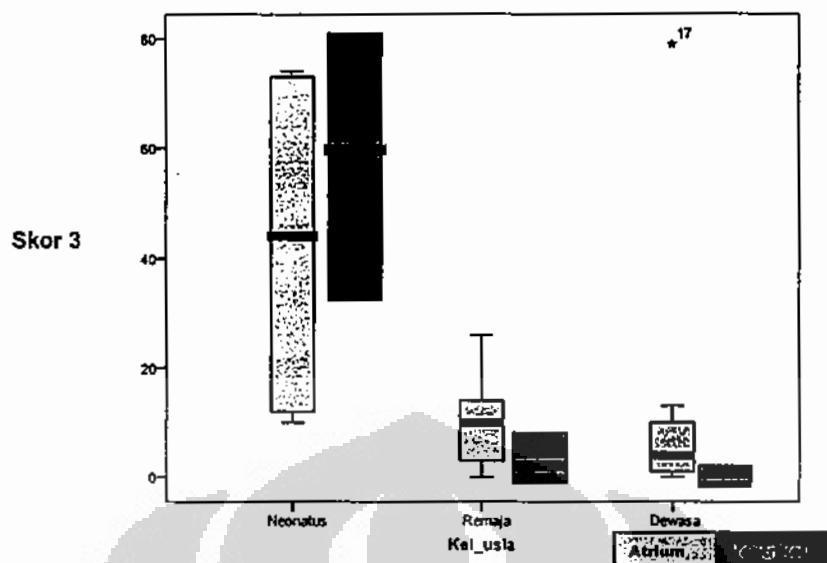
Uji normalitas dan homogenitas data menunjukkan distribusi normal dan data ketiga kelompok usia homogen. Untuk melihat apakah perbedaan jumlah sel otot yang positif mengekspresikan tenascin C di atrium dan ventrikel jantung antara ketiga kelompok usia bermakna atau tidak dilakukan uji Anova. Analisis perbandingan (*multiple comparison*) dengan LSD menunjukkan perbedaan antar kelompok usia satu dengan yang lain. Secara statistik, perbedaan jumlah sel otot jantung yang positif mengekspresikan tenascin C di atrium jantung kelompok neonatus dan dewasa muda tidak berbeda bermakna. Namun, antara kelompok neonatus dan dewasa, perbedaan positività tenascin C di atrium berbeda bermakna. Perbedaan positività tenascin C di ventrikel jantung ketiga kelompok usia berbeda bermakna.

Penilaian intensitas pewarnaan imunohistokimia berdasarkan sistem skoring. Berikut adalah skor intensitas pewarnaan tenascin C.

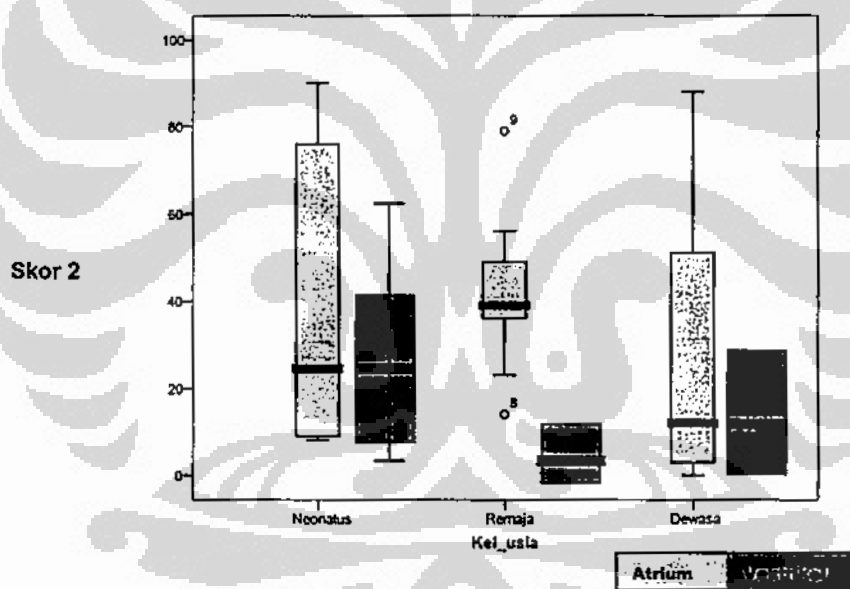


Gambar 4.6. Skoring intensitas pewarnaan imunohistokimia tenascin C.

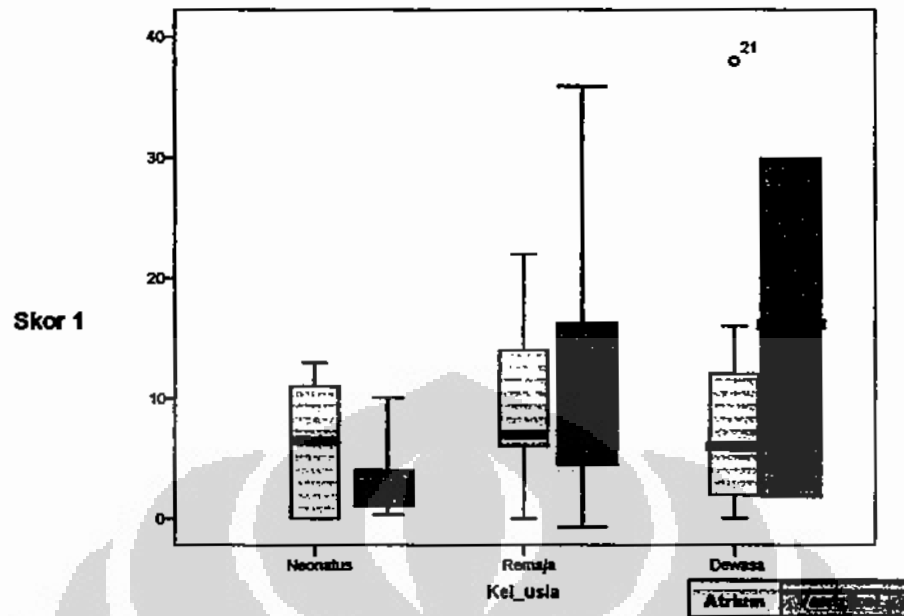
Berdasarkan skor intensitas, maka positività tenascin C di atrium dan ventrikel jantung dibagi menjadi 3 tingkat intensitas, yakni skor 1 (terwarnai lemah), skor 2 (terwarnai sedang) dan skor 3 (terwarnai kuat). Hasil perhitungan jumlah sel otot jantung yang positif mengekspresikan tenascin C di ketiga kelompok usia berdasarkan skor intensitas tergambar dalam 3 grafik berikut.



Grafik 4.10. Kisaran jumlah sel otot jantung dengan skor intensitas 3 berdasarkan kelompok usia



Grafik 4.11. Kisaran jumlah sel otot jantung dengan skor intensitas 2 berdasarkan kelompok usia



Grafik 4.12. Kisaran jumlah sel otot jantung dengan skor intensitas 1 berdasarkan kelompok usia.

Intensitas pewarnaan tenascin C kuat (skor 3) paling sering ditemukan di kelompok neonatus (Atrium = 42.83 ± 13.6 ; Ventrikel = 59.33 ± 9). Skor 1 paling sering ditemukan di ventrikel jantung kelompok dewasa (16.11 ± 5.3).

Secara statistik, perbedaan intensitas pewarnaan tenascin C skor 3 di atrium maupun ventrikel jantung ketiga kelompok usia berbeda bermakna. Namun, perbedaan untuk skor 2 dan skor 1 antara ketiga kelompok usia tidak berbeda bermakna.

Berdasarkan penelitian Fluck²¹ dan kawan-kawan, pemberian beban mekanik dapat menginduksi ekspresi tenascin C di otot rangka. Sintesis protein tenascin C berlangsung di dalam sel (intra sel), kemudian protein tenascin C ditranspor ke luar sel.

Otot jantung dapat dianalogikan dengan otot rangka. Oleh karenanya, lokasi ekspresi tenascin C secara imunohistokimia menggambarkan keberadaan molekul tenascin C di dalam sel (intra sel) saat disintesis dalam sel otot jantung dan di luar sel (ekstra sel) otot jantung saat aktif bekerja sebagai protein matriks ekstra sel. Lokasi ekspresi tenascin C kombinasi (intra dan ekstra sel) menggambarkan keadaan sel otot jantung yang aktif mensintesis dan mentranspor tenascin C ke matriks ekstra sel.

Dari penelitian ini diketahui bahwa ekspresi kombinasi dan intra sel lebih banyak ditemukan pada jantung neonatus, sedangkan ekspresi ekstra sel lebih banyak ditemukan

pada jantung dewasa muda dan dewasa. Diduga bahwa jantung neonatus aktif mensintesis tenascin C dan sebagian ditranspor ke matriks ekstra sel, namun lebih banyak yang disimpan di dalam sel otot jantung. Sedangkan pada jantung dewasa muda dan dewasa diduga kebutuhan akan tenascin C untuk remodeling dan regenerasi jantung meningkat sehingga tenascin C lebih banyak yang ditranspor ke matriks ekstra sel. Dugaan lainnya adalah pada jantung dewasa muda dan dewasa, sel yang lebih aktif mensintesis tenascin C adalah sel miofibroblas. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini bahwa sel otot jantung dewasa muda dan dewasa lebih banyak yang negatif mengekspresikan tenascin C.

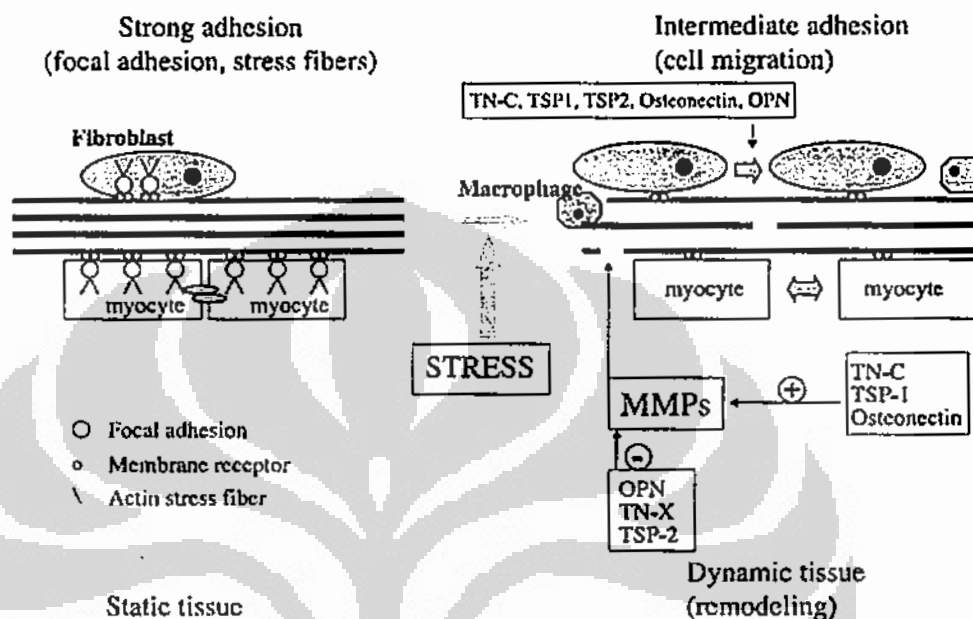
Hipertrofi jantung berkaitan dengan remodeling jantung oleh fibroblas yang melibatkan berubahnya susunan sel-sel dan matriks ekstra sel untuk membentuk geometri baru. Volume ventrikel kiri dan beban tekanan berlebih menimbulkan ekspresi dengan pola berbeda saat remodeling matriks ekstra sel, menandakan umpan balik ketika sel yang mendeteksi stres mekanik melalui interaksi integrin- matriks ekstra sel merespon dengan pola ekspresi gen spesifik. Kemudian dilanjutkan remodeling matriks ekstra sel yang memenuhi kebutuhan mekanik jantung. Stres mekanik dapat mengatur produksi protein matriks ekstra sel secara tidak langsung melalui rangsangan pelepasan faktor parakrin (*growth factor*) atau secara langsung dengan membangkitkan jalur intra sel yang mengaktifkan transkripsi gen.

Ekspresi sebagian besar komponen matriks ekstra sel dikontrol secara tidak langsung oleh stress mekanik. Terdapat bukti bahwa produksi tenascin C dan kolagen XII di bawah kendali stres mekanik (Chiquet et al., 1996; Chiquet, 1999; Chiquet et al., 2003). Respon terhadap perubahan regangan sel terjadi sangat cepat dan bersifat reversibel, hal ini dapat dilihat dari kadar mRNA yang mengkode protein-protein ini. Gen tenascin C mengandung promotor yang memiliki daerah "*stretch-responsive*" *enhancer* mirip sekali dengan elemen responsif terhadap stres tarikan.⁸²

Tarikan mekanik menginduksi tenascin C di sel otot jantung melalui mekanisme NF- κ B-*dependent* dan angiotensin II-*independent* (Yamamoto et al., 1999). Tenascin C memfasilitasi remodeling ventrikel dengan melonggarkan sel otot jantung dari perlekatan ke protein matriks ekstra sel sehingga terjadi perubahan struktur filament adesi fokal dan sitoskeleton (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000).⁸²

Sebuah skema hipotesis menunjukkan kemungkinan peran protein matriks ekstra sel dalam remodeling ventrikel kiri jantung. Ekspresi protein matriks ekstra sel meningkat sebagai respon terhadap stres.

M.W.M. Schellings et al. / Cardiovascular Research 64 (2004) 24-31

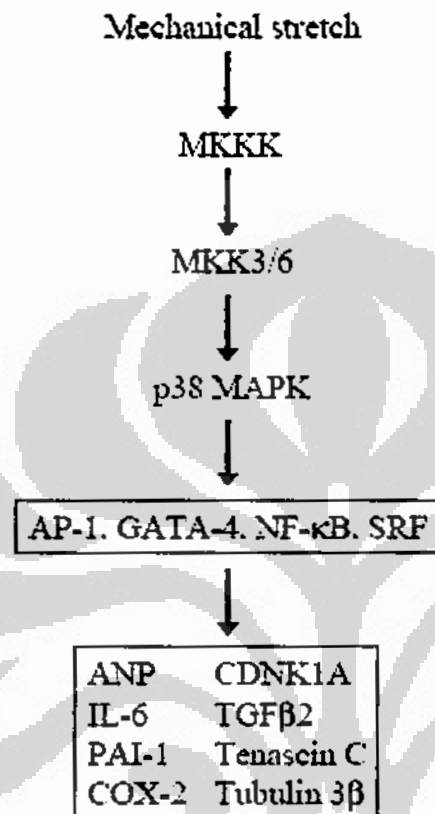


Gambar 4.7. Skema hipotesis peran tenascin C dalam remodeling jantung⁸³

Peningkatan ekspresi tenascin C karena stres menyebabkan perlekatan sel otot jantung dan fibroblas ke matriks ekstra sel lepas, ditandai dengan hilangnya kompleks adesi/ perlekatan fokal sehingga sel-sel otot jantung dan fibroblas bebas bermigrasi. Selain itu, peningkatan ekspresi TN-C juga meningkatkan MMP yang mencerna protein matriks ekstra sel sehingga terdapat lebih banyak ruang untuk perpindahan atau migrasi sel-sel otot jantung dan fibroblas.

Bagaimana mekanisme transduksi sinyal dari stres mekanik ke dalam sel otot jantung dan atau fibroblas sehingga terjadi peningkatan ekspresi tenascin C oleh kedua sel tersebut dan ditranspor ke matriks ekstra sel? Penelitian Yamamoto⁸⁴ menunjukkan siklus jantung menyebabkan aktivasi mekanik p44/42 MAPK dan MEK1/2, ekspresi gen termasuk tenascin C, dan sintesis protein, hal ini menandakan mekanotransduksi terjadi di tingkat sel akibat perbedaan tekanan dan beban volume jantung. Ekspresi tenascin-C meningkat lebih dari tiga kali lipat pada fase sistolik dibandingkan fase diastolik.

Hasil penelitian Rysa⁸⁵ tahun 2008 menunjukkan regangan mekanik pada sel otot jantung mengaktifkan ekspresi gen tenascin C via p38 MAPK. Skema di halaman berikut menjelaskan proses tersebut.



Gambar 4.8. Skema aktivasi gen tenascin C di sel otot jantung.

Penelitian tesis ini belum sampai pada tingkat molekuler ekspresi tenascin C. Penelitian lanjutan dengan model hewan *knock-out* gen TN-C diperlukan untuk mengetahui peran TN-C di remodeling matriks ekstra sel setelah cedera jantung dan di bawah pengaruh stres mekanik lainnya.

Selain itu, perlu diidentifikasi sel di interstitium jantung yang aktif mengekspresikan tenascin C, yang diduga sel tersebut adalah miofibroblas. Miofibroblas adalah fibroblas yang teraktifkan oleh sitokin inflamasi atau faktor parakrin yang dihasilkan oleh sel otot jantung. Hubungan antara sel otot jantung dan fibroblast jantung lebih dari sekedar hubungan anatomi yakni terdapat kompleks taut antar sel berupa taut salur antara sel otot jantung dan fibroblast. Taut salur tersebut dapat menghantarkan

rangsang listrik dari sel otot jantung ke fibroblas sehingga berkembang dugaan bahwa terdapat hubungan fisiologis antara sel otot jantung dan fibroblas.⁸⁶



Gambar 4.9. Sel interstisial yang aktif mensintesis tenascin C

4.6. Hubungan Antara Ekspresi Tenascin C dengan Histomorfometri Jantung (Jumlah dan Diameter sel otot Jantung)

Dilakukan analisis korelasi bivariat antara jumlah sel otot jantung yang positif berekspresi tenascin C dengan jumlah dan diameter sel otot jantung :

		Jml Atr	Diameter Atr	Jumlah Vetr	Diameter Vetr
Positif Intra sel Atrium	Pearson Correlation	.061	-.141		
	Sig. (2-tailed)	.778	.512		
Positif kombinasi Atrium	Pearson Correlation	.485(*)	-.331		
	Sig. (2-tailed)	.016	.114		
Positif ekstra sel Atrium	Pearson Correlation	-.184	.099		
	Sig. (2-tailed)	.389	.644		
Positif Intra sel Ventrikel	Pearson Correlation			.634(**)	-.408(*)
	Sig. (2-tailed)			.001	.048
Positif kombinasi Ventrikel	Pearson Correlation			.744(**)	-.456(*)
	Sig. (2-tailed)			.000	.025
Positif ekstra sel Ventrikel	Pearson Correlation			-.203	.157
	Sig. (2-tailed)			.341	.465

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabel 4.2. Korelasi Bivariat Pola ekspresi Tenascin C dengan Morfometri Sel otot jantung

		Jml Atr	DiamAtr	Jml Vetr	DiamVetr
Skor 3 Atrium	Pearson Correlation	.433(*)		-.305	
	Sig. (2-tailed)	.035		.148	
Skor 2 Atrium	Pearson Correlation	.020		-.140	
	Sig. (2-tailed)	.926		.513	
Skor 1 Atrium	Pearson Correlation	-.172		.138	
	Sig. (2-tailed)	.422		.519	
Skor 3 Ventrikel	Pearson Correlation			.873(**)	-.615(**)
	Sig. (2-tailed)			.000	.001
Skor 2 Ventrikel	Pearson Correlation			.351	-.181
	Sig. (2-tailed)			.093	.396
Skor 1 Ventrikel	Pearson Correlation			-.352	.343
	Sig. (2-tailed)			.092	.100

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabel 4.3. Korelasi Bivariat Intensitas Pewarnaan Tenascin C dengan Morfometri Sel otot jantung

Dari analisis korelasi bivariat Pearson ditemukan korelasi positif yang bermakna antara pola ekspresi tenascin C kombinasi di atrium dengan jumlah sel otot jantung atrium ($p=0.016$); pola ekspresi tenascin C intra sel di ventrikel dengan jumlah sel otot jantung ventrikel ($p=0.01$) dan pola ekspresi kombinasi di ventrikel dengan jumlah ($p=0.00$) dan diameter sel otot jantung ventrikel ($p=0.026$). Ditemukan pula korelasi positif yang bermakna antara skor 3 intensitas pewarnaan tenascin C di atrium dengan jumlah sel otot jantung atrium ($p=0.035$); skor 3 di ventrikel dengan jumlah sel otot jantung ventrikel ($p=0.00$). Korelasi negatif yang bermakna ditemukan antara skor 3 di ventrikel dengan diameter sel otot jantung ventrikel ($p=0.001$).

Aplikasi klinis tenascin C saat ini adalah sebagai penanda remodeling dalam beberapa keadaan patologi jantung. Peningkatan tenascin C di serum pasien infark miokard diukur dengan kit ELISA merupakan faktor prediksi penting remodeling ventrikel kiri jantung dan prognosis pasca infark.⁷⁶ Peningkatan kadar tenascin C di serum pasien kardiomiopati dilatasi diukur dengan kit ELISA mengindikasikan tingkat keparahan gagal jantung, disfungsi ventrikel kiri dan remodeling jantung.⁷⁷ Tenascin C di serum juga dapat menilai hasil terapi endotelin pasca infark.⁷⁸

Stenosis katup aorta menunjukkan peningkatan imunoreaktivitas tenascin C dibandingkan katup normal lewat teknik hibridisasi in situ fluoresen.⁷⁹ Peningkatan

imunoreaktivitas terhadap tenascin C di jaringan hasil biopsi pasien miokarditis akut berkorelasi dengan derajat kerusakan jaringan.⁸⁰

Penelitian ini membuktikan penurunan ekspresi tenascin C baik dalam jumlah sel otot jantung yang positif tenascin C maupun intensitas pewarnaan tenascin C seiring dengan pertambahan usia jantung. Dan terdapat perbedaan pola ekspresi tenascin C di jantung neonatus, dewasa muda dan dewasa. Diketahui pula korelasi antara ekspresi tenascin C dengan jumlah sel otot jantung. Dugaan bahwa penambahan tenascin C eksogen dapat digunakan sebagai agen anti penuaan (apoptosis) sel otot jantung.

Pemanfaatan tenascin C sebagai penanda lingkungan mikro sel stem jantung sampai saat ini masih dalam tatanan ide. Karena daerah matriks ekstra sel tidak tervisualisasi dari seluruh sajian histologi jantung dalam penelitian ini. Ekspresi tenascin C yang semestinya terletak di matriks ekstra sel jantung, terlihat di dalam dan di luar sel otot jantung dalam penelitian tesis ini. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengetahui apakah benar terdapat sel stem jantung di daerah yang terwarnai secara imunohistokimia dengan tenascin C.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari analisis hasil dan diskusi dalam penelitian ini dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

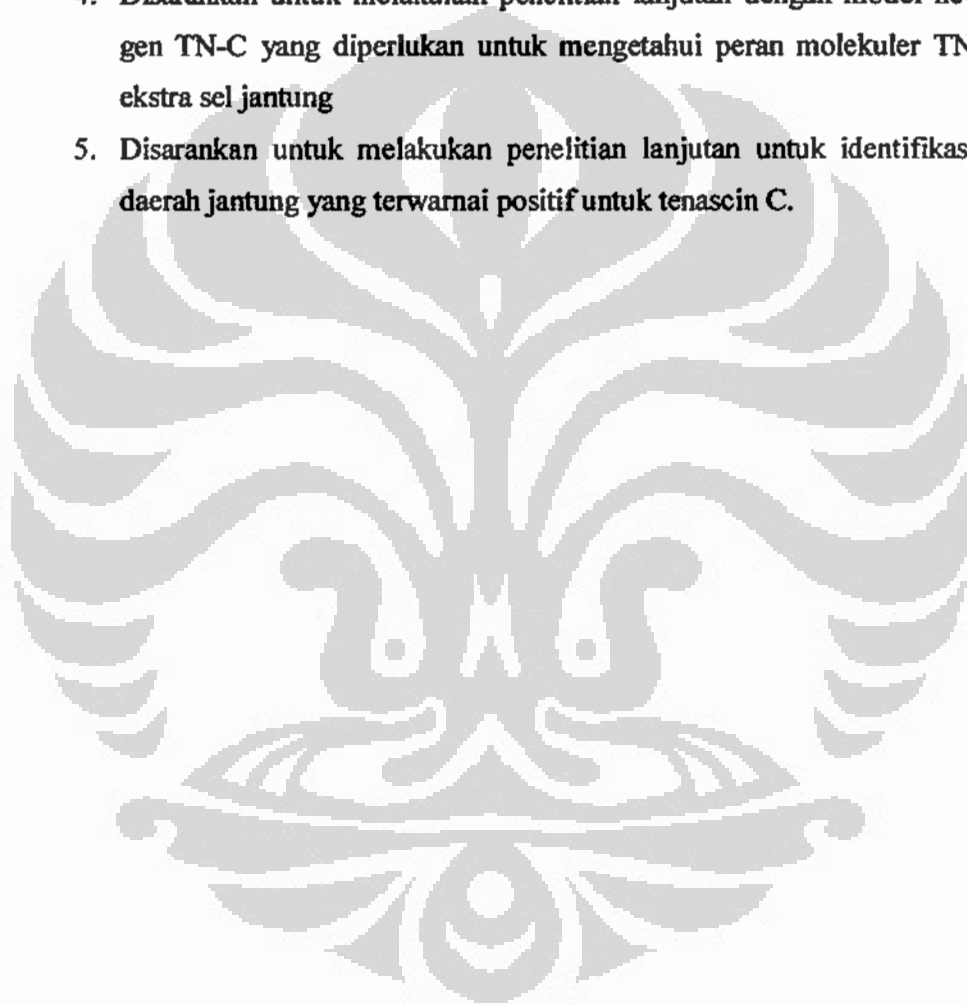
1. Dengan bertambahnya usia jantung maka:
 - jumlah sel otot jantung per lpb mengalami perubahan dengan jumlah terbesar di jantung neonatus dan terkecil di kelompok dewasa
 - diameter sel otot jantung mengalami perubahan dengan diameter paling kecil di jantung neonatus dan paling besar di kelompok dewasa.
2. Ekspresi tenascin C ditemukan pada jantung tikus neonatus, dewasa muda dan dewasa.
3. Dengan bertambahnya usia jantung maka ditemukan:
 - Penurunan jumlah sel otot jantung yang positif tenascin C
 - Perbedaan pola ekspresi tenascin C: pola intra sel dan kombinasi lebih sering ditemukan di jantung neonatus, pola ekstra sel lebih sering ditemukan di jantung dewasa
 - Penurunan jumlah sel dengan skor intensitas 3
4. Korelasi positif yang bermakna ditemukan antara ekspresi tenascin C di intra dan ekstra sel otot jantung atrium dengan jumlah sel otot jantung atrium; ekspresi tenascin C di intra sel dan kombinasi (intra dan ekstra sel) otot jantung ventrikel dengan jumlah dan diameter sel otot jantung ventrikel. Korelasi positif yang bermakna ditemukan antara intensitas pewarnaan tenascin C skor 3 di atrium dengan jumlah sel otot jantung atrium; skor 3 di ventrikel dengan jumlah sel otot jantung ventrikel.
5. Korelasi negatif yang bermakna ditemukan antara skor 3 di ventrikel dengan diameter sel otot jantung ventrikel.

5.2. Saran

Penelitian ini merupakan penelitian awal dalam khasanah penelitian bidang *stem cell niche* di Indonesia. Oleh karena itu penelitian lanjutan di kemudian hari sangat disarankan.

Untuk itu terdapat beberapa saran.

1. Disarankan untuk memperhatikan proses pembuatan sediaan jantung agar semaksimal mungkin dapat memvisualisasikan matriks ekstra sel jantung.
2. Disarankan untuk memilih teknik morfometri standar dalam menghitung jumlah sel otot jantung keseluruhan.
3. Disarankan dalam pemilihan antibodi primer anti-tenascin C untuk domain spesifik regio *FN-III repeats* dan *Fbg-like*, serta memperhatikan pemakaian untuk pewarnaan imunohistokimia dari blok parafin.
4. Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan dengan model hewan *knock-out* gen TN-C yang diperlukan untuk mengetahui peran molekuler TN-C di matriks ekstra sel jantung
5. Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan untuk identifikasi *stem cell* di daerah jantung yang terwarnai positif untuk tenascin C.



DAFTAR PUSTAKA

1. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1373-1416
2. Anversa P, Leri A, Rota M, et al. Concise Review: Stem Cells, Myocardial Regeneration, and Methodological Artifacts. *Stem Cells.* 2007; 25(3): 589-601
3. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol.* 2004; 265: 262-275
4. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344:1750-7
5. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002; 106: 1913-1918
6. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002; 106: 3009-3017.
7. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004; 95: 742-748.
8. Anversa P, Rota M, Urbanek K, Hosoda T, Sonnenblick EH, Leri A, Kajstura J, Bolli R. Myocardial aging—a stem cell problem. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100: 482-493
9. Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1865-1877

10. Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T, Edelberg JM. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res.* 2004; 94: e39–e45
11. Ballard VLT, Edelberg JM. Stem Cells and the Regeneration of the Aging Cardiovascular System. *Circulation Research.* 2007;100:1116
12. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol.* 2004 Apr;19(2):517-25.[Abstract]
13. Yanagisawa M, Yu RK. The Expression and Functions of Glycoconjugates in Neural Stem Cells. *Glycobiology.* 2007
14. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest.* 2001; 81: 1015–1024
15. Ballard VL, Sharma A, Duignan I, Holm JM, Chin A, Choi R, Hajjar KA, Wong SC, Edelberg JM. Vascular tenascin-C regulates cardiac endothelial phenotype and neovascularization. *FASEB J.* 2006; 20: 717–719.
16. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology.* 3rd Ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. p175-179, 267-269
17. Fawcett DW. *Bloom and Fawcett A Textbook of Histology.* 12th Ed. New York: Chapman & Hall. 1994. p 294-304
18. Rubart M, Field LJ. Cardiac regeneration: Repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* 2006;68:29–49
19. Linzbach AJ. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 1960;5:370–382
20. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998;83:1–14
21. Olivetti G, Cigola E, Maestri R et al. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;29:1463–1477.

22. Anversa P, Kajstura J, Leri A et al. Life and death of cardiac stem cells. A paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006;113:1451–1463
23. Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, et al. Stem Cells, Myocardial Regeneration, and Methodological Artifacts. *Stem Cells*. 2007; 25(3): 589-601
24. Von Harsdorf Rüdiger. Can cardiomyocytes divide? *Heart* 2001;86:481–482
25. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, and Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1750–1757
26. Kajstura J, Leri A, Finato N et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:8801–8805
27. Anversa P and Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002; 415: 240–243
28. Anversa P, Leri A, Kajstura J, and Nadal-Ginard B. Myocyte growth and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 91–105
29. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, and Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763–776
30. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, and Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*. 2002; 530: 239–243
31. Tjonnsjorð GE, Steen R, Veiby OP, Morkid L, Egeland T. Haemopoietic progenitor cell differentiation: flow cytometric assessment in bone marrow and thymus. *Br J Haematol*. 1995; 91: 1006-1016
32. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Beltrami AP, Bussani R, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *PNAS*. 2005; 102: 8692-8697
33. Urbanek K, Cesseli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, et al. Stem cell niches in the adult mouse heart. *PNAS*. 2006 June 13; 103(24): 9226-9231

34. Jones FS, Jones PL. The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling. *Developmental Dynamics*. 2000; 218:235–259
35. Tenascin-C as an indicator of tissue reactions. On the pathogenesis of shoulder impingement syndrome. 2003 Oulu University Library
36. NCBI Entrez Gene. TNC tenascin C (hexabrachion) [*Homo sapiens*]. Gene ID : 3371
37. Galoian KA, Garamszegi N, Garamszegi SP, Scully SP. Molecular Mechanism of Tenascin-C Action on Matrix Metalloproteinase-1 Invasive Potential *Experimental Biology and Medicine* 232:515-522 (2007)
38. Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K, Hara M, Sakakura T, Yoshida T. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation*. 2003 Jun;71(4-5):291-8
39. Miyagawa-Tomita S, Nakagawa M, Sugimura H, Nakazawa M, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may regulate behavior of proepicardial organ-derived cells. *Cardiovascular Development Conference 2005*
40. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundation of cardiac repair. *J. Clin. Invest.* (2005)115:572-583
41. Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Bin Tsukada, et al. Higher Serum Tenascin-C Levels Reflect the Severity of Heart Failure, Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *CIRCJ*. 2007; 71(3): 327-330
42. Jinnin M, Ihn H, Asano Y, Yamane K, Trojanowska M, Tamaki K. Platelet derived growth factor induced tenascin-C transcription is phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and mediated by Ets family transcription factors. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206(3):718-27.
43. Midwood KS, Schwarzbauer JE. Tenascin-C Modulates Matrix Contraction via Focal Adhesion Kinase- and Rho-mediated Signaling Pathways. *Molecular Biology of the Cell*. October 2002, 13(10): 3601-3613
44. Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, et al. Tenascin-C Regulates Recruitment of Myofibroblasts during Tissue Repair after Myocardial Injury. *Am J Pathol*. 2005 July; 167(1): 71–80

45. Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of Tenascin-C in Cardiac Myocytes by Mechanical Deformation ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES. *J Biol Chem*. July 30, 1999, 274(31): 21840-21846
46. Restoring Vascular Function US Patent no 20060172943. Edelberg, Jay (New York, NY, US).Ballard, Victoria (New York, NY, US)
47. -----, Sprague Dawley Rats. Diunduh dan diterjemahkan dari <http://www.wikipedia.com>
48. -----, Rat Anatomy-Head, Thoracic and Abdominal. Diunduh dari <http://www.biolabcorner.utoronto.html>
49. -----, How old is a rat in human years? Tabel diterjemahkan dan dimodifikasi dari <http://www.ratbehavior.org>
50. -----, Immunohistochemistry Process. Diunduh dari <http://www.millipore.com>
51. Fluck M, Tunc-Civelec V, Chiquet M. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *Journal of Cell Science*. 2000; 113: 3583-3591
52. Goble T. Protocol for Whole Animal/ Isolated Organ Vascular Perfusion Fixation (of rats/mice)Advantages. Diunduh dari <http://www.abcam.com/technical>
53. Stoletzki S, Schmiedl A, Richter J. Intercalated Clear Cells or Pale Cells in the Sinus Node of Canine Hearts? An Ultrastructural Study. *THE ANATOMICAL RECORD*. 2000; 260:33-41
54. Moscoso G, Pexieder T. Variations in microscopic anatomy and ultrastructure of human embryonic hearts subjected to three different modes of fixation. *Pathol Res Pract*. 1990;186(6):768-74
55. Schmiedl A, Schnabel PA, Richter J, Mall G; Bretschneider H J. Preservation of cardiac myocytes subjected to different preconditions: a comparative morphometric study of beating, fibrillating, and cardioplegically arrested canine hearts. *The Anatomical record* 1993;235(3):425-35.
56. Thomas AC, Davies MJ. The demonstration of cardiac pathology using perfusion-fixation. *Histopathology*. 1985 ;9(1):5-19

57. Pexieder T. Prenatal development of the endocardium: a review. *Scan Electron Microsc.* 1981;(Pt 2):223-53
58. Grzegorz P, Nadezda K, Gross ML, Geldyyev A, Ritz E. Oxidative stress after uninephrectomy alters heart morphology in the apolipoprotein E *-/-* mouse. *Journal of Hypertension.* 2008; 26(11):2220-2229
59. Mlodzik K, Loffing J, Le Hir M, Kaissling B. Ecto-5'-nucleotidase is expressed by pericytes and fibroblasts in the rat heart. *Histochem Cell Biol.* 1995;103(3):227-36
60. Amann K, Tyralla K, Gross ML, Schwarz U, Tornig J, Stefan CH, Ritz E, Mall G. Cardiomyocyte loss in experimental renal failure: Prevention by ramipril. *Kidney International.* 2003; 63: 1708–1713
61. Orth SR, Schielle G, Banas B, Ritz E, Amann K. Effect of a Selective Endothelin Receptor A Blocker on Cardiovascular Remodeling in Uninephrectomized Spontaneously Hypertensive Rats of the Stroke-Prone Strain. *Kidney Blood Press Res* 2007;30:400–407
62. Tornig JT, Amann K, Ritz E, Nichols C, Zeier M, Mall G. Arteriolar Wall Thickening, Capillary Rarefaction and Interstitial Fibrosis in the Heart of Rats with Renal Failure: The Effects of Ramipril, Nifedipine and Moxonidine.
63. Sukura A, Soveri T, Lindberg LA. Morphometric quantitation of early autolytic changes in rat myocardial cells. *Res Vet Sci.* 1990;48(3):276-9
64. Smolich JJ, Canale EE, Campbell GR, Walker AM, Adamson TM, Maloney JE. An improved perfusion technique for fixation of sheep myocardium. *Anat Rec.* 1984 Apr ;208 (4):607-11
65. Rostgaard J, Qvortrup K, Poulsen SS. Improvements in the technique of vascular perfusion-fixation employing a fluorocarbon-containing perfusate and a peristaltic pump controlled by pressure feedback. *J Microsc.* 1993;172(2):137-51
66. Nguyen C T, Hall CS, Scott MJ, Qingyan Z, Marsh J, Wickline SA. Age-related alterations of cardiac tissue microstructure and material properties in fischer *Ultrasound in medicine & biology.* 2001; 27(5): 611-619
67. Hacker TA, McKiernan SH, Douglas PS, Wanagat J, Aiken JM. Age-related changes in cardiac structure and function in Fischer 344 _ Brown Norway hybrid rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290: H304–H311

68. Lin J, Lopez EF, Jin Y, Remmend HV, Baucha T, Hang HC, Lindsey ML. Age-related cardiac muscle sarcopenia: Combining experimental and mathematical modeling to identify mechanisms. *Experimental Gerontology*. 2008; 43(4):296-306
69. Schmiedl A, Bach F, Richter J, Schnabel PA, Bretschneider B. Morphometric Evaluation of the Myocardial Interstitial Space after Physical and Chemical Fixation A Light-Microscopic Study on the Left Ventricle of Canine Hearts. *Acta Anatomica* 1991;142:321-325
70. Cardoso JA, TOscano AE, Tashiro T, Ferraz de Carvarlho CA, Arruda de Moraes SR. Morphometry of Human Myocardium in Senile Individuals. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2006; 86(5)
71. Gutsol AA. [Current problems in the morphometry of the heart]. [Article in Russian]. *Arkh Patol*. 1987;49(9):77-80
72. Olivetti G, Quaini F, Lagrasta C, Ricci R, Tiberti G, Capasso JM, Anversa P. Myocyte Cellular Hypertrophy and Hyperplasia Contribute to Ventricular Wall Remodeling in Anemia-induced Cardiac Hypertrophy in Rats. *American Journal of Pathology*. 1992; 141(1)
73. Ragan T, Sylvan JD, Kim KH, Huang H, Bahlmann K, Lee RT, So PTC. High-resolution whole organ imaging using two-photon tissue cytometry. *J. Biomed. Opt.* 2007; 12.
74. Stilli D, Lagrasta C, Berni R, Bocchi L, Savi M, Delucchi F, et al. Preservation of ventricular performance at early stages of diabetic cardiomyopathy involves changes in myocyte size, number and intercellular coupling. *Basic Res Cardiol* 2007; 102:488-499
75. Sato I, Shimada K. Quantitative Analysis of tenascin in chorda tendinae of human left ventricular papillary muscle with aging. *Ann Anat*. 2001; 183(5):443-8
76. Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kawase D, Kinoshita N, Yazaki Y, Hiroe M. Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(11):2319-25
77. Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Bin Tsukada, et al. Higher serum tenascin C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy.

Circ J 2007; 71: 327 – 330

78. Thometich B, Dietl W, Mitterer G, Bauer M, Trescher K, Hasun M, et al. Tenascin-C: A possible marker for LV remodeling after myocardial infarction in endothelin therapy. *Eur. Surg.* 2007, 39(Suppl. 213)
79. Satta J, Melkko J, Pollanen R, Tuukkanen J, Paakko P, Ohtonen P, et al. Progression of Human Aortic Valve Stenosis Is Associated With Tenascin-C Expression. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:96 –101
80. Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, et al. Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *The Journal of Pathology.* 2005; 205(4): 460-467
81. Tamura A, Kusachi S, Nogami K, Yamanishi A, Kajikawa Y, Hirohata S, et al. Tenascin expression in endomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margin of fibrotic lesions. *Heart* 1996;75:291-294
82. van Der Wes C. The responses of cardiac cells to stress: focus on irradiation and mechanical stretch[dissertation]. FEBO druk, Enschede: University of Leiden; 2006.
83. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovascular Research.* 2004; 64: 24– 31
84. Yamamoto K, Dang QN, Maeda Y, Huang H, Kelly RA, Lee RT. Regulation of Cardiomyocyte Mechanotransduction by the Cardiac Cycle. *Circulation.* 2001;103:1459-1464
85. Rysa J. Gene Expression Profiling in Experimental Models of Cardiac Load[dissertation]. Acta Univ. Oulu: University of Oulu; 2008.
86. Camelliti P, Green CR, Kohl P. Structural and Functional Coupling of Cardiac Myocytes and Fibroblasts. Dhein S (ed): Cardiovascular Gap Junctions. *Adv Cardiol* vol 42. Basel: Karger, 2006. p.132–149

RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Radiana Dhewayani Antariato
 NPM : 0606000195
 Tempat tanggal lahir : Medan, 21 November 1978
 Agama : Islam
 Alamat : Jl H Muhi Raya no 8A. Kebayoran Lama. Jakarta
 Pekerjaan dan Jabatan : Dokter PTT calon staf pengajar FKUI
 Alamat instansi : Jl.Salemba Raya no 6 Jakarta Pusat

Riwayat pendidikan :

SD : SD Pertiwi Bangdes Jakarta, tahun 1985-1991
 SMP : SMPN 107 Jakarta, tahun 1991-1994
 SMA : SMUN 8 Tebet Jakarta, tahun 1994-1997
 S1 : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, tahun 1998-2005

Riwayat pekerjaan:

- Research Assistant, Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi Departemen Ilmu Penyakit Dalam, FKUI-RSCM. Desember 2004 – Mei 2005.
- Dokter PTT calon staf pengajar, Departemen Histologi FKUI. Oktober 2005 – sekarang.

Publikasi ilmiah:

- Antariato RD. Stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Med J Indones 2006; 15(1): 3-7
- Antariato RD. Peran Tenascin C dalam regenerasi otot jantung. MKI. 2008; :
- Antariato RD. Significance of Ocular Stem cells in tissue engineering of the eye. Med J Indones 2008; 17(3): 143-148
- Antariato RD, Pawitan JA, Jusuf AA, Kodariah R. Ekspresi Tenascin C di Jantung Tikus Neonatus, Remaja dan Dewasa. Dalam persiapan penerbitan.

Presentasi Oral di Forum Ilmiah:

- Agustin R, Antariato RD. "Stem cell dan penuaan". Pertemuan Ilmiah Nasional Perhimpunan Ahli Anatomi Indonesia (PAAI) di Semarang. Agustus 2006
- Antariato RD. "Aplikasi stem cell dan tissue engineering untuk terapi fraktur osteoporosis". Pertemuan Ilmiah Nasional PAAI di Padang. Agustus 2007.
- Antariato RD. " Peran IGF-1 dalam regenerasi otot rangka". Pertemuan Ilmiah Nasional PAAI di Padang. Agustus 2007.
- Antariato RD. " Eradikasi sel stem kanker payudara". Pertemuan Ilmiah Bulanan Departemen Histologi FKUI. November 2007.
- Antariato RD, Barasila AC. "Histodinamika sel oval hepar : penelitian pendahuluan". Pertemuan Ilmiah Nasional PAAI di Jakarta. Juni 2008.

Presentasi Poster di Forum Ilmiah:

- Antarianto RD, Jusuf AA. "Evaluasi tingkat keberhasilan fiksasi intravital tikus neonatus, remaja dan dewasa". Pertemuan Ilmiah Nasional PAAI di Jakarta. Juni 2008.
- Antarianto RD, Pawitan JA, Jusuf AA. "Hystodynamics of cardiomyocytes number and diameter in neonate, adult and senile rat cardiac tissue: preliminary study". Fraunhofer Life Science Symposium 2008 di Leipzig. Oktober 2008.
- Antarianto RD, Pawitan JA, Jusuf AA. " Expression of tenascin-C in rat neonatal cardiac". Fraunhofer Life Science Symposium 2008 di Leipzig. Oktober 2008.

Sumber dana penelitian tesis : Hibah Riset Tesis S2 DRPM UI.

Jakarta, 4 Oktober 2008

(dr.Radiana D Antarianto)

LAMPIRAN 1
DATA MENTAH 24 SUBYEK PENELITIAN

	Usia	JmlAtr1	JmlAtr2	MeanAtr	JmlVtr1	JmlVtr2	MeanVtr	DiamVtr1
SNeo1	1	67	72	69.5	173	153	163	6.47
SNeo2	1	65	93	79	142	144	143	7.94
SNeo3	1	85	55	70	153	155	154	6.98
SNeo4	1	55	54	53.5	145	138	141.5	7.81
SNeo5	1	78	84	81	188	118	153	7.44
Sneo6	1	80	95	87.5	150	171	160.5	6.14
SRem1	2	37	38	37.5	71	82	76.5	10.44
SRem2	2	51	55	53	90	81	85.5	10.69
SRem3	2	39	36	37.5	73	72	72.5	10.94
SRem4	2	43	44	43.5	67	61	64	10.43
SRem5	2	43	41	42	72	64	68	12.64
SRem6	2	38	33	35.5	66	69	67	9.21
SRem7	2	38	50	44	73	70	71.5	9
Srem8	2	34	33	33.5	69	55	62	8.68
Srem9	2	43	51	47	83	71	77	9.69
SDew1	3	19	25	17	34	38	36	27.08
SDew2	3	25	29	27	41	41	41	22.21
SDew3	3	23	26	24.5	42	44	43	24.18
SDew4	3	23	21	22	39	45	42	25.17
SDew5	3	27	30	28.5	58	41	49.5	26.47
SDew6	3	26	24	25	36	40	38	26.01
SDew7	3	26	30	28	49	54	51.5	25.19
SDew8	3	31	29	30	36	30	33	20.48
SDew9	3	34	30	32	60	59	59.5	23.23

VIC 3	VIC 2	VIC 1	TotVIC	VEIC 3	VEIC 2	VEIC 1	TotVEIC	VEC 3
20	10	0	30	59	3	5	67	1
12	37	3	62	21	22	3	46	2
23	7	1	31	32	3	4	39	8
11	22	0	33	48	19	0	67	0
3	4	5	12	83	0	5	88	0
0	33	0	33	30	0	3	33	3
0	4	0	4	0	0	0	0	0
0	0	2	2	1	0	2	3	23
0	2	2	4	1	0	0	1	6
0	3	20	23	1	4	13	18	0
0	0	2	2	0	0	5	5	0
0	0	1	1	0	0	2	2	0
0	4	3	7	0	2	6	8	0
0	0	0	0	0	0	1	1	3
3	10	2	15	2	11	13	26	5
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	0	6	6	1	0	7	16
0	0	13	13	0	0	13	13	0
0	0	2	2	0	0	8	8	0
0	37	2	39	3	10	15	28	0
0	0	0	0	0	0	39	39	0
0	4	0	4	1	3	14	28	1
0	11	2	13	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	1	1	0

VEC 2	VEC 1	TotVEC	Vneg	TotAtrpos	TotAtrpos3	TotAtrpos2	TotAtrpos1	TotAtrNeg
0	0	1	2	100	74	22	4	0
0	0	2	0	100	10	90	0	0
1	0	9	21	93	73	9	11	7
0	0	0	0	100	15	76	9	0
0	0	0	0	100	73	27	0	0
0	0	3	31	33	12	8	13	67
0	0	0	96	89	26	56	7	11
30	16	69	26	34	5	14	15	66
0	14	20	75	97	11	79	7	3
0	0	0	59	59	10	49	0	41
0	1	1	92	47	0	47	0	53
1	1	2	95	53	0	39	14	47
1	4	5	80	56	14	36	6	44
0	0	3	96	67	22	23	22	33
4	0	9	50	49	3	36	10	51
0	0	0	100	3	0	3	0	97
17	0	33	54	88	79	7	2	12
0	5	5	74	8	0	0	8	92
0	6	6	84	94	4	88	2	6
0	0	0	33	79	5	68	6	21
8	10	18	43	63	13	12	38	37
4	12	17	61	56	4	36	16	44
19	4	23	64	73	10	51	12	27
0	3	3	95	5	1	0	4	95

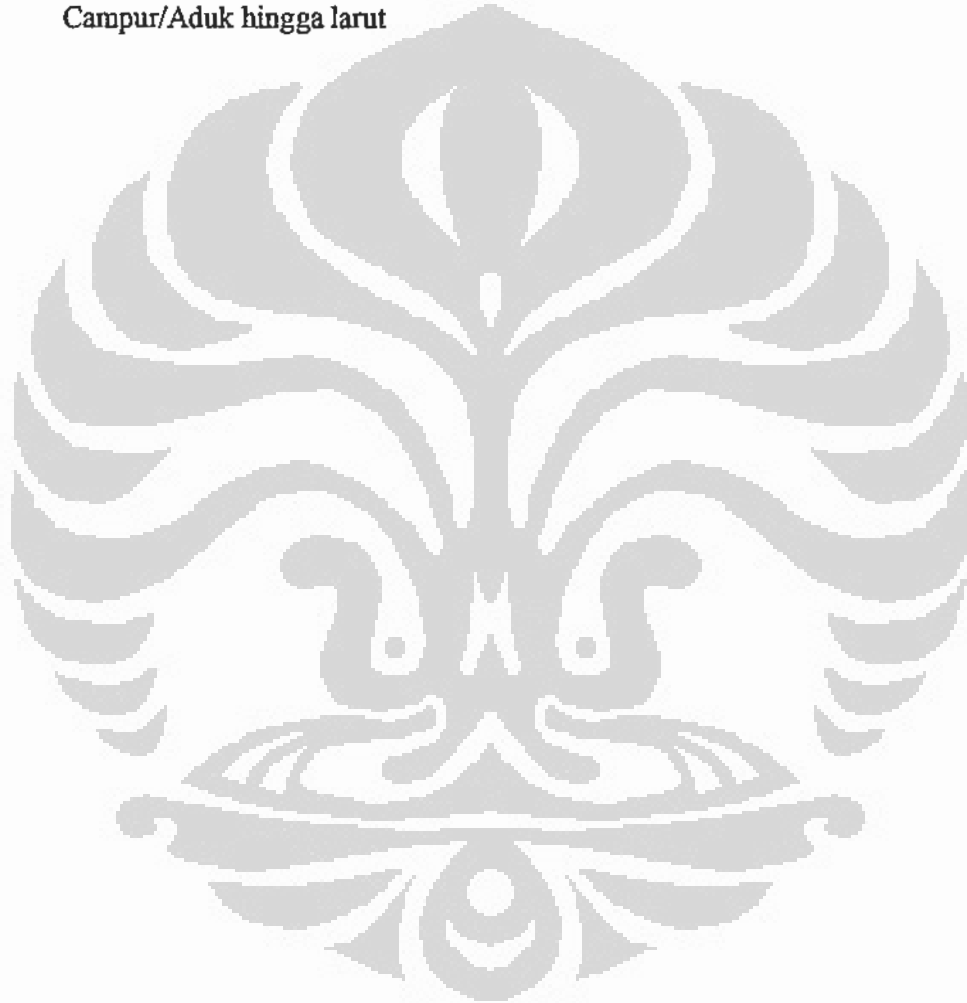
TotVpos	TotVpos3	TotVpos2	TotVpos1	TotVneg
98	80	13	5	2
100	35	59	6	0
79	63	11	5	21
100	59	41	0	0
100	86	4	10	0
69	33	33	3	31
4	0	4	0	96
74	24	30	20	26
25	7	2	16	75
41	1	7	33	59
8	0	0	8	92
5	0	1	4	95
20	0	7	13	80
4	3	0	1	96
50	10	25	15	50
0	0	0	0	100
46	24	22	0	54
26	0	0	26	74
16	0	0	16	84
67	3	47	17	33
57	0	8	49	43
39	2	11	26	61
36	0	30	6	64
5	0	0	5	95

LAMPIRAN 2

10 % Neutral Buffer Formalin (volume 1000ml)

- | | |
|-----------------------------|--------|
| • Formaldehyde (37.5%) | 100 ml |
| • Aqua destilata | 900ml |
| • NaH_2PO_4 | 4 g |
| • Na_2HPO_4 | 6.5 g |

Campur/Aduk hingga larut



LAMPIRAN 3
Dosis Anestesi Ketamine Subyek tikus remaja dan dewasa

Tanggal	Nomor Subyek	Usia	Berat Badan	Dosis Ketamine
11 Desember 2007	S6	4 bulan	150 gram	11.25 mg
13 Desember 2007	S16	14 bulan	360 gram	27 mg
14 Desember 2007	S17	12 bulan	250 gram	18.75 mg
	S18	4 bulan	150 gram	11.25 mg
	S19	4 bulan	180 gram	13.5 mg
	S20	4 bulan	170 gram	12.75 mg
15 Desember 2007	S21	3 bulan	140 gram	10.5 mg
	S22	4 bulan	160 gram	12 mg
	S23	3 bulan	135 gram	10.125 mg
	S24	3 bulan	120 gram	9 mg
	S25	16 bulan	400 gram	30 mg
	S26	13 bulan	390 gram	29.35 mg
	S27	13 bulan	300 gram	22.5 mg
	S28	13 bulan	280 gram	21 mg
16 Desember 2007	S29	16 bulan	400 gram	30 mg
	S30	14 bulan	390 gram	29.25 mg

Catatan :

1. Ada dua subyek penelitian (satu dewasa, satu remaja) yang dianestesi dengan eter karena ketalar belum dibeli. Mereka adalah
 - Subyek 4, Usia 13 bulan, BB = 360 gram. Tanggal percobaan : 9 Desember 2007
 - Subyek 5, Usia 4 bulan, BB= 170 gram. Tanggal Percobaan : 10 Desember 2007
2. Seluruh subyek penelitian tikus neonatus dianestesi dengan metode hipotermi. Berikut adalah rincian data subyek neonatus.

Tanggal	Nomor Subyek	Usia	Berat Badan
11 Desember 2007	S7	3 hari	9 gram
	S8	4 hari	12.3 gram
12 Desember 2007	S9	1 hari	6 gram
	S10	1 hari	6 gram
	S11	1 hari	5.5 gram
	S12	1 hari	6.5 gram
13 Desember 2007	S13	1 hari	4.1 gram
	S14	1 hari	4 gram
	S15	1 hari	4.9 gram

LAMPIRAN 4
Time Table Penggantian Larutan sampai Pengecoran(Block)

CHECK LIST PEMBUATAN PREPARAT		17/12-07	18/12-07	19/12-07	20/12-07	21/12-07	22/12-07	23/12-07	24/12-07	25/12-07
No	Larutan	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Hari 8	Hari 9
1	Fiksasi: Buffer Formalin									
2	Alkohol 70%	S29, S30								
3	Alkohol 80%	S21-S28	S29, S30							
4	Alkohol 90%	S17, S18 S19, S20	S21-S28	S29, S30						
5	Alkohol 95%	S13, S14 S15, S16	S17, S18 S19, S20	S21-S28	S29, S30					
6	Alkohol 100%	S9, S10, S11, S12	S13, S14 S15, S16	S17-S20	S21-S24, S25-S28	S29, S30				
7	Alkohol 100%	S6, S7, S8	S9, S10, S11, S12	S13-S16	S17, 18, S19, S20	S21-S24 S25-S28	S29, S30			
8	Alkohol 100%	S5	S6, S7, S8	S9-S12	S13, 14, S15, S16	S17, S18, S19-S20	S21-S24, S25-S28	S29, S30		
9	Benzyl benzoat I	S3, S4	S5	S6, S7, S8	S9, S10, S11, S12	S13, S14, S15, S16	S17, S18, S19, S20	S21-S28	S29, S30	
10	Benzyl benzoat II	S2	S3, S4	S5	S6, S7, S8	S9, S10, S11, S12	S13, S14, S15, S16	S17, S18, S19, S20	S21-S28	S29, S30
	Benzol-Histoplast	11 ⁰⁰ 13 ¹⁰ S2	13 ¹⁰ S3, S4	S5	S6, S7, S8	S9, S10, S11, S12	S13, S14, S15, S16	S17, S18	S19, S20, S21-S28	S29, S30
	Histoplast cair di oven	14 ¹⁰ S2	S3, S4	S5	S6, S7, S8	S9, S10, S11, S12	S13-S16	S17, S18	S19, S20, S21-S28	S29, S30
	Blocking	15 ¹⁰ BLOCKS	S3, S4 BLOCKS	S5 BLOCKS	S6, S7, S8 BLOCKS	S9-S12 BLOCKS	S13-S16 BLOCKS	S17, S18 BLOCKS	S19, S20, S21-S28 BLOCKS	S29, S30 BLOCKS

AtnNegativ	Remaja	Dewasa	-5.889	4.796	.233	-15.86	4.09
	Neonatus	Neonatus	8.222	4.796	.101	-1.75	18.20
	Dewasa	Dewasa	2.333	4.280	.582	-6.59	11.25
AtnNegativ	Remaja	Neonatus	5.889	4.798	.233	-4.08	15.86
	Neonatus	Remaja	-2.333	4.280	.592	-11.25	6.59
	Dewasa	Remaja	-26.444	15.351	.100	-58.37	5.48
AtnNegativ	Remaja	Dewasa	-35.556(*)	15.351	.031	-67.48	-3.63
	Neonatus	Neonatus	28.444	15.351	.100	-5.48	58.37
	Dewasa	Dewasa	-9.111	13.731	.514	-37.67	19.44
ToIVICpos	Remaja	Neonatus	35.556(*)	15.351	.031	3.63	67.48
	Neonatus	Remaja	9.111	13.731	.514	-19.44	37.67
	Dewasa	Remaja	27.056(*)	6.303	.000	13.95	40.16
ToIVICpos	Remaja	Dewasa	24.833(*)	6.303	.001	11.72	37.94
	Neonatus	Neonatus	-27.056(*)	6.303	.000	-40.16	-13.95
	Dewasa	Dewasa	-2.222	5.638	.697	-13.95	9.50
ToIVICpos	Remaja	Neonatus	-24.833(*)	6.303	.001	-37.94	-11.72
	Neonatus	Remaja	2.222	5.638	.697	-9.50	13.95
	Dewasa	Dewasa	49.556(*)	7.710	.000	33.52	65.59
ToIVICpos	Remaja	Dewasa	42.889(*)	7.710	.000	28.86	58.92
	Neonatus	Neonatus	-49.556(*)	7.710	.000	-85.59	-33.52
	Dewasa	Dewasa	-8.887	6.898	.345	-21.01	7.67
ToIVICpos	Remaja	Neonatus	-42.889(*)	7.710	.000	-58.92	-26.86
	Neonatus	Remaja	6.667	6.898	.345	-7.67	21.01
	Dewasa	Dewasa	-9.611	8.209	.255	-26.68	7.46
ToIVICpos	Remaja	Dewasa	-9.167	8.209	.277	-26.24	7.90
	Neonatus	Neonatus	9.611	8.209	.255	-7.46	26.86
	Dewasa	Dewasa	.444	7.342	.952	-14.82	15.71
VnNegativ	Remaja	Neonatus	9.167	8.209	.277	-7.90	26.24
	Neonatus	Remaja	-444	7.342	.952	-15.71	14.82
	Dewasa	Remaja	-85.333(*)	11.471	.000	-89.19	-41.48
VnNegativ	Remaja	Dewasa	-58.556(*)	11.471	.000	-82.41	-34.70
	Neonatus	Neonatus	65.333(*)	11.471	.000	41.48	89.19
	Dewasa	Dewasa	6.778	10.280	.516	-14.56	28.12
VnNegativ	Remaja	Neonatus	58.556(*)	11.471	.000	34.70	82.41

TotalProp3	Neonatus	Remaja	-6.778	10.260	.516	-28.12	14.56
	Remaja	Dewasa	32.722(*)	12.257	.014	7.23	58.21
	Dewasa	Neonatus	29.844(*)	12.257	.023	4.45	55.44
TotalProp2	Neonatus	Remaja	-32.722(*)	12.257	.014	-58.21	-7.23
	Dewasa	Neonatus	-2.778	10.963	.802	-25.58	20.02
	Remaja	Neonatus	-29.944(*)	12.257	.023	-55.44	-4.45
TotalProp1	Neonatus	Remaja	2.778	10.963	.802	-20.02	25.58
	Dewasa	Remaja	-3.444	15.341	.825	-35.35	28.46
	Remaja	Dewasa	9.222	15.341	.554	-22.68	41.13
TotalNeg	Neonatus	Neonatus	3.444	15.341	.825	-28.46	35.35
	Remaja	Dewasa	12.687	13.722	.366	-15.87	41.20
	Dewasa	Neonatus	-9.222	15.341	.554	-41.13	22.68
TotalPos2	Neonatus	Remaja	-12.687	13.722	.366	-41.20	15.87
	Remaja	Neonatus	-2.833	4.709	.554	-12.63	6.96
	Dewasa	Neonatus	-3.611	4.709	.452	-13.40	8.18
TotalPos1	Neonatus	Neonatus	2.833	4.709	.554	-8.96	12.63
	Remaja	Dewasa	-7.78	4.212	.855	-9.54	7.98
	Dewasa	Neonatus	3.611	4.709	.452	-8.18	13.40
TotalNeg	Neonatus	Remaja	.778	4.212	.855	-7.98	9.54
	Remaja	Dewasa	-26.444	15.351	.100	-58.37	5.48
	Dewasa	Neonatus	-35.556(*)	15.351	.031	-67.48	-3.63
TotalPos3	Neonatus	Neonatus	26.444	15.351	.100	-5.48	58.37
	Dewasa	Remaja	-9.111	13.731	.514	-37.67	19.44
	Remaja	Neonatus	35.556(*)	15.351	.031	3.63	67.48
TotalPos2	Neonatus	Remaja	9.111	13.731	.514	-19.44	37.67
	Dewasa	Remaja	54.333(*)	6.748	.000	40.30	68.37
	Remaja	Dewasa	56.111(*)	6.748	.000	42.08	70.15
TotalPos1	Neonatus	Neonatus	-54.333(*)	6.748	.000	-68.37	-40.30
	Dewasa	Remaja	1.778	6.036	.771	-10.77	14.33
	Remaja	Neonatus	-56.111(*)	6.748	.000	-70.15	-42.08
TotalPos2	Neonatus	Remaja	-1.778	6.036	.771	-14.33	10.77
	Remaja	Neonatus	18.389(*)	6.506	.042	.70	36.08
	Dewasa	Neonatus	13.722	8.508	.122	-3.97	31.41
TotalPos1	Neonatus	Neonatus	-18.389(*)	8.508	.042	-36.08	-70

TotVpost	Dewasa	Neonatus	-4.667	7.608	.546	-20.49	11.16
	Neonatus	Remaja	-13.722	8.508	.122	-31.41	3.97
	Remaja	Dewasa	4.667	7.608	.546	-11.16	20.49
TotVneg	Neonatus	Dewasa	-7.389	6.250	.250	-20.39	5.61
	Remaja	Neonatus	-11.278	6.250	.086	-24.28	1.72
	Dewasa	Remaja	7.389	6.250	.250	-5.61	20.39
TotVpos	Dewasa	Neonatus	-3.889	5.590	.494	-15.51	7.74
	Neonatus	Remaja	11.278	6.250	.086	-1.72	24.28
	Remaja	Dewasa	3.889	5.590	.494	-7.74	15.51
TotVneg	Neonatus	Remaja	-65.333(*)	11.471	.000	-89.19	-41.48
	Remaja	Dewasa	-58.556(*)	11.471	.000	-82.41	-34.70
	Dewasa	Neonatus	65.333(*)	11.471	.000	41.48	89.19
TotVpos	Neonatus	Dewasa	6.778	10.260	.516	-14.56	28.12
	Remaja	Neonatus	58.556(*)	11.471	.000	34.70	82.41
	Dewasa	Remaja	-6.778	10.260	.516	-28.12	14.56

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

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
TotalPos	Neonatus	6	87.67	26.927	10.993	59.41	115.92	33	100
	Remaja	9	61.22	20.241	6.747	45.68	76.78	34	97
	Dewasa	9	52.11	36.934	12.311	23.72	80.50	3	84
TotalNeg	Total	24	64.42	31.287	6.386	51.21	77.63	3	100
	Neonatus	6	91.00	13.565	5.538	76.76	105.24	69	100
	Remaja	9	25.67	24.683	8.228	6.89	44.64	4	74
TotalPos	Dewasa	9	32.44	22.788	7.596	14.93	49.96	0	67
	Total	24	44.54	34.529	7.048	28.96	59.12	0	100

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TotalVpos	2.630	2	21	.096
TotVpos	1.049	2	21	.368

ANOVA

TotalVpos	Between Groups	(Combined)	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
		Linear Term	4898,056	2	2349,028	2,789	.086
		Unweighted	4551,111	1	4551,111	5,365	.031
		Weighted	4282,056	1	4282,056	5,047	.036
		Deviation	416,000	1	416,000	.490	.491
	Within Groups		17815,778	21	848,370		
	Total		22513,833	23			
	Between Groups	(Combined)	17473,736	2	8736,868	18,443	.000
		Linear Term	12343,511	1	12343,511	26,056	.000
		Unweighted	10273,719	1	10273,719	21,687	.000
		Weighted	7200,017	1	7200,017	15,199	.001
		Deviation	9848,222	21	473,725		
	Within Groups		27421,958	23			
	Total						

LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Kel_usia	(J) Kel_usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Upper Bound

	Kel_usia	Kolmogorov-Smirnov ^(a)			Shapiro-Wilk		Statistic	df	Sig.	
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df				Sig.
TotAtnpos	Neonatus	Remaja	26,444	15,351	.100	6	.681	58,37		
		Dewasa	35,556(*)	15,351	.031	9	.745	67,48		
		Remaja	-26,444	15,351	.100	9	.756	5,48		
	Dewasa	Remaja	8,111	13,731	.514	9	.459	37,67		
		Neonatus	-35,556(*)	15,351	.031	6	.812	-3,63		
		Remaja	-9,111	13,731	.514	9	.697	19,44		
	TotVpos	Neonatus	Remaja	65,333(*)	11,471	.000	9	.891	89,19	
			Dewasa	58,556(*)	11,471	.000	6	.891	82,41	
			Remaja	-65,333(*)	11,471	.000	9	.594	-41,48	
Remaja	Dewasa	-6,778	10,260	.516	9	.441	14,56			
	Neonatus	-58,556(*)	11,471	.000	6	.441	-34,70			
	Remaja	6,778	10,260	.516	9	.281	28,12			

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

Tests of Normality

	Kel_usia	Kolmogorov-Smirnov ^(a)			Shapiro-Wilk		Statistic	df	Sig.
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df			
MeanAtr	Neonatus	Remaja	.205	.200(*)	.943	6	.681		
		Dewasa	.186	.200(*)	.955	9	.745		
		Remaja	.148	.200(*)	.956	9	.756		
MeanVentr	Neonatus	Remaja	.193	.200(*)	.913	6	.459		
		Dewasa	.130	.200(*)	.961	9	.812		
		Remaja	.201	.200(*)	.951	9	.697		
MeanDiamVir	Neonatus	Remaja	.209	.200(*)	.970	6	.891		
		Dewasa	.194	.200(*)	.941	9	.594		
		Remaja	.182	.200(*)	.928	9	.441		

MeandiamAtr	Neonatus	.179							
	Remaja	.293	.200(*)	.956	6	.789			
TotalAtrC	Dewasa	.137	.200(*)	.857	9	.090			
	Neonatus	.206	.200(*)	.961	9	.806			
TotalAtrE	Remaja	.153	.200(*)	.952	6	.756			
	Dewasa	.257	.088	.927	9	.449			
TotalAtrEC	Neonatus	.233	.200(*)	.813	9	.029			
	Remaja	.213	.200(*)	.927	6	.556			
TotalAtrEC	Dewasa	.178	.200(*)	.879	9	.153			
	Neonatus	.383	.013	.880	9	.158			
AtrNegativ	Remaja	.200	.200(*)	.734	6	.014			
	Dewasa	.212	.200(*)	.913	9	.338			
TotalVCPpos	Neonatus	.412	.002	.859	9	.093			
	Remaja	.210	.200(*)	.560	6	.000			
TotalVCPpos	Dewasa	.217	.200(*)	.918	9	.374			
	Neonatus	.346	.024	.848	9	.070			
TotalVEICpos	Remaja	.292	.028	.850	6	.159			
	Dewasa	.253	.101	.789	9	.015			
TotalVEICpos	Neonatus	.195	.200(*)	.723	9	.003			
	Remaja	.259	.082	.931	6	.592			
TotalVEICpos	Dewasa	.211	.200(*)	.780	9	.012			
	Neonatus	.275	.176	.866	9	.112			
VNEgativ	Remaja	.333	.005	.785	6	.043			
	Dewasa	.243	.134	.808	9	.000			
TotalAtrpos3	Neonatus	.384	.013	.893	9	.214			
	Remaja	.207	.200(*)	.735	6	.014			
TotalAtrpos3	Dewasa	.118	.200(*)	.883	9	.105			
	Neonatus	.412	.002	.970	9	.896			
TotalAtrpos3	Remaja	.210	.200(*)	.580	6	.000			
	Dewasa	.217	.200(*)	.918	9	.374			
TotalAtrpos3	Neonatus	.316	.061	.848	9	.070			
				.718	6	.010			

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
MeanAtr	Neonatus	6	73.417	11.9223	4.8673	60.905	85.928	53.5	87.5
	Remaja	9	41.500	6.1745	2.0582	36.754	46.246	33.5	53.0
	Dewasa	9	26.000	4.5208	1.5069	22.525	29.475	17.0	32.0
	Total	24	43.667	20.1525	4.1136	35.157	52.176	17.0	87.5
MeanVentir	Neonatus	6	152.500	8.8091	3.5963	143.255	161.745	141.5	163.0
	Remaja	9	71.556	7.3419	2.4473	65.912	77.199	62.0	85.5
	Dewasa	9	43.722	8.3745	2.7915	37.285	50.159	33.0	59.5
	Total	24	81.354	44.4093	9.0650	62.602	100.107	33.0	163.0
MeanDiamAtr	Neonatus	6	7.3900	.75342	.30758	6.5993	8.1807	6.39	8.58
	Remaja	9	10.5058	.75745	.25248	9.9233	11.0878	9.07	11.47
	Dewasa	9	23.4356	2.22027	.74009	21.7289	25.1422	20.04	26.14
	Total	24	14.5754	7.25889	1.48192	11.5098	17.6410	6.39	26.14
MeanDiamVir	Neonatus	6	6.1017	.67562	.27582	5.3927	6.8107	5.15	6.92
	Remaja	9	9.5894	.65404	.21801	9.0867	10.0922	8.88	11.08
	Dewasa	9	17.4239	1.27783	.42594	16.4417	18.4061	15.58	19.49
	Total	24	11.6554	4.85316	.99065	9.6081	13.7047	5.15	19.49
TotalHC	Neonatus	6	41.33	32.959	13.455	6.75	75.92	0	97
	Remaja	9	38.89	29.002	9.667	14.60	59.18	2	91
	Dewasa	9	28.89	35.684	11.895	1.46	56.32	0	94
	Total	24	35.00	31.593	6.449	21.86	48.34	0	97
TotalAtrEC	Neonatus	6	43.17	22.964	9.375	19.07	67.27	3	69
	Remaja	9	12.78	11.454	3.818	3.97	21.58	0	38
	Dewasa	9	15.44	16.712	5.571	2.60	28.29	0	47
	Total	24	21.38	20.591	4.203	12.68	30.07	0	69
TotalAtrEC	Neonatus	6	3.33	4.412	1.801	-1.30	7.96	0	12
	Remaja	9	11.56	9.608	3.202	4.17	18.94	0	27
	Dewasa	9	9.22	10.628	3.543	1.05	17.39	0	31

AInNegativ	Total	24	8,63	9,296	1,898	4,70	12,55	0	31
	Neonatus	6	12,33	26,927	10,993	-15,92	40,59	0	87
	Remaja	9	38,78	20,241	6,747	23,22	54,34	3	66
	Dewasa	9	47,89	36,934	12,311	19,50	76,28	6	97
TotVICpos	Total	24	35,58	31,287	8,386	22,37	48,79	0	97
	Neonatus	6	33,50	16,084	6,586	16,62	50,38	12	62
	Remaja	9	6,44	7,867	2,556	,55	12,34	0	23
	Dewasa	9	8,67	12,450	4,150	-.90	18,24	0	39
TotVEICpos	Total	24	14,04	16,225	3,312	7,19	20,89	0	62
	Neonatus	6	56,67	20,867	8,527	34,75	78,59	33	88
	Remaja	9	7,11	9,006	3,002	,19	14,03	0	26
	Dewasa	9	13,78	14,420	4,807	2,69	24,86	0	39
TotVECPos	Total	24	22,00	24,942	5,091	11,47	32,53	0	88
	Neonatus	6	2,50	3,391	1,384	-1,06	6,08	0	9
	Remaja	9	12,11	22,251	7,417	-4,99	29,21	0	69
	Dewasa	9	11,67	11,597	3,866	2,75	20,58	0	33
VNEgativ	Total	24	9,54	15,453	3,154	3,02	16,07	0	69
	Neonatus	6	9,00	13,565	5,538	-5,24	23,24	0	31
	Remaja	9	74,33	24,883	8,228	55,36	93,31	26	96
	Dewasa	9	67,56	22,788	7,596	50,04	85,07	33	100
TotAtpos3	Total	24	55,46	34,529	7,048	40,88	70,04	0	100
	Neonatus	6	42,83	33,451	13,656	7,73	77,94	10	74
	Remaja	9	10,11	9,293	3,098	2,97	17,25	0	26
	Dewasa	9	12,89	25,182	8,394	-8,47	32,25	0	79
TotAtpos2	Total	24	19,33	26,219	5,352	8,26	30,40	0	79
	Neonatus	6	38,67	35,393	14,449	1,52	75,81	8	90
	Remaja	9	42,11	18,924	6,308	27,56	56,66	14	79
	Dewasa	9	29,44	32,908	10,970	4,15	54,74	0	88
TotAtpos1	Total	24	36,50	28,401	5,797	24,51	48,49	0	90
	Neonatus	6	6,17	5,636	2,301	,25	12,08	0	13
	Remaja	9	9,00	7,159	2,386	3,50	14,50	0	22

TotalNeg	Dewasa	9	9,78	11,786	3,922	.73	18,82	0	38
	Total	24	8,58	8,662	1,768	4,93	12,24	0	38
TotalPos1	Neonatus	6	12,33	26,927	10,993	-15,92	40,59	0	67
	Remaja	9	38,78	20,241	6,747	23,22	54,34	3	66
TotalPos2	Dewasa	9	47,89	36,934	12,311	19,50	76,28	6	97
	Total	24	35,58	31,287	6,386	22,37	48,79	0	97
TotalPos3	Neonatus	6	59,33	22,079	9,014	38,16	82,50	33	86
	Remaja	9	5,00	7,984	2,661	-1,14	11,14	0	24
TotalVpos1	Dewasa	9	3,22	7,870	2,623	-2,83	9,27	0	24
	Total	24	17,92	27,330	5,579	6,38	28,46	0	86
TotalVpos2	Neonatus	6	26,83	21,151	8,635	4,64	49,03	4	59
	Remaja	9	8,44	11,193	3,731	-.16	17,05	0	30
TotalVpos3	Dewasa	9	13,11	16,899	5,586	.28	25,95	0	47
	Total	24	14,79	17,103	3,491	7,57	22,01	0	59
TotalNeg	Neonatus	6	4,83	3,312	1,352	1,36	8,31	0	10
	Remaja	9	12,22	10,462	3,487	4,18	20,26	0	33
TotalVneg	Dewasa	9	16,11	15,902	5,301	3,89	28,33	0	49
	Total	24	11,83	12,182	2,487	6,69	16,98	0	49
TotalNeg	Neonatus	6	9,00	13,585	5,538	-5,24	23,24	0	31
	Remaja	9	74,33	24,683	8,228	55,36	93,31	26	96
TotalNeg	Dewasa	9	67,56	22,788	7,596	50,04	85,07	33	100
	Total	24	55,46	34,529	7,048	40,88	70,04	0	100

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MeanAtr	3,425	2	21	.052
MeanVent	.152	2	21	.860
MeanDiamVir	12,322	2	21	.000
MeanDiamAtr	2,283	2	21	.127
TotalRIC	.452	2	21	.643

TOTALREIC	1.425	2	21	.263
TOTALREC	2.486	2	21	.107
AIINegativ	2.630	2	21	.096
TOIVICpos	.447	2	21	.645
TOIVEICpos	4.260	2	21	.028
TOIVECpos	2.369	2	21	.118
VNEGativ	1.049	2	21	.388
TOTALrpos3	6.153	2	21	.008
TOTALrpos2	3.313	2	21	.056
TOTALrpos1	.772	2	21	.475
TOTALINeg	2.630	2	21	.086
TOIVpos3	5.462	2	21	.012
TOIVpos2	2.253	2	21	.130
TOIVpos1	3.290	2	21	.057
TOIVINeg	1.049	2	21	.368

ANOVA

Mean/Atr	Between Groups	(Combined) Linear Term	Unweighted Weighted Deviation	Sum of Squares	df	Mean Square
				8161.625	2	4080.813
				8094.025	1	8094.025
				7788.462	1	7788.462
				373.163	1	373.163
				1179.208	21	56.153
				8340.833	23	
Mean/Ventf	Total			43979.982	2	21989.991
	Between Groups	(Combined) Linear Term	Unweighted Weighted Deviation	42597.378	1	42597.378
				40074.252	1	40074.252
				3905.709	1	3905.709
				1380.278	21	65.728
	Within Groups			45380.240	23	
	Total					

MeanDiamA/r	Between Groups	(Combined) Linear Term	Unweighted Weighted Deviation	1165.374 926.855 1032.003 133.371 46.865	2 1 1 1 21	582.687 926.855 1032.003 133.371 2.232	261.101 415.323 462.440 59.763	.000 .000 .000 .000
TotalA/rC	Total	(Combined)	Unweighted	1212.238	23	261.478	292.586	.000
	Between Groups	Linear Term	Unweighted	522.958	2	481.494	516.397	.000
	Within Groups		Weighted	486.796	1	496.796	555.899	.000
	Total		Deviation	26.160	1	26.160	29.272	.000
	Between Groups	(Combined)	Unweighted	18.767	21	.894		
TotalA/rE	Total	(Combined)	Unweighted	541.724	23	304.444	.286	.754
	Between Groups	Linear Term	Unweighted	608.889	2	557.511	.524	.477
	Within Groups		Weighted	557.511	1	591.385	.556	.464
	Total		Deviation	591.385	1	17.504	.016	.899
	Between Groups	(Combined)	Unweighted	17.504	1	1064.148		
TotalA/rI	Total	(Combined)	Unweighted	22347.111	21	1915.507	6.794	.005
	Between Groups	Linear Term	Unweighted	22956.000	23	2766.878	9.813	.005
	Within Groups		Weighted	3831.014	2	2318.087	8.222	.009
	Total		Deviation	2766.878	1	1512.927	5.366	.031
	Between Groups	(Combined)	Unweighted	2318.087	1	281.934		
TotalA/rE	Total	(Combined)	Unweighted	1512.927	1	124.257	1.500	.246
	Between Groups	Linear Term	Unweighted	5820.611	21	124.844	1.508	.233
	Within Groups		Weighted	9751.625	23	94.240	1.138	.298
	Total		Deviation	248.514	2	154.274	1.863	.187
	Between Groups	(Combined)	Unweighted	124.844	1	82.915		
AllNegativ	Within Groups		Deviation	94.240	1			
	Total	(Combined)		154.274	1			
AllNegativ	Between Groups			1739.111	21			
	Total			1987.625	23			
AllNegativ	Between Groups			4698.056	2	2349.028	2.769	.086
	Total							

	Groups	Linear Term	Unweighted Weighted Deviation						
TotalVCpos	Within Groups		4551.111	1	4551.111	5.365	.031		
	Total		4282.056	1	4282.056	5.047	.036		
	Between Groups	(Combined) Linear Term	416.000	1	416.000	.490	.491		
TotalVCneg	Within Groups		17815.778	21	848.370				
	Total		22513.833	23					
	Between Groups	(Combined) Linear Term	3051.236	2	1525.618	10.666	.001		
TotalVEIcpos	Within Groups		2220.100	1	2220.100	15.521	.001		
	Total		1864.380	1	1864.380	13.034	.002		
	Between Groups	(Combined) Linear Term	1186.876	1	1186.876	8.298	.009		
TotalVEIcpos	Within Groups		3003.722	21	143.034				
	Total		6054.958	23					
	Between Groups	(Combined) Linear Term	9814.222	2	4907.111	22.932	.000		
TotalVEIcpos	Within Groups		6622.044	1	6622.044	30.946	.000		
	Total		5437.538	1	5437.538	25.410	.000		
	Between Groups	(Combined) Linear Term	4376.684	1	4376.684	20.453	.000		
TotalVEIcpos	Within Groups		4493.778	21	213.989				
	Total		14308.000	23					
	Between Groups	(Combined) Linear Term	397.589	2	198.785	.819	.454		
VNEGativ	Within Groups		302.500	1	302.500	1.247	.277		
	Total		257.565	1	257.565	1.082	.315		
	Between Groups	(Combined) Linear Term	140.004	1	140.004	.577	.456		
TotalVCpos	Within Groups		5084.389	21	242.590				
	Total		5491.958	23					
	Between Groups	(Combined) Linear Term	17473.736	2	8736.868	18.443	.000		
TotalVCpos	Within Groups		12343.511	1	12343.511	26.056	.000		
	Total		10273.719	1	10273.719	21.687	.000		
	Between Groups	(Combined) Linear Term	7200.017	1	7200.017	15.199	.001		
TotalVCpos	Within Groups		9948.222	21	473.725				
	Total		27421.958	23					
	Between Groups	(Combined) Linear Term	4452.722	2	2226.361	4.116	.031		
TotalVCpos	Within Groups		3228.011	1	3228.011	5.988	.023		

TotalPos2	Within Groups	Weighted Deviation	2707,761	1	2707,761	5,006		.036	
	Total		1744,962	1	1744,962	3,226		.087	
	Between Groups		11358,611	21	540,886				
TotalPos1	Within Groups	Unweighted	759,556	2	379,778	.448		.645	
	Total	Linear Term	306,178	1	306,178	.361		.554	
	Between Groups	Weighted Deviation	400,154	1	400,154	.472		.499	
TotalNeg	Within Groups	Unweighted	359,402	1	359,402	.424		.522	
	Total	Linear Term	17792,444	21	847,259				
	Between Groups	Unweighted	18552,000	23	24,722	.310		.737	
TotalPos3	Within Groups	Unweighted	49,444	2	46,944	.588		.452	
	Total	Linear Term	43,594	1	43,594	.546		.468	
	Between Groups	Weighted Deviation	5,850	1	5,850	.073		.789	
TotalNeg2	Within Groups	Unweighted	1676,389	21	79,828				
	Total	Linear Term	1725,833	23	2349,028	2,769		.088	
	Between Groups	Unweighted	4698,056	2	4551,111	5,365		.031	
TotalPos2	Within Groups	Weighted Deviation	4282,056	1	4282,056	5,047		.036	
	Total	Linear Term	416,000	1	416,000	.490		.491	
	Between Groups	Unweighted	17815,778	21	848,370				
TotalNeg3	Within Groups	Unweighted	22513,833	23	6888,472	41,894		.000	
	Total	Linear Term	13736,944	2	11334,444	69,135		.000	
	Between Groups	Weighted Deviation	8912,517	1	9912,517	60,462		.000	
TotalPos2	Within Groups	Unweighted	3824,427	1	3824,427	23,327		.000	
	Total	Linear Term	3442,889	21	163,947				
	Between Groups	Unweighted	17179,833	23	629,007	2,415		.114	
TotalNeg2	Within Groups	Unweighted	1258,014	2	677,878	2,602		.122	
	Total	Linear Term	677,878	1	522,010	2,004		.172	
	Between Groups	Unweighted	522,010	1					

Deviation	736,004	736,004	2,826	.108
Within Groups Total	5469,944	260,474		
Between Groups	6727,958	230,028	1,636	.219
(Combined) Linear Term	460,056	457,878	3,256	.086
Unweighted	457,878	443,094	3,151	.090
Weighted	443,094	16,962	.121	.732
Deviation	16,862	140,632		
Within Groups Total	2953,278	8736,868	18,443	.000
Total	3413,333	12343,511	26,056	.000
Between Groups	17473,736	10273,719	21,687	.000
(Combined) Linear Term	12343,511	7200,017	15,199	.001
Unweighted	10273,719	473,725		
Weighted	7200,017			
Deviation	9948,222			
Within Groups Total	27421,958			

Multiple Comparisons

LSD	Dependent Variable	(i) Kel_usia	(j) Kel_usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Upper Bound
MeanAtr	Neonatus	Remaja	Remaja Dewasa	31,9167(*)	3,8494	.000	23,703	40,130	
		Remaja	Neonatus	47,4167(*)	3,8494	.000	39,203	55,630	
	Remaja	Neonatus	Neonatus	-31,9167(*)	3,8494	.000	-40,130	-23,703	

MeanVentri	Dewasa	Dewasa	15,5000(*)	3,5325	.000	8,154	22,846
	Neonatus	Neonatus	-47,4167(*)	3,9494	.000	-55,630	-39,203
	Remaja	Remaja	-15,5000(*)	3,5325	.000	-22,846	-8,154
MeanDiamVir	Dewasa	Dewasa	80,9444(*)	4,2729	.000	72,058	89,830
	Neonatus	Dewasa	108,7778(*)	4,2729	.000	99,892	117,664
	Remaja	Neonatus	-80,9444(*)	4,2729	.000	-89,830	-72,058
MeanDiamAtr	Dewasa	Dewasa	27,8333(*)	3,8218	.000	19,885	35,781
	Neonatus	Neonatus	-108,7778(*)	4,2728	.000	-117,664	-99,892
	Remaja	Remaja	-27,8333(*)	3,8218	.000	-35,781	-19,885
TotalAtrIC	Dewasa	Remaja	-3,11556(*)	.78734	.001	-4,7529	-1,4782
	Neonatus	Dewasa	-16,04556(*)	.78734	.000	-17,8829	-14,4082
	Remaja	Neonatus	3,11556(*)	.78734	.001	1,4782	4,7529
TotalAtrEC	Dewasa	Dewasa	-12,93000(*)	.70422	.000	-14,3945	-11,4655
	Neonatus	Neonatus	16,04556(*)	.78734	.000	14,4082	17,6829
	Remaja	Remaja	12,93000(*)	.70422	.000	11,4655	14,3945
TotalAtrEC	Dewasa	Remaja	-3,48778(*)	.49824	.000	-4,5239	-2,4518
	Neonatus	Dewasa	-11,32222(*)	.49824	.000	-12,3584	-10,2861
	Remaja	Neonatus	3,48778(*)	.49824	.000	2,4516	4,5239
TotalAtrEC	Dewasa	Dewasa	-7,83444(*)	.44564	.000	-8,7612	-6,9077
	Neonatus	Neonatus	11,32222(*)	.49824	.000	10,2861	12,3584
	Remaja	Remaja	7,83444(*)	.44564	.000	6,9077	8,7612
TotalAtrEC	Dewasa	Remaja	4,444	17,193	.799	-31,31	40,20
	Neonatus	Dewasa	12,444	17,193	.477	-23,31	48,20
	Remaja	Neonatus	-4,444	17,193	.799	-40,20	31,31
TotalAtrEC	Dewasa	Dewasa	8,000	15,378	.608	-23,98	39,98
	Neonatus	Neonatus	-12,444	17,193	.477	-48,20	23,31
	Remaja	Remaja	-8,000	15,378	.608	-39,98	23,98
TotalAtrEC	Dewasa	Remaja	30,389(*)	8,850	.002	11,99	48,79
	Neonatus	Dewasa	27,722(*)	8,850	.005	9,32	46,13
	Remaja	Neonatus	-30,389(*)	8,850	.002	-48,79	-11,99
TotalAtrEC	Dewasa	Dewasa	-2,867	7,915	.740	-19,13	13,79
	Neonatus	Neonatus	-27,722(*)	8,850	.005	-46,13	-9,32
	Remaja	Remaja	2,667	7,915	.740	-13,79	19,13
TotalAtrEC	Dewasa	Remaja	-8,222	4,796	.101	-18,20	1,75
	Neonatus	Neonatus					
	Remaja	Remaja					

	Remaja	.153	9	.200(*)	.918	9	.379
	Dewasa	.387	9	.000	.545	9	.000
Totalpos2	Neonatus	.296	6	.109	.827	6	.101
	Remaja	.151	9	.200(*)	.965	9	.852
	Dewasa	.258	9	.087	.856	9	.087
Totalpos1	Neonatus	.196	6	.200(*)	.890	6	.317
	Remaja	.166	9	.200(*)	.945	9	.637
	Dewasa	.227	9	.200(*)	.774	9	.010
TotalNeg	Neonatus	.412	6	.002	.560	6	.000
	Remaja	.210	9	.200(*)	.918	9	.374
	Dewasa	.217	9	.200(*)	.848	9	.070
Totalpos	Neonatus	.384	6	.013	.735	6	.014
	Remaja	.207	9	.200(*)	.863	9	.105
	Dewasa	.118	9	.200(*)	.970	9	.896
Totalpos3	Neonatus	.198	6	.200(*)	.909	6	.428
	Remaja	.286	9	.067	.711	9	.002
	Dewasa	.400	9	.000	.485	9	.000
Totalpos2	Neonatus	.243	6	.200(*)	.928	6	.561
	Remaja	.329	9	.006	.751	9	.008
	Dewasa	.228	9	.194	.821	9	.036
Totalpos1	Neonatus	.196	6	.200(*)	.964	6	.853
	Remaja	.137	9	.200(*)	.936	9	.543
	Dewasa	.182	9	.200(*)	.892	9	.210
TotalNeg	Neonatus	.364	6	.013	.735	6	.014
	Remaja	.207	9	.200(*)	.863	9	.105
	Dewasa	.118	9	.200(*)	.970	9	.896

* This is a lower bound of the true significance.
 a Lilliefors Significance Correction

Korelasi

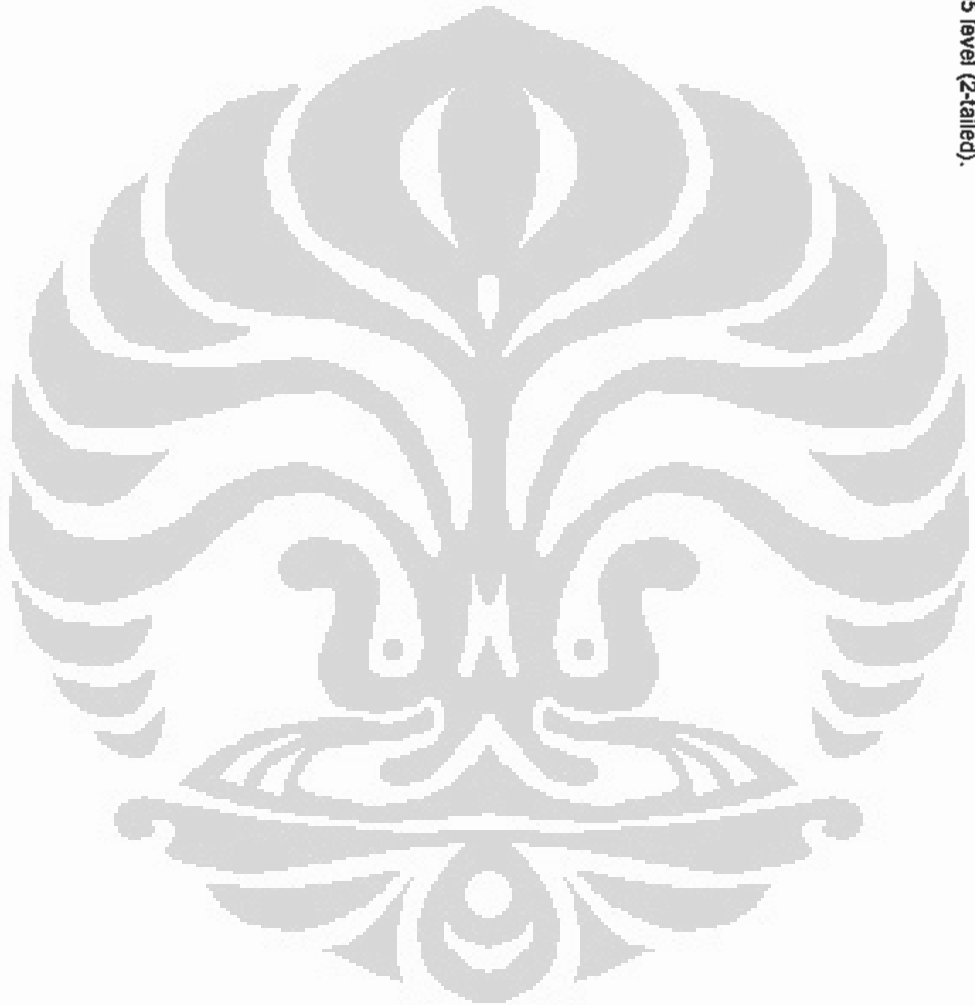
	MeanAtr	MeanAtr	MeanVentr	MeanDiamVir	MeanDiamAtr	TotalnC	TotalEIC	TotalTEC		
MeanAtr	1	.949(**)	-.792(**)	-.838(**)	.061	.485(*)	-.184	-.333	.634(**)	.666(**)
		.000	.000	.000	.778	.016	.389	.111	.001	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
MeanVentr		.949(**)	-.773(**)	-.836(**)	.095	.578(**)	-.255	-.407(*)	.635(**)	.743(**)
		.000	.000	.000	.658	.003	.228	.049	.001	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
MeanDiamVir		-.792(**)	-.773(**)	.968(**)	-.141	-.331	.099	.344	-.374	.393
		.000	.000	.000	.512	.114	.086	.099	.072	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
MeanDiamAtr		-.838(**)	.968(**)	-.146	-.146	-.356	.151	.350	-.408(*)	.572(**)
		.000	.000	.497	.497	.087	.086	.093	.048	.003
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
TotalnC		.061	-.141	-.146	1	-.257	.086	.091	-.378	.00
		.778	.512	.497	.225	.014	.086	.000	.064	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
TotalEIC		.485(*)	-.331	-.356	-.257	1	.086	-.429(*)	.194	.00
		.016	.114	.087	.225	.086	.086	.036	.384	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
TotalTEC		-.184	.099	.151	-.495(*)	.086	1	-.378	.089	.00
		.389	.644	.481	.014	.690	.086	.089	.001	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
AtrNegativ		-.333	-.407(*)	.350	-.715(**)	-.429(*)	.134	1	-.384	.00
		.111	.049	.093	.000	.036	.531	.084	.064	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
TotalCpos		.634(**)	.635(**)	-.408(*)	.352	.194	-.378	1	.064	.00
		.001	.001	.048	.091	.364	.069	.064	.001	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
TotalCpos		.868(**)	.743(**)	-.454(*)	.039	.706(**)	-.132	-.480(*)	.572(**)	.00
		.000	.000	.026	.857	.000	.540	.018	.003	.00
	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24

Korelasi

Kel_usia	Pearson Correlation																													
N	Sig. (2-tailed)																													
24	-.913(**)	.000	24	-.940(**)	.000	24	.923(**)	.000	24	.956(**)	.000	24	-.161	.454	24	-.488(*)	.016	24	.218	.307	24	.436(*)	.033	24	-.555(**)	.005	24	-.616(**)	.00	2

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).





DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN



Jl. Percetakan Negara No. 29
Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012
Telp. (021) 4261088

Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE)

Nomor : LB.03.02/KE/1529/2008

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

**“Kajian lingkungan mikro sel punca pada sistem organ tikus Sprague-Dawley neonatus, dewasa, dan senilis”
(Revisi protokol tanggal 6 Juni 2008)**

yang menggunakan / memanfaatkan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama:

Prof.dr. Jeanne A. Pawitan, MS, Ph.D

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol penelitian.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 6 Juni 2008

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo



Tenascin-C (N-19): sc-9871

BACKGROUND

The Tenascin family of extracellular matrix proteins includes Tenascin (also known as cytotoxin or Tenascin-C), Tenascin-R (also designated Restrictin or Janusin) and Tenascin-X. Tenascin proteins function as substrate-adhesion molecules (SAMs) and are involved in regulating numerous developmental processes, such as morphogenetic cell migration and organogenesis. The Tenascin family proteins arise from various splicing events in the region of coding for FNIII repeats. Tenascin and Tenascin-X are expressed in several tissues during embryogenesis, and in adult tissues undergoing active remodeling, such as healing wounds and tumors. Tenascin-R (TN-R) is expressed on the surface of neurons and glial cells.

REFERENCES

1. Jung, M., Pesheva, P., Schachner, M. and Trotter, J. 1993. Astrocytes and neurons regulate the expression of the neural recognition molecule Janusin by cultured oligodendrocytes. *Glia* 9: 163-175.
2. Schachner, M., Taylor, J., Bartsch, U. and Pesheva, P. 1994. The perplexing multifunctionality of Janusin, a Tenascin-related molecule. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2: 33-41
3. Chiquet-Ehrismann, R. 1995. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 51: 853-862.
4. Eleftheriou, F., Exposito, J.Y., Garrone, R. and Lethias, C. 1997. Characterization of the bovine Tenascin-X. *J. Biol. Chem.* 272: 22866-22874.
5. Faissner, A. 1997. The Tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res.* 290: 331-341.
6. Srinivasan, J., Schachner, M. and Catterall, W.A. 1998. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules Tenascin-C and Tenascin-R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15753-15757.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: TNC (human) mapping to 9q33; Tnc (mouse) mapping to 4 C1.

SOURCE

Tenascin-C (N-19) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the N-terminus of Tenascin-C of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-9871 P, (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

APPLICATIONS

Tenascin-C (N-19) is recommended for detection of Tenascin-C of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000) and immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500).

Suitable for use as control antibody for Tenascin-C siRNA (h): sc-43186 and Tenascin-C siRNA (m): sc-43187.

Molecular Weight of Tenascin-C: 220 kDa.

Positive Controls: U-87 MG cell lysate: sc-2411.

RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 (dilution range: 1:2000-1:100,000) or Cruz Marker™ compatible donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2033 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blotto A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunofluorescence: use donkey anti-goat IgG-FITC: sc-2024 (dilution range: 1:100-1:400) or donkey anti-goat IgG-TR: sc-2783 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941.

SELECT PRODUCT CITATIONS

1. Schumacher, K., et al. 2003. Characterization of microfibers at the interface between the renal collecting duct ampulla and the cap condensate. *Nephron. Exp. Nephrol.* 95: 43-54.
2. Hanekamp, E.E., et al. 2003. Consequences of loss of progesterone receptor expression in development of invasive endometrial cancer. *Clin. Cancer Res.* 9: 4190-4199.

PROTOCOLS

See our web site at www.scbt.com or our catalog for detailed protocols and support products.

goat ABC Staining System: sc-2023



1000 Central Expressway
Santa Cruz, CA 95060
Tel: 831.457.3800 Fax: 831.457.3900
www.scbt.com

PRODUCT

Santa Cruz Biotechnology offers ABC Staining Systems to facilitate the use of our primary antibodies for immunohistochemistry applications. ABC Staining Systems include 1.0 ml normal blocking serum, 250 µg biotinylated secondary antibody, 0.5 ml each avidin and biotinylated horseradish peroxidase (AB reagents), 1.0 ml 50x peroxidase substrate, 1.0 ml 50x DAB chromogen and 3.0 ml 10x substrate buffer. Also included are mixing bottles for the preparation of reagent working solutions. One ABC Staining System contains sufficient reagent for 200 slides.

Solutions to be provided by the researcher are phosphate buffered saline (PBS) prepared in glass distilled H₂O; 0.1–1% hydrogen peroxide (H₂O₂) diluted in PBS, distilled H₂O or methanol (optional); primary antibody; any reagents needed to fix and/or deparaffinize specimens on slides; counterstain (optional); and mounting medium.

PREPARATION OF ABC STAINING SYSTEM WORKING SOLUTIONS

Use only freshly prepared buffers. Prepare all working solutions in the mixing bottles provided. After preparation, insert the drop dispenser top (supplied in inverted position) into the cap in correct orientation. Place the entire unit on the bottle and twist the cap. The drop dispenser will snap into place. To remove the drop dispenser for refilling, press laterally with thumb until the top snaps off. To prevent evaporation, secure the caps on bottles when not in use. After completion of the staining procedure, working solutions should be discarded and mixing bottles washed with distilled H₂O.

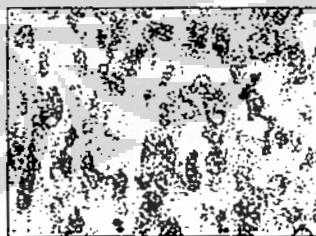
- **Blocking serum:** In mixing bottle 1 (blue cap), combine 75 µl normal blocking serum stock with 5 ml PBS.
- **Biotinylated secondary antibody:** In mixing bottle 2 (green cap), combine 75 µl normal blocking serum stock, 5 ml PBS and 25 µl biotinylated secondary antibody stock.
- **AB enzyme reagent:** In AB mixing bottle (purple cap), combine 50 µl reagent A (avidin), 50 µl reagent B (biotinylated HRP) and 2.5 ml PBS. Mix and let stand for approximately 30 minutes.
- **Peroxidase substrate:** In substrate mixing bottle (yellow cap), combine 1.5 ml distilled H₂O, 5 drops 10x substrate buffer, 1 drop 50x DAB chromogen and 1 drop 50x peroxidase substrate. Sufficient for 15–20 slides.
- See Immunoperoxidase Cell Staining Protocol for tissue section preparation and additional helpful technique notes on our web site at www.scbt.com.

IMMUNOPEROXIDASE STAINING PROCEDURE

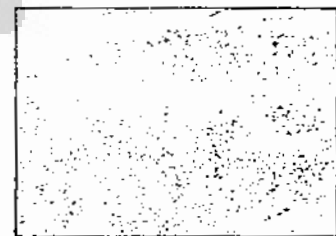
All steps are carried out at room temperature in a humidified chamber. Staining dishes or coplin jars may also be used. Apply sufficient volumes of reagents to completely cover the section; 100 µl is usually adequate, or 1–3 drops of working solutions. Use suction to remove reagents after each step, but avoid drying of specimens between steps.

- **Optional:** After preparation of tissue sections, slides may be incubated for 5–10 minutes in 0.1–1% hydrogen peroxide diluted in PBS, deionized H₂O or methanol to quench endogenous peroxidase activity. Wash in PBS twice for 5 minutes each.

- **Optional:** Incubate sections for one hour in 1.5% blocking serum in PBS (mixing bottle 1). This step may be omitted if non-specific staining is not a problem. Blot excess blocking serum from slides.
- Incubate sections with primary antibody for 30 minutes at room temperature or overnight at 4° C. Optimal antibody concentration should be determined by titration; recommended range is 0.5–5.0 µg/ml, diluted in 1.5% blocking serum in PBS (from mixing bottle 1). Wash with three changes of PBS for 5 minutes each.
- Incubate sections for 30 minutes with biotinylated secondary antibody as prepared in mixing bottle 2 or at approximately 1 µg/ml. Wash with three changes of PBS for 5 minutes each.
- Incubate sections for 30 minutes with AB enzyme reagent (AB mixing bottle). Wash with three changes of PBS for 5 minutes each.
- Incubate sections in 1–3 drops peroxidase substrate (substrate mixing bottle) for 30 seconds–10 minutes or until desired stain intensity develops. The section may be checked for staining by rinsing with H₂O and viewing under a microscope. If necessary, add additional peroxidase substrate and continue to incubate. Wash sections in deionized H₂O for 5 minutes.
- **Optional:** Counterstain sections in Gill's formulation #2 hematoxylin for 5–10 seconds. Immediately wash with several changes of deionized H₂O.
- **Optional:** Destain with acid alcohol and bluing reagent. Wash with tap water.
- For paraffin embedded tissue sections, dehydrate as follows: 2x 95% ethanol for 10 seconds each, 2x 100% ethanol for 10 seconds each, 3x xylenes for 10 seconds each. Wipe off excess xylenes.
- Immediately add 1–2 drops of permanent mounting medium and cover with a glass coverslip. Observe by light microscopy.

DATA

5-11P-26-2023, immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded human colon carcinoma tissue showing nuclear localization.



cytochrome c (C-20) sc-8395, immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded human breast tumor showing cytoplasmic staining.

STORAGE

Store all ABC Staining System components at 2–8° C. **** DO NOT FREEZE **** Stable for one year from the date of shipment.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

Draft naskah publikasi ke Acta Medica Indonesiana

Laporan Penelitian

Ekspresi Tenascin C di Jantung Tikus Neonatus, Remaja dan Dewasa

Penulis :

dr. Radiana D Antarianto

Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Alamat institusi : Jl.Salemba Raya no 6. Jakarta Pusat

Telp 021-3146129. Fax 021-3160108.

email : dr.radiana.antarianto@gmail.com

Prof.dr.Jeanne Adiwinata Pawitan,PhD

Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

email: jeanneadiwip@fk.ui.ac.id

dr. Ahmad Aulia Jusuf, PhD

Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

email: aljuswin04@yahoo.com

Dra. Ria Kodariah, MS

Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Lab Immunopatologi

EKSPRESI TENASCIN C PADA JANTUNG TIKUS NEONATUS, REMAJA DAN DEWASA

Antarianto RD, Pawitan JA, Jusuf AA, Kodariah R

Abstrak

Latar Belakang: Penemuan sel stem jantung (CSC, *cardiac stem cells*) membuktikan jantung sebagai organ dengan pergantian sel-sel parenkim dan non-parenkim di bawah pengaturan kompartemen sel stem. Kemampuan regenerasi jantung berkurang dengan bertambahnya usia. Penyebab penuaan sel stem jantung adalah perubahan pada lingkungan mikro(niche) jantung yang mempengaruhi keberlangsungan hidup sel stem jantung. Tenascin C adalah molekul di niche jantung yang berperan dalam remodeling jaringan jantung dan angiogenesis, dua komponen penting dalam regenerasi jantung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi Tenascin C pada jantung dalam proses penuaan.

Metode: Desain penelitian ini adalah komparatif potong lintang dengan subyek 30 tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan usia. Setelah fiksasi intravital dilakukan pengambilan organ jantung. Dilakukan proses pembuatan sediaan mikroskopik dilanjutkan dengan pewarnaan HE dan imunohistokimia Tenascin C. Imunoreaktivitas tenascin C di sel otot jantung dideskripsikan lokasi dan intensitas pewarnaan tenascin C [diberi skor 1(lemah) sampai 3(kuat)]. Dari 100 sel otot jantung di atrium dan 100 sel di ventrikel ditentukan tingkat positivitas tenascin C di jantung tikus neonatus, remaja dan dewasa.

Hasil : Ekspresi tenascin C ditemukan pada jantung tikus neonatus, remaja dan dewasa. Pola ekspresi tenascin C adalah positif intra sel(sitoplasmik), ekstra sel (membranous) dan kombinasi (intra dan ekstra sel). Positivitas tenascin C paling banyak ditemukan di jantung neonatus, baik di atrium maupun ventrikel. Positivitas tenascin C berkurang pada jantung remaja dan dewasa. Ventrikel jantung dewasa paling tinggi jumlah sel-sel yang negatif tenascin C.

Kesimpulan : Ekspresi tenascin C ditemukan di jantung neonatus, remaja dan dewasa. Semakin bertambah usia jantung terjadi penurunan positivitas tenascin C.

Kata kunci : *Tenascin C, morfometri jantung, niche jantung, penuaan*

ABSTRACT

Background: Discovery of Cardiac Stem Cells(CSC) showed the heart as renewable organ with parenchymal and non-parenchymal cells turnover governed by stem cells compartments. Cardiac regenerative ability decreases with advancing age. The cause of CSC's aging is the changes in cardiac microenvironment (niche) that surrounds CSC. Tenascin C is a major glycoprotein in cardiac niche that plays a vital role in cardiac remodelling and angiogenesis, two main components of cardiac regeneration. This study aims to describe immunoreactivity of tenascin C in rat cardiac of three different age group.

Methods: Design of this study is comparative cross sectional with 30 rats divided in to three groups based on age. The subjects underwent intravital fixation and cardiac organ

was removed. Microscopic specimens were made and stained with hematoxylin-Eosin and tenascin C immunohistochemistry. Immunoreactivity of tenascin C for cardiomyocyte was describe for location and intensity of staining [scored 1 (weak) to 3(strong)]. From 100 cardiomyocytes in the atrium and 100 cardiomyocytes in the ventricle, possitiveness of tenascin C immunoreactivity was determined.

Result : Tenascin C immunoreactivity was found in neonate, adolescence and adult cardiac. Immunoreactivity was found intra cellular (cytoplasmic), extra cellular (membranous) and both (intra and extra cellular). Possitiveness of tenascin C immunoreactivity is highest in neonatal rat cardiac, at the atrium and ventricle. Reduced possitiveness was found in adolescence and adult rat cardiac. Adult rat ventricle showed most abundant cardyomiocites negative for tenascin C.

Conclusions : Expression of tenascin C was found in neonate, adolescence and adult rat cardiac tissue. With advancing age, we found reduced tenascin C possitiveness.

Keywords : *Tenascin C, cardiomyocyte morphometry, cardiac niche, aging*

Pendahuluan

Kita semua berasal dari satu sel tunggal (zigot) yang merupakan hasil fertilisasi ovum dan sperma. Zigot akan berkembang menjadi embrio, yang melalui proses diferensiasi selanjutnya menjadi berbagai macam sel, jaringan, organ, sistem organ dan keseluruhan organisme. Sel-sel embrio memiliki kemampuan diferensiasi menjadi seluruh jenis jaringan di tubuh kita, bersifat totipotensial dan dinamakan sel stem. Namun keberadaan sel stem tidak terbatas pada embrio saja. Selain jaringan ekstra-embrional seperti plasenta dan tali pusat, sel stem juga berada di hampir semua organ dewasa. Ditemukannya *adult stem cells* di beberapa organ antara lain sumsum tulang, kulit, susunan saraf pusat, hepar, traktus gastrointestinal dan otot skelet mendorong pencarian *adult stem cells* di organ-organ lain, termasuk jantung.¹

Konsep jantung sebagai organ berdiferensiasi terminal, yang tidak memiliki kemampuan regenerasi kini perlu ditinjau kembali. Jantung sebagai organ yang dapat memperbaharui dirinya sendiri dengan pergantian sel-sel parenkim dan non-parenkim jantung diatur oleh kompartemen sel stem dan kemampuan sel-sel stem tersebut untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi. Regenerasi mengikuti hierarki tipe-tipe sel yaitu: sel stem yang membelah diri dengan lambat menurunkan sel-sel progenitor *lineage restricted* yang aktif berproliferasi secara cepat, yang kemudian menurunkan prekursor-prekursor berkomitmen yang pada akhirnya berhenti berkembang (*growth arrest*) dan mengalami diferensiasi terminal.²

Usaha pertama untuk menjelaskan keberadaan sel stem jantung dilakukan oleh Rudnicki dan kawan-kawan, yang mengisolasi populasi sel *Hoechst effluxing* dari jantung mencit berusia 2 bulan. Sel-sel serupa yang mengekspresikan MDR1 atau transporter ABC sebanding telah ditemukan di organ-organ lain dan disebut populasi sel-sel cadangan. Sel-sel yang diduga sel stem jantung ini tidak mengekspresikan penanda sel-sel hematopoetik. Sel-sel tersebut ketika dikultur di medium metilselulose membentuk koloni dan setelah dikultur bersama kardiomyosit matur, berdiferensiasi menjadi kardiomyosit yang mengekspresikan connexin43.³

Proliferasi kardiomyosit berbanding lurus dengan jumlah kardiomyosit, tidak terdapat metodologi lain untuk menyatakan penambahan jumlah sel otot jantung yang menandakan regenerasi jantung selain morfologi kuantitatif (*Quantitative morphology*). Penanda biokimia, molekuler, fisiologis, autoradiografi hanya dapat memberi kesan terjadinya regenerasi.⁴

Kemampuan regenerasi jantung berkurang dengan bertambahnya usia, dan faktor risiko penyakit jantung yang signifikan adalah usia lanjut. Potensi terapi sel stem memberikan harapan baru untuk penderita penyakit jantung yang membutuhkan transplantasi jantung. Kini, terapi sel stem pada infark miokard akut telah dilakukan dengan cara isolasi sel stem dari darah perifer, purifikasi dan kultur *ex vivo* kemudian diinjeksikan intrakoroner ke pasien infark miokard (Strauer et al,⁵ TOPCARE-AMI,⁶ Boost, Fernando-Aviles⁷). Potensi regenerasi sel stem residen jantung sendiri secara endogen berperan dalam homeostasis jantung dan mekanisme reparasi jantung. Namun demikian tampaknya hal tersebut tidak cukup untuk menangani penyakit jantung pada lansia, karena diduga terjadi perubahan yang berkaitan dengan penuaan pada sel stem residen jantung dan sel progenitor jantung. Perubahan ini meliputi berkurangnya jumlah dan fungsi sel-sel progenitor endotel yang bersirkulasi. Sel-sel progenitor endotel tersebut berperan dalam neovaskularisasi.

Kematian sel terjadi akibat akumulasi kerusakan oksidatif, pemendekan telomere dan hilangnya kemampuan proliferasi sel. Anversa dan kawan-kawan⁸ memulai penelitian tentang efek penuaan dan perubahan senilis pada populasi sel stem jantung. Pemeriksaan histologi jaringan jantung pasien-pasien dengan penyakit kardiovaskuler

menunjukkan sel stem jantung c-kit⁺ mengalami apoptosis dan mengekspresikan *cyclin dependent kinase p16^{INK4a}*. Pada mencit, apoptosis CSC (*Cardiac Stem Cells*) lebih sering ditemukan di hewan-hewan tua, dan panjang telomere CSC juga berkurang dengan pertambahan usia. Penelitian ini menyatakan bahwa sel stem jantung juga mengalami perubahan senilis dengan bertambahnya usia, mirip dengan sel-sel kardiomyosit dewasa. Hal ini kontradiktif dengan kemampuan sel stem untuk memperbaharui diri (*self-renewing*) atau mengembalikan jumlah populasinya. Penyebab perubahan senilis sel stem jantung diduga adalah berubahnya lingkungan mikro (*CSC niche*) akibat proses penuaan. Perubahan lingkungan mikro tersebut dapat menghambat kemampuan sel stem. Oleh karenanya penelitian tentang perubahan-perubahan yang terjadi pada lingkungan mikro sel stem jantung akibat proses penuaan dapat memberikan dasar pengembangan terapeutik yakni meningkatkan kemampuan regenerasi sel stem residen jantung sendiri lewat transfer faktor pertumbuhan, sitokin atau protein tertentu.¹¹

Di antara faktor-faktor pertumbuhan, sitokin dan protein yang diduga meningkatkan fungsi regenerasi sel stem jantung dan sel progenitor jantung adalah: VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), estrogen, tenascin C, SDF-1 (*Stromal Derived Growth factor-1*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) dan obat golongan statin (*3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors*). Dari seluruh faktor yang disebutkan di atas, tenascin C adalah molekul di matriks ekstrasel jantung yang memiliki beberapa aksi terutama meningkatkan angiogenesis dan regenerasi sel otot jantung yang berasal dari sel stem jantung.^{9,10,11}

Tenascin C merupakan protein heksamer yang disatukan oleh ikatan disulfida antara subunit-subunitnya dengan berat molekul masing-masing subunitnya antara 120–300 kD, tergantung perbedaan ekspresi isoform antar spesies. Salah satu subunitnya mempunyai aktivitas mirip *epidermal growth factor* (*EGF-like*) dengan sifat yang merangsang pertumbuhan. Ekspresi Tenascin-C di jaringan normal, awalnya diisolasi dari jaringan embrional. Di antara molekul matriks ekstrasel, tenascin-C (TNC) dikenal sebagai regulator berbagai fungsi sel selama embriogenesis, penyembuhan luka atau perkembangan ke arah kanker.¹² Tenascin C telah digunakan sebagai penanda lingkungan mikro sel stem neuron atau sel progenitor saraf di ventrikel otak/zona hipokampus.¹³

Pada jantung, TNC muncul di beberapa tahap perkembangan embrionik penting seperti dimulainya diferensiasi kardiomyosit atau angiogenesis/vaskulogenesis koroner. TNC ekspresinya kembali muncul setelah cedera miokardium dan mengatur respon sel selama remodeling jaringan dengan cara mengubah perlekatan kardiomyosit ke jaringan ikat, meningkatkan migrasi dan diferensiasi miofibroblas dan menginduksi enzim matrix metallo-proteinase 1 (MMP-1). Beberapa penelitian menggunakan TNC sebagai penanda remodeling jantung pada infark miokard (Imanaka-Yoshida et al, 2001).¹⁴ Percobaan Ballard dan kawan-kawan tahun 2006 menunjukkan tenascin-C berperan penting dalam angiogenesis jantung post natal, yakni sebagai regulator di lingkungan mikro terhadap aktivitas endotel jantung atau aktivitas sel progenitor endotel jantung.¹⁵

Eksresi tenascin C menurun di sumsum tulang yang mengalami penuaan, tapi bagaimana ekspresinya di jaringan jantung dalam proses penuaan belum pernah diteliti sebelumnya.

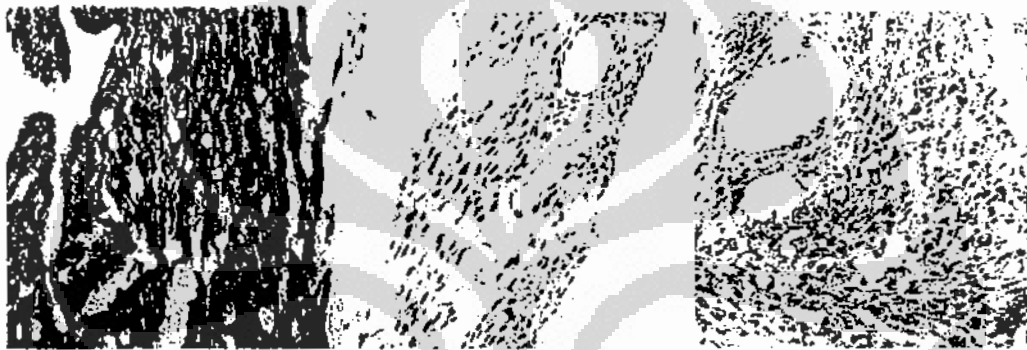
Metodologi Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *comparative cross sectional* dengan tiga kelompok usia : tikus neonatus (1-4 hari), remaja (3-4 bulan) dan dewasa (12-16 bulan). Fiksasi intravital, pengambilan organ jantung, pembuatan sediaan mikroskopik dan pewarnaan HE dikerjakan di Lab Histologi FKUI. Pewarnaan Imunohistokimia Tenascin C dikerjakan di Lab Imunopatologi Departemen Patologi Anatomi FKUI. Penelitian berlangsung dari Desember 2007 sampai September 2008. Protokol pewarnaan imunohistokimia adalah : deparafinisasi dengan serial xylol, rehidrasi dengan alkohol bertingkat, bloking aktivitas endogen peroksidase menggunakan H₂O₂ dalam methanol, pemulihan epitop antigen (*Antigen Retrieval*) TRIS EDTA dan dipanaskan dalam microwave. Bloking aktivitas non spesifik dengan *normal horse serum* (10% v/v serum dalam PBS). Antibodi primer *goat polyclonal anti-human Tenascin C sc-9871* (Santa Cruz) diencerkan 1:300 dengan *antibody diluent with background reducing component* (Dako). Inkubasi slide dengan antibodi primer dalam *moist chamber* semalaman pada suhu 4⁰ C. Inkubasi dengan antibodi sekunder *biotinylated donkey anti-goat IgG* (Santa Cruz). Inkubasi dengan ABC staining system (Santa Cruz). Inkubasi dengan substrat peroksidase (1.6ml dH₂O, 5 tetes

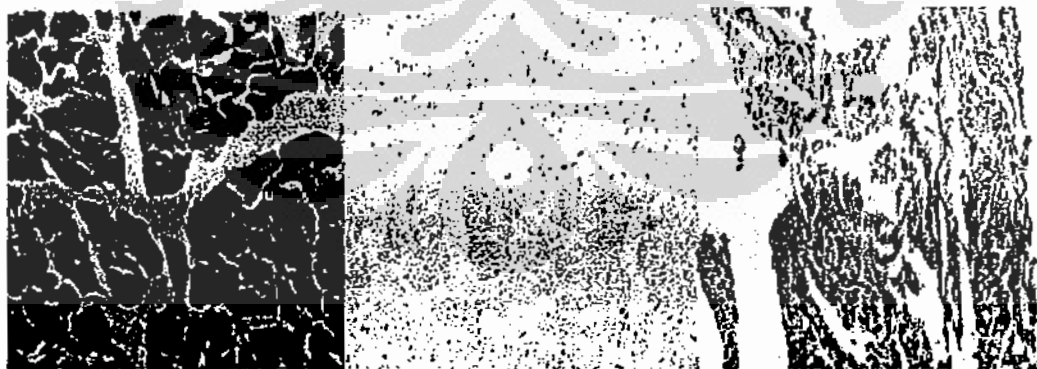
10x substrate buffer, 1 tetes 5% DAB, 1 tetes 50x peroxidase substrate). *Counterstain* dengan Hematoxylin Lili Mayer. Mikrofotografi menggunakan mikroskop foto Olympus yang tersambung langsung ke komputer dan disimpan dalam format tif. dengan software DP2-BSW. Dari foto-foto mikro jantung diambil 2-3 lpb di atrium dan ventrikel jantung. Dideskripsikan lokasi dan intensitas pewarnaan imunohistokimia tenascin C. Kemudian dari 100 sel di atrium dan ventrikel dinilai positività Tenascin C.

Hasil dan Pembahasan

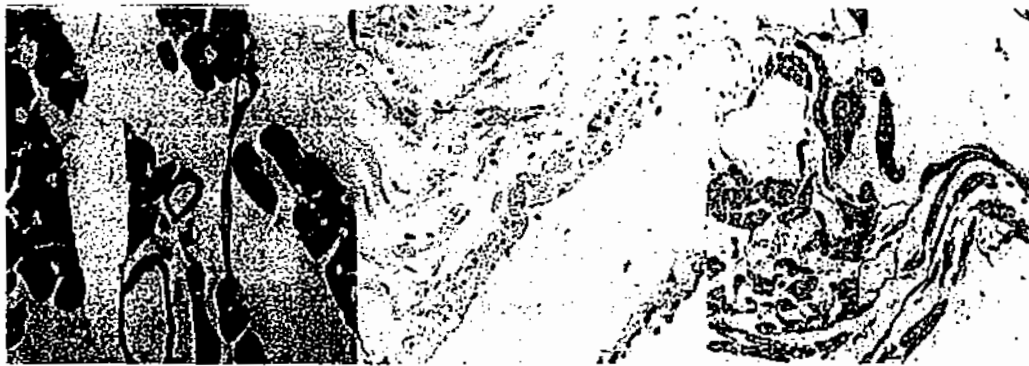
Eksresi Tenascin C di Jantung Tikus Neonatus, Remaja dan Dewasa



Gambar 1. Jantung Neonatus. Dari kiri ke kanan : Pewarnaan HE, Kontrol Negatif dan Imunohistokimia Tenascin C



Gambar 2. Jantung Remaja. Dari kiri ke kanan: Pewarnaan HE, kontrol negatif dan imunohistokimia Tenascin C



Gambar 3. Jantung Dewasa. Dari kiri ke kanan: Pewarnaan HE, kontrol negatif dan imunohistokimia Tenascin C

Eksresi tenascin C ditemukan pada jantung tikus neonatus, remaja dan dewasa. Hal ini berbeda dengan yang dikemukakan Imanaka-Yoshida¹² dkk bahwa jantung normal dewasa tidak mengekspresikan tenascin C. Konsep tersebut didasarkan oleh temuan-temuan penelitian tentang ekspresi tenascin C di serum pasien yang mengalami penyakit jantung dan model hewan dengan penyakit jantung (infark miokard, miokarditis). Hasil penelitian ini membuka khasanah ekspresi tenascin C di jantung remaja dan dewasa normal.

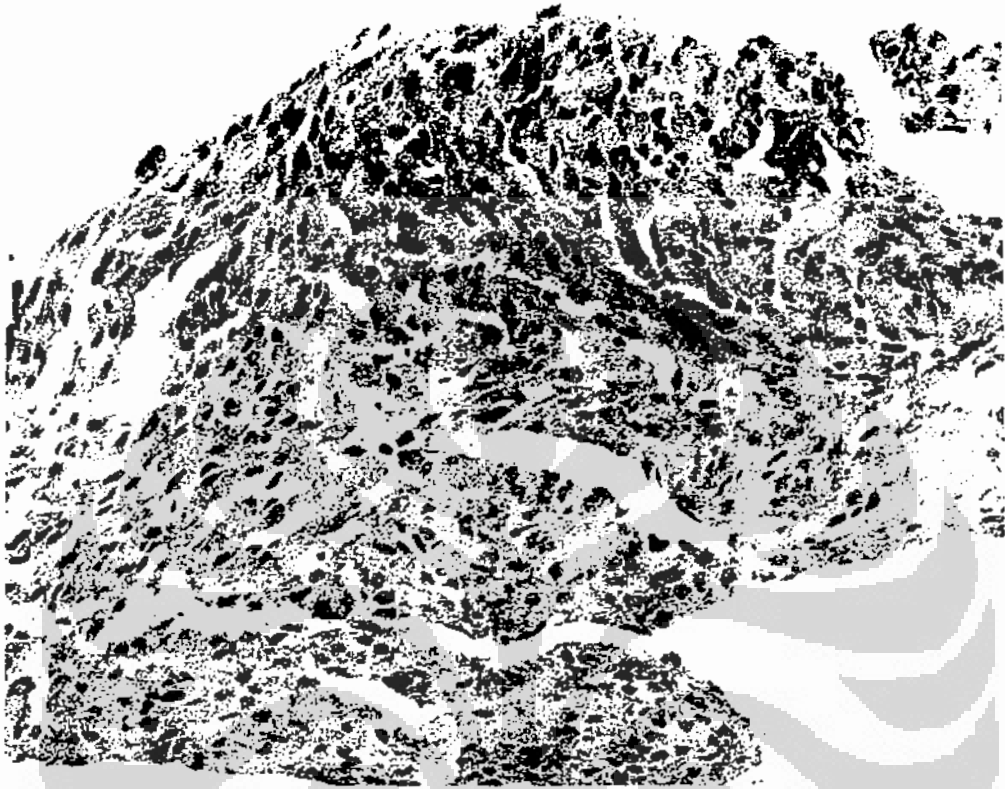
Pewarnaan imunohistokimia menunjukkan pola ekspresi tenascin C terdapat di intrasel otot jantung (sitoplasma), ekstra sel otot jantung (membran sel otot jantung) dan dapat ditemukan baik intra maupun ekstra sel. Tenascin C yang selama ini diketahui sebagai molekul matriks ekstra sel yang disintesis oleh miofibroblas di interstisial jantung ternyata juga diekspresikan oleh sel otot jantung. Hasil ini menguatkan penelitian sebelumnya tentang kemampuan sel otot jantung mengekspresikan tenascin C. Penelitian Yamamoto¹⁶ dkk dengan memberikan *strain* mekanik ke sel otot jantung menunjukkan bahwa *strain* mekanik dapat menginduksi mRNA tenascin C (3.9 ± 0.5 -kali lipat, $p < 0.01$, $n = 13$) dan meningkatkan kadar protein tenascin-C protein. Ekspresi tenascin C di intra sel (sitoplasmik) sel otot jantung menandakan tenascin C disintesis di sel otot jantung. Ekspresi tenascin C di ekstra sel (membran sel otot jantung) menandakan transport protein tenascin C dari sel otot jantung ke matriks ekstra sel jantung.



Gambar 4. Pola ekspresi sitoplasmik (intra sel) tenascin C

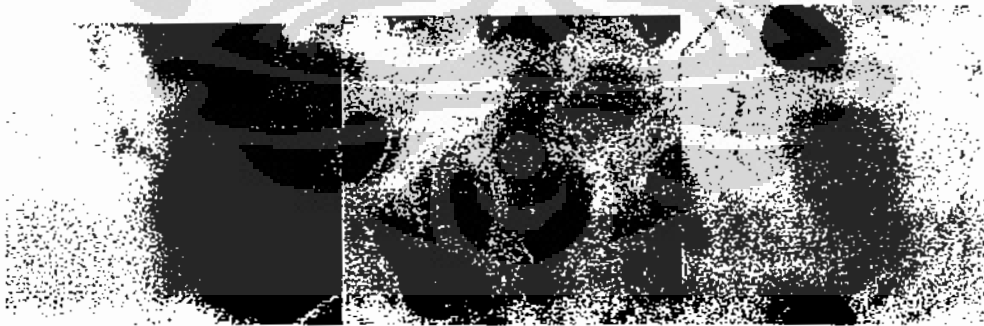


Gambar 5. Pola ekspresi membranous (ekstra sel) tenascin C



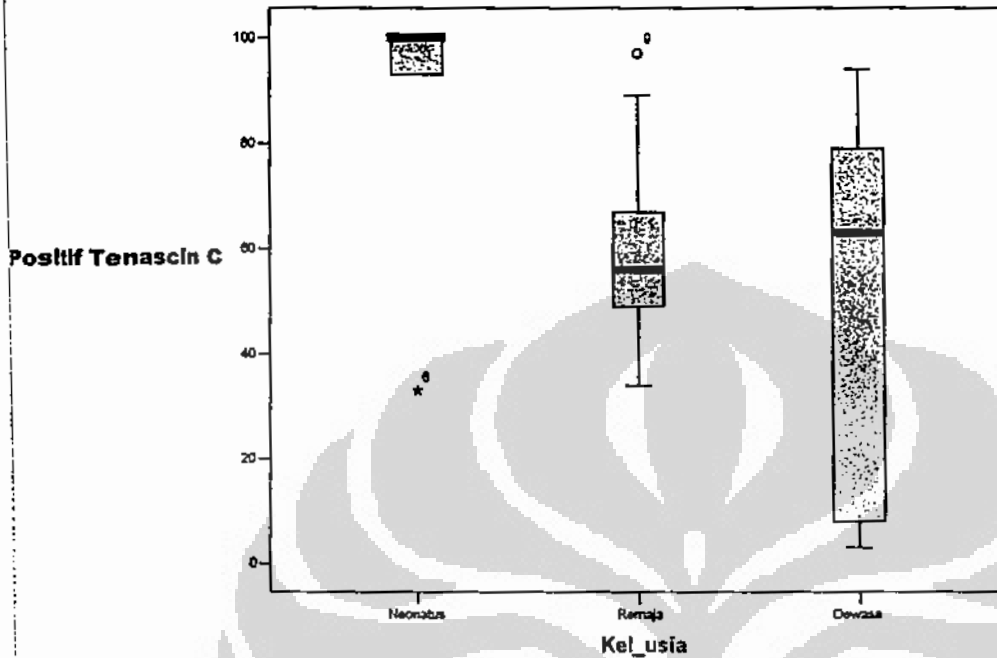
Gambar 6. Pola ekspresi intra dan ekstra sel tenascin C (kombinasi)

Penilaian intensitas pewarnaan imunohistokimia berdasarkan sistem skoring. Berikut adalah skor intensitas berdasarkan intensitas pewarnaan kontrol positif.



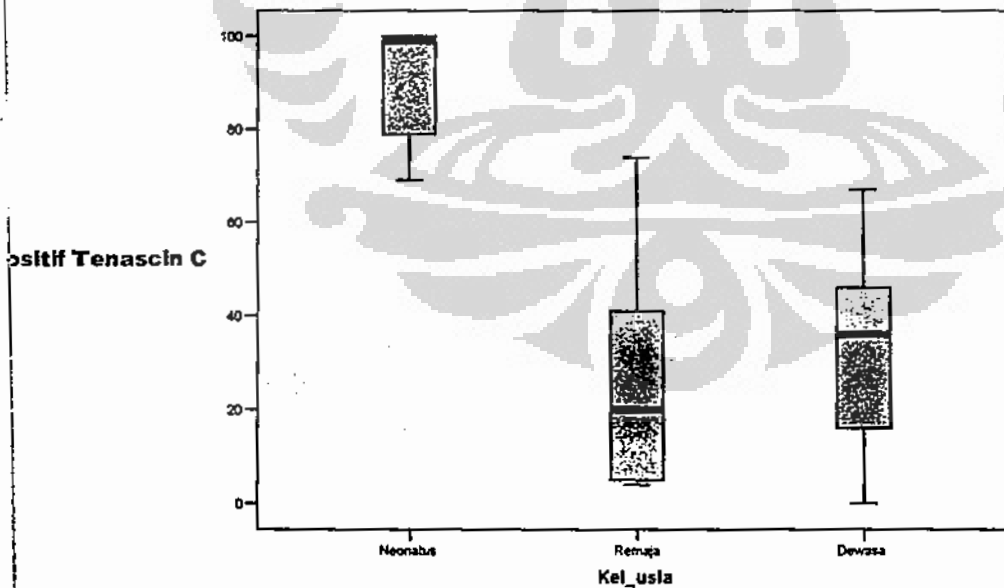
Gambar 7. Skoring intensitas pewarnaan imunohistokimia tenascin C. Dari kiri ke kanan : Skor 3, skor 2 dan skor 1.

Hasil perhitungan dari 100 sel di atrium jantung tikus neonatus, remaja dan dewasa adalah sebagai berikut :

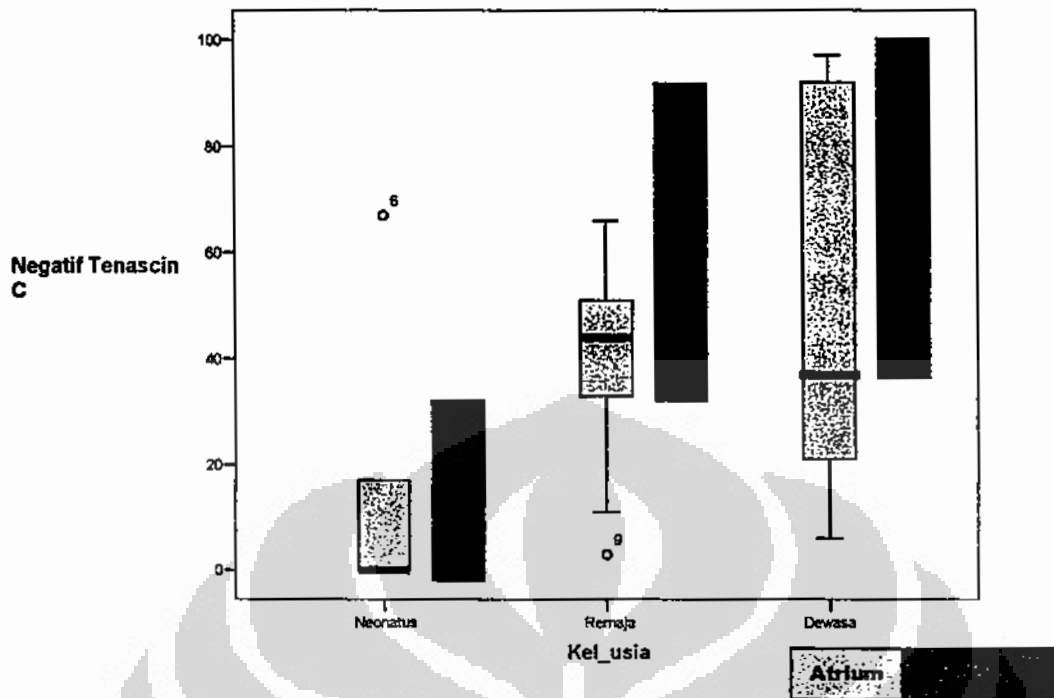


Grafik 1. Kisaran jumlah sel otot jantung atrium yang positif tenascin C berdasarkan kelompok usia

Hasil perhitungan dari 100 sel di ventrikel jantung tikus neonatus, remaja dan dewasa adalah sebagai berikut :



Grafik 2. Kisaran jumlah sel otot jantung ventrikel yang positif tenascin C berdasarkan kelompok usia



Grafik 3. Kisaran jumlah sel otot jantung negatif ekspresi tenascin C di jantung berdasarkan kelompok usia

Dari ketiga grafik tersebut, terlihat bahwa positivitas tenascin C paling banyak ditemukan di jantung neonatus, baik di atrium maupun ventrikel. Positivitas tenascin C berkurang pada jantung remaja dan dewasa. Ventrikel jantung dewasa paling tinggi jumlah sel-sel yang negatif tenascin C. Hal ini menunjukkan penurunan positivitas tenascin C atau penurunan ekspresi tenascin C di niche jantung. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek penurunan ekspresi tenascin C di niche jantung dalam proses penuaan dengan kondisi sel stem jantung di dalam niche.

Uji normalitas dan homogenitas data menunjukkan distribusi normal dan data ketiga kelompok usia homogen. Untuk melihat apakah perbedaan jumlah sel otot yang positif mengekspresikan tenascin C di atrium dan ventrikel jantung antara ketiga kelompok usia bermakna atau tidak dilakukan uji Anova. Analisis perbandingan (*multiple comparison*) dengan LSD menunjukkan perbedaan antar kelompok usia satu dengan yang lain. Secara statistik, perbedaan jumlah sel otot jantung yang positif mengekspresikan tenascin C di atrium jantung kelompok neonatus dan remaja tidak berbeda bermakna. Namun, antara kelompok neonatus dan dewasa, perbedaan positivitas tenascin C di

atrium berbeda bermakna. Perbedaan positività tenascin C di ventrikel jantung ketiga kelompok usia berbeda bermakna.

Kesimpulan

Eksresi Tenascin C ditemukan di jantung neonatus, remaja dan dewasa. Semakin bertambah usia jantung terjadi penurunan positività Tenascin C di niche jantung.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Prof.dr.Samsuridjal Djauzi ,Sp.PD, KAI atas donasi yang diberikan kepada peneliti untuk memulai pewarnaan imunohistokimia Tenascin C.

Daftar Pustaka

1. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1373-1416
2. Anversa P, Leri A, Rota M, et al. Concise Review: Stem Cells, Myocardial Regeneration, and Methodological Artifacts. *Stem Cells.* 2007; 25(3): 589-601
3. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol.* 2004; 265: 262-275
4. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344:1750-7
5. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002; 106: 1913-1918
6. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002; 106: 3009-3017.
7. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004; 95: 742-748.
8. Anversa P, Rota M, Urbanek K, Hosoda T, Sonnenblick EH, Leri A, Kajstura J, Bolli R. Myocardial aging—a stem cell problem. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100: 482-493
9. Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1865-1877

10. Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T, Edelberg JM. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res.* 2004; 94: e39–e45
11. Ballard VLT, Edelberg JM. Stem Cells and the Regeneration of the Aging Cardiovascular System. *Circulation Research.* 2007;100:1116
12. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol.* 2004 Apr;19(2):517-25.[Abstract]
13. Yanagisawa M, Yu RK. The Expression and Functions of Glycoconjugates in Neural Stem Cells. *Glycobiology.* 2007
14. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest.* 2001; 81: 1015–1024
15. Ballard VL, Sharma A, Duignan I, Holm JM, Chin A, Choi R, Hajjar KA, Wong SC, Edelberg JM. Vascular tenascin-C regulates cardiac endothelial phenotype and neovascularization. *FASEB J.* 2006; 20: 717–719.
16. Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of Tenascin-C in Cardiac Myocytes by Mechanical Deformation
ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES. *J Biol Chem.* July 30, 1999, 274(31): 21840-21846