

PENGARUH VARIASI *RESTING TIME* PASCA HIPOKSIA PADA KULTUR
MESENCHYMAL STEM CELL TERHADAP EKSPRESI CD73, CD90, CD105
DAN LIN

(Studi Eksperimental in Vitro pada *Human Mesechymal Stem Cell*)

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S2



Oleh :

Muhammad Thorieq Ali

MBK2016010203

PROGRAM PENDIDIKAN MAGISTER ILMU BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2022

TESIS
PENGARUH VARIASI *RESTING TIME* PASCA HIPOKSIA PADA KULTUR
MESENCHYMAL STEM CELL TERHADAP EKSPRESI CD73, CD90, CD105
DAN LIN

(Studi Eksperimental in Vitro pada *Human Mesenchymal Stem Cell*)

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 7 September 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Oleh

Muhammad Thorieq Ali


MBK2016010203


Menyetujui,

Pebimbing


Pembimbing I

Pembimbing II


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050


Dr. dr. Sri Priyantini, SpA
NIK. 210186023

Mengetahui,
Ketua Program Pendidikan Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Islam Sultan Agung


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

SURAT PERNYATAAN

Yang Bertandatangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Thorieq Ali

NIM : MBK 2016010203

Dengan ini menyatakan bahwa tesis saya yang berjudul :

PENGARUH VARIASI *RESTING TIME* PASCA HIPOKSIA PADA KULTUR
MESENCHYMAL STEM CELL TERHADAP EKSPRESI CD73, CD90, CD105
DAN LIN

(Studi Eksperimental *in Vitro* pada *Human Mesenchymal Stem Cell*)

Adalah benar karya saya sendiri dan di dalamnya tidak erdapa karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 19 Juli 2022

Penulis



(Muhammad Thorieq Ali)

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr.Muhammad Thorieq Ali
Tempat/Tanggal Lahir : Kendal, 10 Oktober 1997
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

SMA Ialam Sultan Agung : Lulus tahun 2015
FK UNISSULA Semarang
Prodi Pendidikan Dokter : Lulus tahun 2019
Prodi Profesi Dokter : Lulus tahun 2021
Magister Biomedik FK UNISSULA : 2019-Sekarang

C. Riwayat Kerja

Tahun 2021-2022 : Program Intership Dokter Umum RST dr.Soedjono
Magelang

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Dr.Agus Yulianto M.Si
Ibu : Dr.Endang Lestari M.pd. M.pd.Ked

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb. Alhamdulillahirabbil'alamin, limpahan Puji dan Syukur ke hadirat Allah Yang Maha Kuasa, atas Rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas tesis ini yang berjudul "PENGARUH VARIASI RESTING TIME PASKA HIPOKSIA PADA KULTUR MESENCHYMAL STEM CELL TERHADAP EKSPRESI CD73, CD90, CD105 DAN LIN" sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister pada Fakultas Kedokteran Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Saya menyadari sepenuhnya akan segala keterbatasan dan kekurangan, sehingga tanpa dorongan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, tidaklah mungkin bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, perkenankanlah saya menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH,MH selaku Rektor Unissula beserta para Wakil Rektor yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF dan jajarannya selaku Dekan dan Pimpinan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah memberikan izin kepada saya untuk mengikuti program ini.
3. Assoc.Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si.Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FK Unissula dan sekaligus sebagai pembimbing saya

dalam penelitian, yang telah banyak memberikan waktu luang, kesempatan, dan saran yang membangun untuk penelitian ini.

4. Dr.dr.Sri Priyantini, SpA selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan waktu luang dan saran yang membangun untuk penelitian ini.
5. Dr. dr. Adi Muradi Muhar, Sp.B-KBD ; Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes dan Dr.Ir. Titik Sumarawati, MKes selaku penguji I, II dan III yang telah berkenan untuk menguji serta memberikan segala masukan, saran dan kritik yang sangat membangun untuk penyusunan tesis ini.
6. Seluruh dosen program Magister Biomedik dengan tanpa batasan telah mencurahkan segala ilmu pengetahuan sepanjang masa pendidikan sehingga dapat dijadikan modal utama dalam proses penyusunan tesis ini.
7. Seluruh staf program Magister Biomedik FK UNISSULA yang telah banyak memberikan dukungan dan bantuan selama penyusunan tesis ini.
8. Semua staf Stem Cell & Cancer Research (SCCR) yang telah dengan segala keikhlasan membantu selama proses penelitian berlangsung didalam laboratorium.
9. Semua sejawat dan teman Program Studi Magister Biomedik FK UNISSULA, yang tiada henti memberikan dorongan, serta semangat selama menjalankan proses penelitian.
10. Kedua orang tuaku, Bapak Agus Yulianto dan Ibu Endang Lestari, doa restu kalian adalah kunci keberhasilanku di dunia dan akhirat.
11. Seluruh pihak yang telah membatu dalam semua proses penyusunan tesis yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu. Sehingga tesis ini berhasil saya

selesaikan. Mohon maaf sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang terlibat dalam seluruh tahapan penyusunan tesis ini, atas segala kata-kata dan perilaku saya yang kurang berkenan di hati. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat untuk semua pihak terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan.

Semarang, 3 Agustus 2022

Penulis

(Muhammad Thorieq Ali)



ABSTRAK

PENGARUH VARIASI *RESTING TIME* PASCA HIPOKSIA PADA KULTUR *MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI CD73, CD90, CD105 DAN LIN

(Studi Eksperimental in Vitro pada *Human Mesenchymal Stem Cell*)

Pendahuluan

Mesenchymal Stem Cell (MSC) merupakan salah satu metode terapi baru yang diharapkan efektif untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Prakondisi hipoksia pada saat kultur MSC dilaporkan meningkatkan ekspresi *Stemness Marker* MSC serta meningkatkan proliferasi MSC. Namun, kondisi hipoksia yang tidak terkontrol akan menyebabkan stres pada sel. Penelitian ini bertujuan untuk menilai tingkat ekspresi penanda sel induk positif (CD73, CD90 dan CD105) pada 0 sampai 4 jam reoksigenasi/resting setelah pra-kondisi hipoksia.

Metode

Sampel penelitian ini adalah sel punca mesenkim manusia tali pusat (UC-HMSC) yang dikondisikan di bawah hipoksia O₂ 5%. Sampel dibagi menjadi tiga kelompok: Kontrol (0 jam reoksigenasi), P1 (2 jam reoksigenasi), P2 (4 jam reoksigenasi). Sel MSC pra-kondisi kemudian dievaluasi menggunakan flow cytometry untuk menilai kadar CD105, CD73, CD90 dan LIN.

Hasil

Persentase kadar CD73 meningkat secara signifikan pada sampel sel yang telah melalui 4 jam reoksigenasi dibandingkan dengan sel yang tidak melaluinya ($p < 0,05$). Kadar CD90 dan CD105 juga meningkat tetapi tidak setinggi CD73, namun *trend* peningkatan CD90 dan CD105 ditemukan tanpa perbedaan yang bermakna secara statistik ($p > 0,05$).

Kesimpulan

Reoksigenasi MSC setelah pra-kondisi hipoksia meningkatkan ekspresi *Stemness marker* MSC. Kemampuan imunomodulasinya meningkat, ditandai dengan peningkatan CD73 yang signifikan. Peningkatan ini dapat disebabkan oleh proses hipoksia atau karena peningkatan Spesies Oksigen Reaktif selama reoksigenasi.

Kata kunci: Mesenchymal Stem Cell, *Stemness marker*, hypoxia pre-conditioning, reoksigenasi sel, CD105, CD73, CD90, LIN

ABSTRACT

CELL REOXYGENATION EFFECT ON CD105, CD73, CD90 AND LIN EXPRESSION OF HYPOXIA PRE-CONDITIONED MESENCHYMAL STEM CELL

Introduction

Mesenchymal Stem Cell (MSC) is one of novel therapeutic methods which is expected to be effective to cure various diseases. Hypoxic pre-conditions at the time of MSC culture were reported to increase the expression of MSC stemness markers as well as increase MSC proliferation. However, uncontrolled hypoxia conditions will cause stress to cells. This study aimed to assess the level of expression of positive stem cell markers (CD73, CD90 and CD105) at 0 to 4 hours of reoxygenation after hypoxic pre-conditioning.

Method

The sample of this study is umbilical cord human mesenchymal stem cell (UC-HMSC) pre-conditioned under 5% O₂ hypoxia. The samples were divided into three groups: Control (0 hour of reoxygenation), G1 (2 hours of reoxygenation), G2 (4 hours of reoxygenation). Pre-conditioned cells were then evaluated using flow cytometry to assess the levels of CD105, CD73, CD90 and LIN.

Results

The percentage of CD73 levels increased significantly in samples of cells that had gone through 4 hours of reoxygenation compared to cells that had not gone through it ($p < 0,05$). CD90 and CD105 levels also increased but not as high as CD73, however, the increasing trends of CD90 and CD105 were found without any statistically significant difference ($p > 0,05$).

Conclusion

MSCs reoxygenation after hypoxia pre-conditioning increased the expression of MSC stemness markers. Its immunomodulating ability was increased, characterized by a significant upsurge in CD73. This increase could be caused by the hypoxic process or due to an increase in Reactive Oxygen Species during reoxygenation.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, stemness markers, hypoxia pre-conditioning, cell reoxygenation, CD105, CD73, CD90, LIN

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	iv
SURAT PERNYATAAN	vi
RIWAYAT HIDUP.....	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I 1	
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	2
1.3.1. Tujuan Umum	2
1.3.2. Tujuan Khusus	3
1.4. Orisinalitas Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
1.5.1. Manfaat Teoritis	5
1.5.2. Manfaat Praktis	5
BAB II	
TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Ekspresi <i>Cluster Of Differentiation</i> 73 (CD73).....	6
2.2. Ekspresi <i>Cluster Of Differentiation</i> 90 (CD 90).....	7
2.3. Ekspresi <i>Cluster Of Differentiation</i> 105 (CD 105).....	8
2.4. Linage Negative Cells Mesenchymal Stem Cells	9
2.5. Proliferasi	10
2.1.1. Definisi.....	10
2.1.2. Proliferasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC)	10
2.1.3. Lingkungan yang Mempengaruhi Proliferasi	11
2.6. <i>Stemness</i>	13

2.2.1. Definisi.....	13
2.2.2. Penanda <i>Stemness</i> MSC.....	14
2.7. Siklus Sel.....	15
2.3.1. Fase.....	15
2.8. <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC).....	20
2.4.1. Definisi.....	20
2.4.2. Sumber.....	21
2.4.3. Morfologi <i>Mesenchymal Stem Cell</i>.....	22
2.9. Hipoksia.....	22
2.5.1. Definisi.....	22
2.5.2. Hypoxia Inducible-Factors.....	24
2.5.3. Efek Hipoksia terhadap proliferasi MSC.....	26
2.10. <i>Mesenchymal Stem Cell – Hypoxia Conditioned Medium</i> (MSC-HCM).....	27
2.6.1 Definisi.....	27
2.6.2. <i>Soluble Factor</i>	28
2.11. Regulasi Growth Factor pada Proliferasi dan Multipotensi.	29
BAB III 34	
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	34
3.1. Kerangka Teori.....	34
3.2. Kerangka Konsep.....	35
3.3. Hipotesis.....	35
BAB IV 36	
METODOLOGI PENELITIAN.....	36
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	36
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian.....	37
4.3. Variabel.....	38
4.3.1. Variabel Bebas.....	38
4.3.2. Variabel Tergantung.....	38
4.4. Definisi Operasional.....	38
4.5. Instrumen dan Bahan.....	39
4.5.1. Instrumen.....	39

4.5.2. Bahan	40
4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja.....	41
4.6.1. Pengajuan <i>Ethical Clearence</i> Penelitian.....	41
Pengajuan proposal penelitian.....	41
4.6.2. Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	41
4.6.3. Kultur Sel	43
4.6.4. Proses Pemanenan Sel.....	43
4.6.5. Proses Penghitungan Sel	43
4.6.6. Prosedur Hipoksia.....	44
4.6.7. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan <i>Flowcytometri</i>	44
4.6.8. Alur Kerja	47
4.7. Analisis Data	50
4.8. Tempat dan Jadwal Pelaksanaan Penelitian	50
4.8.1. Tempat Penelitian	50
4.8.2. Waktu Penelitian	50
BAB V 52	
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	52
5.1 Hasil Penelitian.....	52
5.1.1 Kadar marker stemness.....	54
5.2 Pembahasan Hasil.....	61
5.3 Kelemahan Penelitian	67
BAB VI 69	
KESIMPULAN DAN SARAN.....	69
6.1 Kesimpulan.....	69
6.2 Saran	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Ekpresi CD73.....	7
Gambar 2.2 Ekspresi CD105.....	9
Gambar 2.3 Skema Siklus Sel.....	15
Gambar 2.4 Sumber Mesenchymal Stem Cell.....	22
Gambar 2.5 Morfologi MSC.....	22
Gambar 2.6 Regulasi HIFs oleh Hipoksia.....	26
Gambar 2.7 Jalur Sinyal Growth Factor dalam memodulasi proliferasi MSC.....	32
Gambar 5.1 Morfologi MSC pasca kultur Hipoksia.....	52
Gambar 5.3 Uji Diferensiasi Adipogenik.....	53
Gambar 5.4 Uji Diferensiasi Osteogenik.....	54
Gambar 5.5 Hasil Flowsitometri kadar LIN CD90, CD105 dan CD90.....	55
Gambar 5.6 Grafik rerata kadar CD73 setiap kelompok.....	56
Gambar 5.7 Grafik rerata kadar CD105 setiap kelompok.....	57
Gambar 5.8 Grafik rerata kadar CD90 setiap kelompok.....	58
Gambar 5.9 Grafik rerata kadar LIN setiap kelompok.....	59

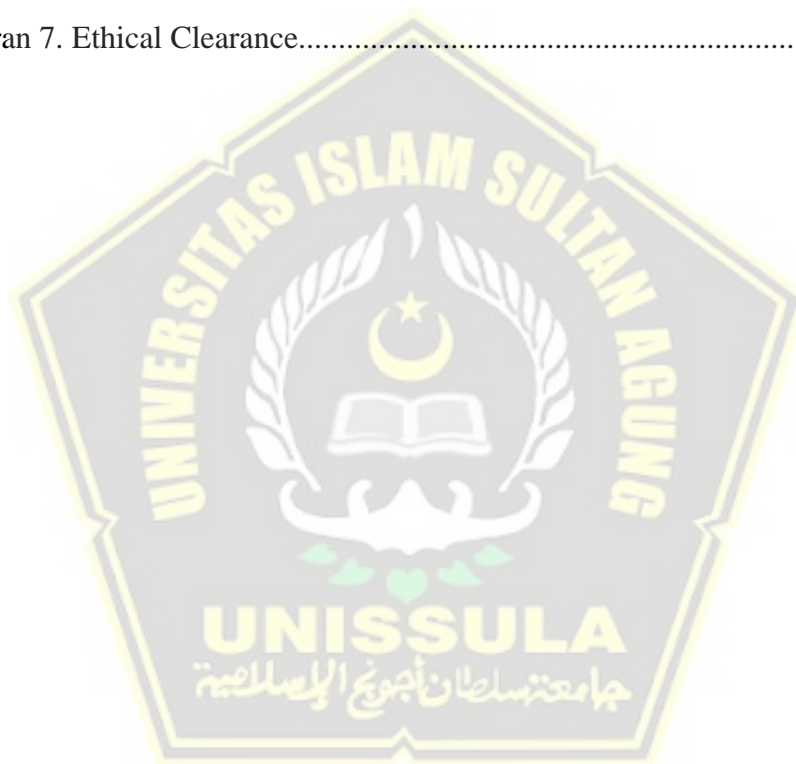
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tahapan Siklus Sel	
Tabel 2.2 Kadar Growth Factor dari berbagai sumber dan proses dari <i>conditioned medium</i>	
Tabel 2.3 Berbagai growth factor beserta efeknya pada proliferasi MSC.....	
Tabel 5.1 Uji Normalitas (saphiro-Wilk).....	54
Tabel 5.2 Uji Homogenitas Data.....	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data kadar LIN, CD90, CD105 dan CD107.....	73
Lampiran 2. Uji Normalitas Saphiro-wilk.....	73
Lampiran 3. Uji Homogenitas (lavene test).....	74
Lampiran 4. Uji One-way ANOVA.....	74
Lampiran 5. Uji Kruskal Wallis.....	75
Lampiran 6. Uji Mann-Whitney.....	75
Lampiran 7. Ethical Clearance.....	76



DAFTAR SINGKATAN

ALK	= <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
AMP	= <i>Adenosine Monophosphat</i>
BM-MSC	= <i>Bone Marrow-Mesechymal Stem Cell</i>
BMP	= <i>Bone Mophogenic Protein</i>
CD 73	= <i>Cluster of Differentiation 73</i>
CD 90	= <i>Cluster of Differentiation 90</i>
CD 105	= <i>Cluster of Differentiation 105</i>
CM	= <i>Conditioned Medium</i>
EGF	= <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	= <i>Epidermal Growth Factor Reseptor</i>
FBS	= <i>Fetal Bofine Serum</i>
FDA	= <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	= <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GH	= <i>Growth Factor</i>
GPI	= <i>Glycosyl-Phospatidylinositol</i>
HB-FGF	= <i>Heparin-Binding Epidermal Growth Factor</i>
HGF	= <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF-1	= <i>Hypoxia Inducible Factors-1</i>
HLA-DR	= <i>Human Leukocyte Antigen –DR Isotype</i>
hMSC	= <i>human Mecenchymal Stem Cell</i>
HSC	= <i>Haematopoietic Stem Cell</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
MAPK	= <i>Mitogen Actifated Protein Kinase</i>
MSC	= <i>Mesechymal Stem Cell</i>
MSC-HCM	= <i>Mesechymal Stem Cell – Hypoxia Conditional Medium</i>
MSC-NCM	= <i>Mesechymal Stem Cell - Normoxia Conditional Medium</i>
OCT4	= <i>Octamer-Binding Transcription Factor 4</i>
PDGF	= <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	= <i>Platelet Derived Growth Factor Reseptor</i>
PI3K	= <i>Phosphoinositide-3 Kinase</i>
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOX2	= <i>Sex Determining Region Y-box2</i>
TGF- α	= <i>Transforming Growth Factor Alpha</i>
TGF- β	= <i>Trabsforming Growth Factor Beta</i>
TGF- β R	= <i>Transforming Growth Factor Beta Reseptor</i>
TNF- α	= <i>Tumor Necrosing Factor-Alpha</i>
VEGF	= <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Mesenchymal Stem Cell merupakan salah satu kandidat terapi baru yang diharapkan efektif untuk berbagai macam penyakit. Banyak penelitian yang menunjukkan efektifitas MSC memperbaiki jaringan yang rusak setelah ditransplantasikan. MSC biasanya diproduksi dengan mengisolasi stem sel dari sumsum tulang, jaringan lemak, korda umbilikal ataupun plasenta. Sel MSC bersifat multipotent sehingga dapat berdeferensiasi menjadi sejumlah jenis sel sesuai dengan jaringan asal mereka. Sifat multipotent dan kemampuan berproliferasi menjadi salah satu tolak ukur kualitas stem sel yang diproduksi. Efek terapeutik dari stem sel juga dipengaruhi oleh kualitas stem sel tersebut serta cara pemberiannya.¹

Kondisi hipoksia akan mengaktifkan Hypoxia induced Factor-1 (HIF-1) dimana faktor ini akan mengaktifkan jalur respon hipoksia. Rangkaian kejadian transkripsional akan meningkatkan kadar protein seperti VEGF dan eritropoietin. Kondisi hipoksia pada saat kultur MSC juga terbukti meningkatkan ekspresi CD73, CD90 dan CD105 sebagai marker penanda MSC sekaligus menunjukkan peningkatan proliferasi MSC.³

Meski begitu, kondisi hipoksia yang tidak terkontrol mampu menimbulkan stress cell. Aktivasi HIFs menimbulkan perubahan metabolisme sel sebagai respon terhadap hipoksia, akibatnya terjadi penumpukan Reactive Oxygen⁴

Species (ROS) yang memicu stress cell oksidatif. MSC yang mengalami stress akan rentan mengalami apoptosis dan rentan mengalami perubahan potensi diferensiasi sehingga tidak berfungsi dengan baik pada organ transplan.⁴ Reoksigenasi/Resting Stem cell pada kondisi oksigen normal (normoksia) dianggap mampu mengurangi stress cell yang terjadi pada MSC pasca kultur hipoksia sehingga sel lebih siap ditransplantasikan.

Belum ada penelitian yang menunjukkan ekspresi CD73, CD90 dan CD105 sebagai marker *stemness* sel stem pada kondisi oksigen normal (Normoksia) pasca kultur hipoksia. Oleh karena itu penelitian ini berusaha menilai kadar ekspresi marker-marker positif stem cell (CD73, CD90 dan CD105) pada 0 jam hingga 4 jam setelah kultur hipoksia. Dengan begitu, data yang dihasilkan dari penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan dalam menilai waktu yang paling tepat menggunakan MSC sebagai terapi penyakit setelah dikultur dalam kondisi hipoksia.

1.2. Rumusan Masalah

Adakah pengaruh variasi *resting time* pasca hipoksia pada kultur *Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi CD73, CD90, CD105 Dan LIN

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh variasi *resting time* paska hipoksia pada kultur *Mesenchymal Stem Cell* terhadap stemness marker MSC

1.3.2. Tujuan Khusus

- Mengetahui pengaruh variasi resting time 0 jam, 2 jam dan 4 jam paska hipoksia pada kultur *Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi CD73
- Mengetahui pengaruh variasi resting time 0 jam, 2 jam dan 4 jam paska hipoksia pada kultur *Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi CD90
- Mengetahui pengaruh variasi resting time 0 jam, 2 jam dan 4 jam paska hipoksia pada kultur *Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi CD105
- Mengetahui pengaruh variasi resting time 0 jam, 2 jam dan 4 jam paska hipoksia pada kultur *Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi LIN (*Lineage Negative*)

1.4. Orisinalitas Penelitian

Beberapa penelitian terdahulu sudah menjelaskan pengaruh kultur hipoksia terhadap proliferasi dan ekspresi marker-marker Stem cell. Perbedaan perlakuan biasanya terletak pada lama waktu kultur hipoksia, kadar atau tekanan O₂ atau medium yang dipakai pada saat kultur. Belum ada penelitian yang menjelaskan efek resting time, atau lama waktu sel diinkubasi pada suhu 37^o C dan tekanan oksigen atmosfer (20%) setelah dikultur. Oleh karena itu penelitian kali ini akan dilakukan resting pada MSC setelah dikultur hipoksia

untuk melihat efeknya terhadap jumlah proliferasi serta kadar CD73, CD90 dan CD105 sebagai penanda kemampuan multipotensinya.

NO	Penulis, tahun	Judul	Hasil Penelitian
1	B. Antebi, L.Rodriguez, K. Walker et al. 2018	Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells	Pada Kultur hipoksia jangka panjang (10 Hari), ekspresi CD44 dan CD105 menurun dan MSC berproliferasi lebih lambat secara signifikan dibanding MSC yang dikultur hipoksia (1% O ₂) jangka pendek (48 jam). Terdapat peningkatan metabolisme MSC pada kedua kelompok. Terjadi peningkatan VEGF dan penurunan HMGB1, BCL-2 dan CASP3 pada kedua kelompok. Sitokin proinflamasi IL-8 ditekan dan sitokin anti-inflamasi IL-1ra dan GM-CSF meningkat pada kelompok hipoksia jangka pendek.
	Metode	MSC manusia dan tikus dikultur hipoksia secara jangka panjang (10 hari) dan jangka pendek (48 jam) pada kadar oksigen 1%. Penelitian juga mengevaluasi karakteristik MSC yang dikultur hipoksia pada kadar O ₂ 2% dan 5%, kemudian dinilai aktivitas metabolik, proliferasi, viabilitas, klonogenesitas, ekspresi gen dan kapasitas sekretornya.	
2	V.Yustianingsih, T. Sumarawati, A. Putra. 2018	Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells	Penambahan Hypoxia Conditioned Medium (HCM; O ₂ 5%) pada Normoxic Medium (NM) untuk kultur hUC-MSC menunjukkan perbedaan ekspresi CD73, CD90 dan CD105 serta jumlah proliferasi MSC pada semua dosis rasio (HCM:NM)
	Metode	Studi post test only dengan grup kontrol menggunakan hUC-MSC manusia yang dibagi menjadi 4 kelompok. Tiga kelompok HCM dengan rasio HCM:NM (25%, 50%, 75% untuk P1, P2 dan P3) dan 1 kelompok kontrol NM (oksigen 20%). Data diambil setelah inkubasi selama 72 jam. Ekspresi CD105, CD73 dan CD90 d	

3	D.Kim, Y. Ko, M. lee et al. 2016	Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells	Penelitian menunjukkan bahwa kultur jangka panjang MSC selama 2 minggu dengan kadar O ₂ 1% menunjukkan peningkatan proliferasi dan viabilitasnya. Selama kultur jangka panjang (hingga 8 minggu) hipoksia menekan perubahan fenotip MSC seperti penambahan volume sel, perubahan morfologi dan ekspresi Senescence-associated-B-gal. Hipoksia juga meningkatkan gen stemness dan <i>chemokine-related gene</i> OCT4 dan CXCR7. Ekspresi KLF4, C-MYC, CCL2, CXCL9, CXCL10 dan CXCR4 tidak menurun dibanding MSC dengan kultur normoksia.
Metode	MSC manusia dikultur hipoksia selama 8 minggu kemudian dinilai beberapa poin berikut setiap minggunya : tingkat proliferasi, morfologi, ukuran sel, senescence, karakteristik immunofenotip,ekspresi marker, kemokin dan sitokin		

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan ilmu tentang pengaruh lama waktu *resting time* MSC setelah intervensi hipoksia pada kemampuan proliferasi yang ditandai dengan ekspresi CD73, CD90 dan CD105

1.5.2. Manfaat Praktis

Memberikan sumber informasi pada masyarakat mengenai pengaruh lama waktu *resting time* MSC setelah intervensi hipoksia pada kemampuan proliferasi yang ditandai dengan ekspresi CD73, CD90 dan CD105

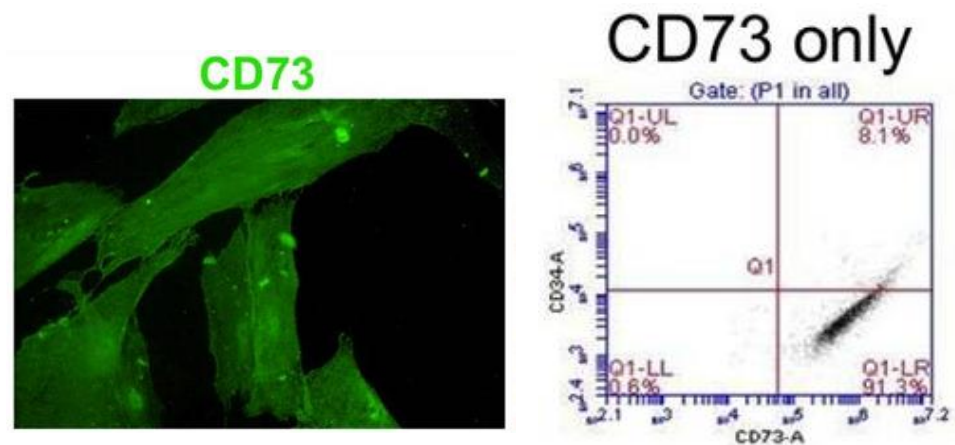
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ekspresi *Cluster Of Differentiation 73* (CD73)

CD73 (ecto-5'-nucleotidase) memiliki peran sebagai enzim yang terletak pada ikatan *glycosyl-phosphatidylinositol* (GPI) dipermukaan membran dan berfungsi untuk hidrolisis *adenosine monophosphate* (AMP) menjadi adenosin dan fosfat. Selanjutnya, adenosin yang dihasilkan dari defosforilasi adenin oleh CD73 akan disekresikan ke ekstraseluler.⁵ Ekspresi CD73 dapat ditemukan dalam berbagai sel seperti sel epitel, sel endotel dan limfosit. Kolon merupakan organ yang paling tinggi mengekspresikan CD73, organ lain selain kolon adalah ginjal, otak, hati, jantung dan yang paling rendah ekspresinya adalah otot.⁶ Ekspresi dari CD73 berfungsi sebagai kontrol terhadap respon inflamasi yang terjadi.⁷

CD73 merupakan salah satu penanda atau marker positif dari *Mesenchymal Stem Cell* (MSC).⁸ Selain menggunakan CD73, CD105 dan CD90 juga digunakan sebagai *marker* positif dalam mengidentifikasi MSC.⁵ Adenosin yang dihasilkan oleh CD73 memiliki potensi differensiasi osteoblastik terhadap MSC.



(a)

(b)

Gambar 2. 1 (a) Ekpresi CD73 tumor desmoid pada pasase awal yang berasal dari MSC melalui *fluorescent immunohistochemistry* (hijau) (b) Hasil sortasi CD73 pada populasi menunjukkan 99.1% positif CD73.⁹

2.2. Ekspresi *Cluster Of Differentiation* 90 (CD 90)

Cluster differentiation 90 (CD90) merupakan penanda protein yang terdapat pada permukaan sel. Pada awalnya penanda protein ini ditemukan pada timosit tikus.¹⁰ CD90 adalah glikoprotein yang melekat ke permukaan sel melalui *glikosilfosfatidlinositol* (GPI). Ekspresi CD90 berbeda antar spesies. Pada manusia, CD90 diekspresikan oleh *stem cell* termasuk *Mesenchymal Stem cells* (MSC), *Hematopoietik Stem Cell* (HSC) dan Sel Batang Keratinositik (KSC) dan berbagai variasi pada jaringan non-limfoid seperti fibroblas, neuron dan sel endotel aktif. CD90 diekspresikan oleh semua MSC, terlepas dari mana sumbernya.¹¹ Ekspresi CD90 yang tinggi juga berkaitan dengan status MSC yang belum berdiferensiasi, karena penurunan tingkat CD90 dapat dikaitkan dengan proses diferensiasi menjadi sel yang lebih spesifik seperti diferensiasi menjadi sel neuron.¹²

CD90 berfungsi dalam inflamasi dan penyembuhan luka melalui proses sintesis dan mengeluarkan faktor pertumbuhan, sitokin, dan

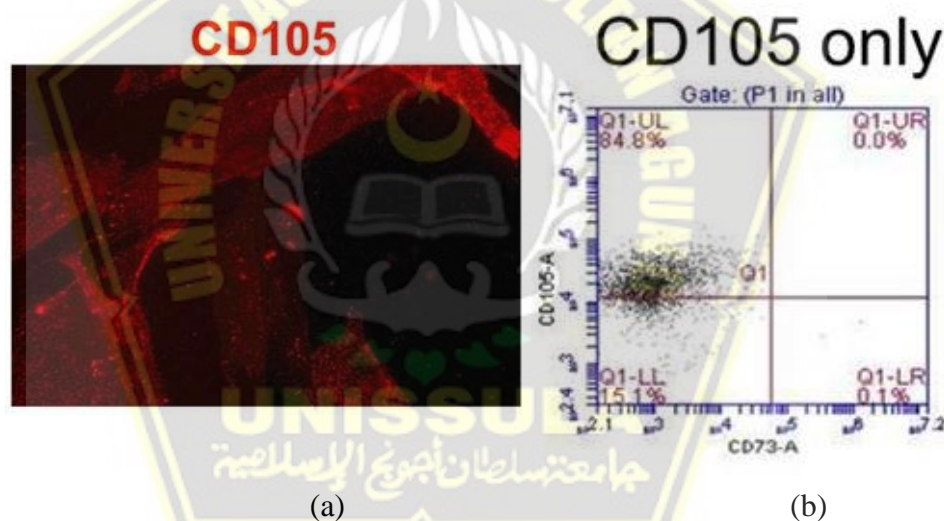
komponen matrix ekstraseluler untuk membantu perbaikan jaringan yang rusak. CD90 berperan diantara mediator inflamasi untuk adhesi sel-matrix dan sel-sel dalam proses respon imun. Contohnya adalah pada monosit terdapat ligan CD90 akan berikatan dengan CD90 yang teraktivasi di endotel selama terjadi inflamasi, terutama dalam migrasi sel imun ke bagian yang inflamasi, jaringan yang rusak dan infeksi.¹³ CD90 juga menghambat *neurite outgrowth* pada astrosit matur (*non-neuronal cells*) dan mungkin berperan dalam pertumbuhan dan diferensiasi dari *stem cell*.¹⁴

2.3. Ekspresi *Cluster Of Differentiation* 105 (CD 105)

CD105 dikenal sebagai endoglin merupakan membran glikoprotein tipe 1 yang terletak pada permukaan sel dan merupakan bagian dari kompleks reseptor *transforming growth factor-β* (TGF-β). CD105 teridentifikasi sebagai *marker* MSC dan akan memberikan hasil positif terhadap ekspresi CD105. Selain pada MSC, CD105 juga mempunyai ekspresi yang tinggi terhadap aktivitas angiogenesis pada pembuluh darah tumor, inflamasi jaringan, proses penyembuhan luka dan saat embriogenesis.¹⁵

Ekspresi CD105 MSC terjadi karena proses dari pengikatan kompleks TGF-β FBS oleh CD105. Dalam proses pengikatan tersebut, dibutuhkan suatu sinyal yang membantu dalam proses pengikatan tersebut, yaitu TGF-βRI dan TGF-βRII. Interaksi yang terjadi antara CD105 dengan TGF-βRI dan TGF-βRII terjadi pada domain ekstraseluler dan sitoplasma CD105, TGF-βRII akan berinteraksi dengan asam amino region 437-558 pada

domain ekstraseluler CD105, sedangkan TGF- β RI tidak hanya berinteraksi dengan asam amino region 437-558 tetapi juga dengan protein region yang terletak diantara asam amino 437 dan N terminus. Kedua *signaling receptor* (TGF- β RI dan TGF- β RII) juga akan berinteraksi pada domain sitoplasma CD105. TGF- β RI hanya berinteraksi ketika kinase pada domain sitoplasma inaktif, sedangkan TGF- β RII dapat berinteraksi saat kinase dalam keadaan aktif maupun inaktif. CD105 akan mengikat TGF- β 1, TGF- β 2, activin-A, *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), dan *bone morphogenetic protein-7* (BMP-7) dan memodulasi respon seluler dependen TGF- β 1 dengan bantuan dari TGF- β RII dan TGF- β RII.¹⁶



Gambar 2. 2 (a) Ekpresi CD105 tumor desmoid pada pasase awal yang berasal dari MSC melalui *fluorescent immunohistochemistry* (merah) (b) Hasil sortasi CD90 pada populasi menunjukkan 84,8% positif CD105.⁹

2.4. Linage Negative Cells Mesenchymal Stem Cells

Mesenchymal stem cell selain punya marker positif, juga mempunyai marker negatif yang disebut dengan Lin (*linage negative*). Marker ini merupakan marker kumpulan dari beberapa surface marker, diantaranya adalah CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79 α atau CD19 dan HLA kelas II yang merupakan penanda hematopoetik. Menurut ICST, marker ini dikategorikan sebagai marker negative yang ekspresinya lebih kurang 5% dari seluruh populasi MSC yang dianalisis.

2.5. Proliferasi

2.1.1. Definisi

Proliferasi sel adalah proses fisiologis yang terjadi pada hampir semua jaringan tubuh manusia pada berbagai keadaan sel untuk berkembang biak. Homeostasis antara proliferasi sel dan kematian sel terprogram (apoptosis) secara normal dipertahankan untuk menyediakan integritas jaringan dan organ.¹⁷ Proliferasi sel dapat dirangsang oleh faktor pertumbuhan intrinsik, jejas, kematian sel, bahkan dapat pula oleh deformasi mekanis jaringan.¹⁸ Mediator kimiawi yang terdapat pada lingkungan mikro setempat dapat menghambat atau merangsang pertumbuhan sel. Kendali pertumbuhan yang terpenting adalah penginduksian sel istirahat (*resting cell*) pada fase G₀ ke siklus sel.^{18,19}

2.1.2. Proliferasi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)

Kemampuan utama *stem cell* dalam memperbaharui diri adalah hal spesifik yang tidak akan dimiliki oleh sel lainnya dan

merupakan upaya sel tersebut untuk mempertahankan multipotensinya bagi keberlangsungan hidup. Klon hasil dari proses perbaharui diri akan tetap memiliki potensi yang serupa dengan sel induk dan berupaya mempertahankan status non-diferensiasi secara terus-menerus hingga suatu saat dibutuhkan kembali memasuki siklus diferensiasi. Hal ini terlihat jelas ketika jaringan mengalami kerusakan, maka *stem cell* segera melakukan proliferasi untuk menghasilkan sel dewasa spesifik yang dibutuhkan untuk reparasi kerusakan jaringan.²⁰

Proses pada saat sel melakukan penggandaan sel tanpa terjadi hambatan itu adalah waktu terjadinya proliferasi sebuah sel. Ada 2 mekanisme membelahnya sel yaitu dengan cara simetris dan asimetris. Pembelahan dengan cara simetris itu sendiri mempunyai tujuan untuk memperbaiki diri dan itu dapat terjadi bila dilakukan oleh sel yang mempunyai karakteristik seperti *stem cell*, dan pembelahan secara asimetris disini bertujuan untuk menghasilkan turunan sel yang terdeferensiasi dan dilakukan oleh sel yang karakteristiknya tidak seperti *stem cell*.²⁰

2.1.3. Lingkungan yang Mempengaruhi Proliferasi

2.1.3.1 Suhu

Suhu tubuh manusia merupakan suhu yang optimal untuk tumbuhnya sel. Berdasarkan perbedaan kondisi suhu tumbuh sel, tempat hidup sel digolongkan menjadi tiga, yaitu : hidup di udara

dingin pada suhu $15 - 20^{\circ}\text{C}$, hidup di udara bersuhu sedang pada suhu $25 - 40^{\circ}\text{C}$, dan hidup di udara panas pada suhu $50 - 60^{\circ}\text{C}$. Untuk inkubasi sel optimal digunakan, suhu 37°C atau sesuai dengan suhu tubuh manusia.²¹

2.1.3.2 Konsentrasi ion hidrogen (pH)

Seringkali asam yang diproduksi oleh sel itu sendiri ketika dibiakkan di laboratorium dapat menghambat pertumbuhan sel. Kondisi tersebut akan menyebabkan pH optimal sel menyempit. Untuk mengatasi hal tersebut, dapar kimia dapat ditambahkan ke dalam media guna mempertahankan pH dan menetralkan asam. Pepton dan Asam amino adalah salah satu contoh dapar kimia yang dapat bekerja pada beberapa media pertumbuhan sel.²¹

2.1.3.3 Tekanan osmotik dan kekuatan ionik

Nutrisi dan air yang berada di lingkungan sekitar dibutuhkan oleh sel untuk tumbuh dengan optimal. Tekanan osmotik merupakan salah satu yang mempengaruhi. Peningkatan tekanan osmotik dapat menyebabkan air keluar dari dalam sel. Maka dari itu, pengendalian faktor-faktor tekanan osmotik dan konsentrasi garam perlu dilakukan supaya tetap pada kadar optimal bagi pertumbuhan sel.²¹

2.1.3.4 Karbon dioksida (CO_2)

Lingkungan terbaik sebagai medium kultur pertumbuhan sel adalah pada kadar 5% CO_2 .

2.1.3.5 Zat kimia

Adapun unsur lain yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel selain air yaitu unsur kimia, diantaranya : karbon, sulfur, fosfor, nitrogen dan unsur kelumit (misalnya : Cu, Zn dan Fe).²¹

2.6. *Stemness*

2.2.1. Definisi

Istilah *stemness* mengacu pada proses molekuler yang umum terjadi dimana proses ini mendasari sifat inti dari *stem cell* dalam hal kemampuan pembaharuan diri (*self-renewal*) dan kemampuan berdiferensiasi menjadi keturunan yang berbeda.¹ *Stem cell* yang berbeda akan mengekspresikan penanda (*marker*) yang berbeda pula, hal merupakan ciri khas dari sel-sel tersebut.²² Terkadang, sel mengekspresikan *marker* atau fenotip tetapi kemampuan secara fungsional berkurang oleh karena itu sel tersebut tidak bisa dianggap sebagai *stem cell*.²³ *Marker* atau penanda merupakan produk dari protein yang dikeluarkan oleh sel. *Stem cell* dengan sumber yang berbeda akan menghasilkan *marker* yang berbeda pula.²²

Gen yang berperan dalam mempertahankan sifat pluripotensi pada *stem cell* adalah SOX2, OCT4, dan NANOG. Kemampuan untuk memperbanyak diri tanpa kehilangan sifat induknya atau dikenal dengan *self-renewal* dipertahankan oleh gen ini.²⁴ Kontrol eksogenus berperan penting dalam mengaktifasi gen ini untuk

mengekspresikan penanda *stemness*. Ketika *stem cell* tumbuh dalam *fetal bovine serum* (PBS) ESC dari tikus tidak berdiferensiasi, jalur LIF/STAT3 berperan penting dalam *self-renewal* pada ESC. Basic-FGF dan IGF sebagai *growth factor* merupakan sinyal pertama dalam membangun faktor transkripsi OCT4, SOX2, NANOG.²⁴

Berbicara mengenai regulasi pluripotensi, pada MSC hanya ekspresi dari NANOG yang berperan. NANOG belum tampak pada saat pertama isolasi MSC, namun mulai muncul dalam proses kultur MSC, kadarnya meningkat cukup tinggi. Pada sel yang telah terdiferensiasi ekspresi NANOG sudah tidak terlihat lagi.²⁵

2.2.2. Penanda *Stemness* MSC

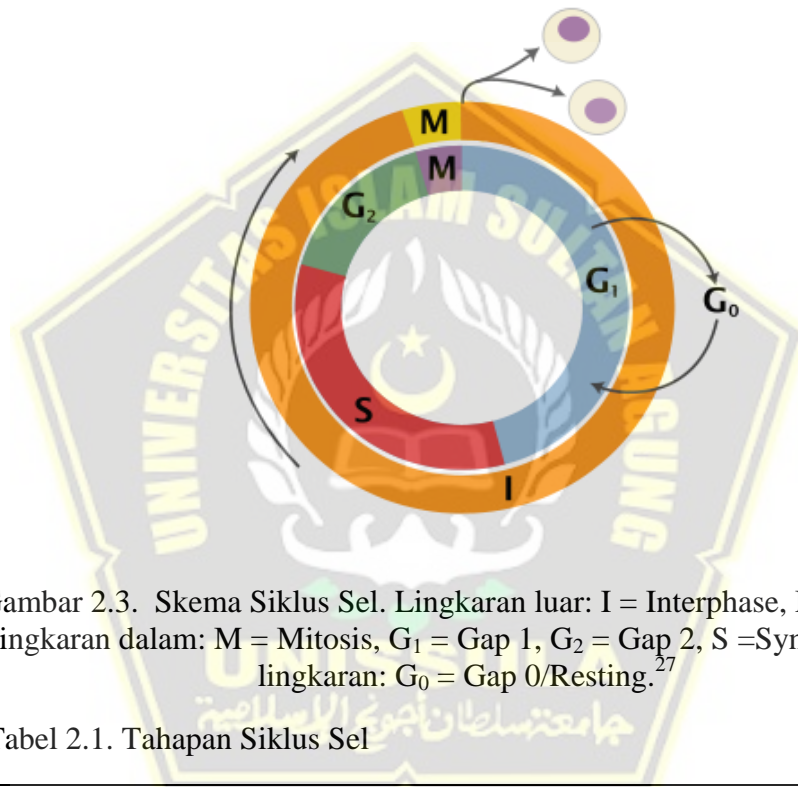
Konsensus *The International Society of Cellular Therapy*, sel yang tergolong dalam MSC harus mempunyai karakteristik antara lain: MSC harus menempel pada permukaan plastik saat dilakukan kultur di cawan plastik, MSC mempunyai molekul protein permukaan (*Cluster of Differentiation/CD*): CD73, CD90, dan CD 105. Berbeda dengan *Stem Cell Hematopoietik* (HSC), *Mesenchymal Stem Cell* tidak mengekspresikan CD45, CD 34, CD14, dan *Human Leukocyte Antigen-DR* (HLA-DR). Ketiga, dapat melakukan diferensiasi sesuai 3 jalur utama diferensiasi *mesenchymal*, yaitu jalur osteogenik (menjadi sel tulang/osteosit), jalur kondrogenik (menjadi sel tulang rawan/kondrosit), dan jalur adipogenik (menjadi sel lemak/adiposit) *in vitro*.²⁶

2.7. Siklus Sel

Suatu proses di dalam sel yang akan mengawali terjadinya replikasi sel disebut siklus sel.

2.3.1. Fase

Siklus sel terdiri dari 4 fase yang berbeda yaitu Fase G_1 , fase S (Sintesis), fase G_2 (Interfase), Fase M (Mitosis).²⁷



Gambar 2.3. Skema Siklus Sel. Lingkaran luar: I = Interphase, M = Mitosis; lingkaran dalam: M = Mitosis, G_1 = Gap 1, G_2 = Gap 2, S = Sintesis; luar lingkaran: G_0 = Gap 0/Resting.²⁷

Tabel 2.1. Tahapan Siklus Sel

Tahap	Deskripsi	Singkatan	
diam/ penuaan	Gap 0	G_0	Sel telah berhenti membelah dan telah meninggalkan siklus atau fase istirahat.
Interfase	Gap 1	G_1	Sel membesar pada Gap 1. Mekanisme persiapan untuk sintesis DNA diatur oleh cekpoin G_1 .
	Sintesis	S	Terjadinya replikasi DNA.
	Gap 2	G_2	Cekpoin G_2 mengatur mekanisme persiapan untuk memasuki fase M (mitosis) dan pembelahan.

Pembelahan sel	Mitosis	M	Pertumbuhan sel berhenti. Energi seluler terfokus pada urutan pembelahan menjadi dua sel anakan. Sel telah siap untuk melakukan pembelahan sel ditandai dengan cekpoin di tengah-tengah mitosis (cekpoin metafase).
----------------	---------	---	---

1. Fase G_0

Sel nonproliferatif pada eukariot multiseluler, pada umumnya telah memasuki masa diam G_0 dari G_1 dan untuk jangka waktu yang lama kemungkinan tetap pada masa diam, Respon terhadap kerusakan DNA atau degradasi yaitu dengan terjadinya penuaan sel yang akan membuat keturunan sel tidak dapat terus hidup; seringkali adalah reaksi biokimia; pembelahan sel dapat terjadi, seperti contohnya yang bersifat kanker.²⁸

2. Interfase

Sebelum sel memasuki tahap pembelahan, sel membutuhkan nutrisi. Seluruh persiapan diselesaikan ketika interfase. Interfase terjadi dalam tiga tahap yaitu G_1 , S, dan G_2 . Interfase juga diketahui sebagai fase persiapan untuk membelah. Pembelahan nukleus dan sitosol tidak terjadi pada tahap ini.²⁸

a. Fase G_1

Fase pertama dalam interfase adalah G_1 (*G indicating gap*) atau fase pertumbuhan. Terjadi dari akhir fase M sebelumnya sampai permulaan dari sintesis DNA. Aktivitas biosintetik sel, yang telah melambat selama fase M, kembali

meningkat selama fase ini. Durasi dari G_1 sangat bervariasi, bahkan diantara sel-sel yang berbeda pada spesies yang sama. Hal ini terjadi dibawah kontrol dari gen p53.²⁸

b. Fase S

Fase S berawal ketika replikasi DNA dimulai. Saat fase ini selesai, seluruh kromosom telah direplikasi. Setiap kromosom memiliki dua kromatid. Selama fase ini, secara efektif jumlah DNA pada sel menjadi ganda, walaupun diploid sel masih tetap sama. Sintesis juga diselesaikan secepat mungkin karena pairing basa yang terekspos menjadi sensitif terhadap faktor eksternal seperti obat yang diminum atau berbagai mutagen (seperti nikotin).²⁸

c. Fase G_2

Sel pada fase G_2 bertahan sampai sel memasuki mitosis. Biosintetik yang signifikan terjadi pada fase ini, terutama melibatkan produksi mikrotubulus yang dibutuhkan selama proses mitosis. Selama fase G_2 , inhibisi sintesis protein mencegah sel untuk melakukan mitosis.²⁸

3. Mitosis (Fase M/Fase Mitosis)

Mitosis adalah sebuah proses dimana terjadi pemisahan kromosom pada inti sel menjadi dua sel identik dalam sitoplasma, organel, dua nuklei, dan membran sel menjadi dua sel yang

mengandung pembagian komponen sel yang sama, yang dilakukan oleh sel eukariotik.²⁹

Kesalahan pada mitosis dapat menyebabkan apoptosis atau mengakibatkan mutasi yang berujung pada kanker.

2.3.2. Interaksi Antara Protein Yang Terlibat Dalam Siklus Sel

1. *Cyclin*

Cyclin adalah kelompok protein yang mengatur suatu progresi sel melalui siklus sel dengan cara mengaktivasi enzim *Cyclin Dependent Kinase* (CDK).²⁹

2. Peranan *cyclin* dan CDKs

Dua kelompok kunci dari molekul regulasi yang menentukan perkembangan sel dalam siklus sel adalah *cyclin* dan *Cyclin-Dependent kinases* (CDKs). *Cyclin* membentuk subunit regulasi sedangkan CDKs adalah subunit katalistik dari heterodimer yang telah teraktivasi; *cyclin* tidak mempunyai aktivitas katalistik dan CDKs tidak akan teraktivasi tanpa adanya sebuah *cyclin* pasangan. Ketika telah teraktivasi oleh adanya ikatan *cyclin*, CDKs akan melakukan fosforilasi yaitu reaksi biokimia biasa yang mengaktifkan atau menonaktifkan protein target terhadap koordinat tempat masuk ke tahap selanjutnya dari siklus sel. Kombinasi yang berbeda dari *cyclin-CDK* dapat menentukan hilir dari protein yang telah ditargetkan. CDKs

diekspresikan dalam sel dimana terdapat sintesis *cyclin* pada tahapan spesifik dari siklus sel sebagai respon terha

3. Mekanisme Utama Interaksi *cyclin*-CDKs

Kompleks-kompleks G_1 *cyclin*-CDK menjadi aktif pada penerimaan sinyal ekstraseluler pro-mitosis, untuk mempersiapkan sel yang akan memasuki fase S, menaikkan ekspresi faktor transkripsi yang akan meningkatkan ekspresi dari *cyclin* S dan enzim-enzim yang dibutuhkan untuk replikasi DNA. Kompleks-kompleks G_1 *cyclin*-CDK dapat juga berfungsi sebagai inhibitor fase S dengan meningkatkan degradasi molekul-molekul.³⁰

Mitosis kompleks *cyclin*-CDK yang tersintesis namun belum aktif selama fase S dan G_2 dapat meningkatkan inisiasi dari mitosis dengan cara merangsang hilir protein yang terlibat dalam kondensasi kromosom dan kumparan mitosis terbentuk. Kompleks penting yang teraktivasi selama proses ini adalah sebuah ubiquitin ligase yang meningkatkan degradasi protein struktural yang berhubungan dengan kromosom kinetokor, yang dikenal sebagai *anaphase-promoting complex* (APC). APC juga mentarget siklin mitosis untuk degradasi, serta menjamin agar dapat dilaksanakan telofase dan sitokinesis.³⁰

4. Spesifikasi Komplek *Cyclin*-CDKs

Cyclin-D adalah *cyclin* pertama sebagai respon dari sinyal ekstraseluler yang diproduksi dalam siklus sel (misal: *growth factors*). *Cyclin-D* terikat pada CDK4, dan membentuk sebuah kompleks *Cyclin-D-CDK4* yang aktif. Kompleks *Cyclin-D-CDK4* pada fosforilasi protein Rb rentan terhadap retinoblastoma. Rb yang hiperfosforilasi terpisah dari kompleks E2F/DP1/Rb (yang sebelumnya terikat dengan gen responsif E2F, kemudian secara efektif “menghalangi” mereka dari transkripsi), mengaktifkan E2F. Aktivasi E2F dapat menghasilkan transkripsi dari beberapa protein seperti *Cyclin-E*, *Cyclin-A*, *DNA polimerase*, *thymidine kinase* dan lain-lain. *Cyclin-E* yang menghasilkan ikatan dengan CDK2, serta menghasilkan kompleks *Cyclin-E-CDK2* yang dapat mendorong sel dari fase G₁ ke fase S (transisi G₁/S). *Cyclin-B* yang berhubungan dengan *cdc2* (*cdc2* – fission yeast (CDK1-mamalia) akan membentuk sebuah kompleks *Cyclin-B-cdc2* yang dapat menginisiasi transisi G₂/M. Aktivasi kompleks *Cyclin-B-cdc2* mengakibatkan pecahnya selubung nukleus dan inisiasi dari profase, sedangkan inaktivasinya mengakibatkan sel keluar dari mitosis.²⁹

2.8. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)

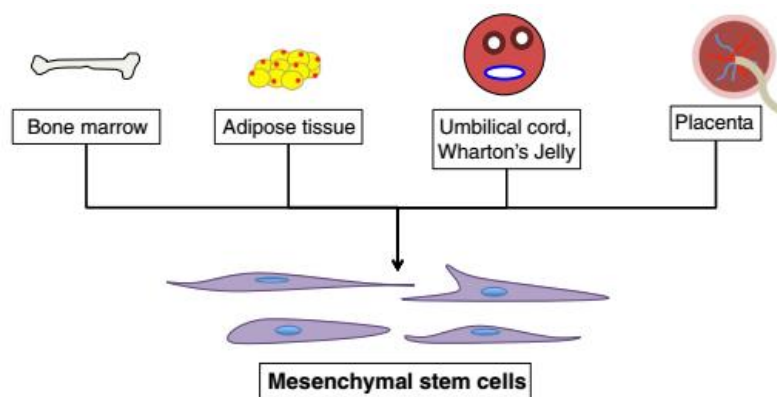
2.4.1. Definisi

Mesenchymal stem cell (MSC) atau disebut juga *stromal stem cell* merupakan sel yang mirip fibroblas yang mampu

mengoptimalkan lingkungan mikro dari sel hematopoietik. MSC termasuk *adult stem cell* yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan seperti jaringan lemak, kartilago, tulang dan endotel, bergantung pada lingkungan mikronya (*niche*). MSC telah terbukti dapat digandakan karena karakternya yang dapat menempel pada permukaan kultur jaringan.³¹ MSC sangat sering ditemukan pada sel stroma pada sumsum tulang belakang, periosteum, kulit dan lemak. Meskipun keberadaannya sering ditemukan pada sumsum tulang, akan tetapi jumlahnya hanya mewakili 1 dari 10.000 keseluruhan sel berinti.³⁵

2.4.2. Sumber

MSC dapat diisolasi dari jaringan dewasa, seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, polip endometrium, darah menstruasi dan dari jaringan janin.³² Pada jaringan janin, sumber MSC yang digunakan seperti plasenta, darah tali pusat dan matriks tali pusat (*Wharton's jelly*).^{33,34} Kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi beberapa jaringan juga bervariasi sesuai dengan jaringan asal mereka.³⁵

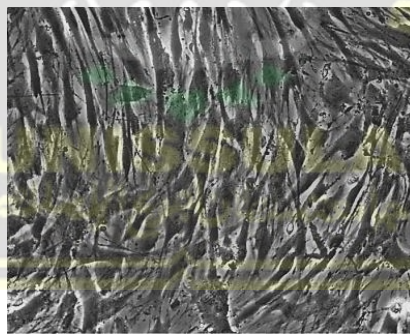


Gambar 2. 4 Sumber *Mesenchymal Stem Cell*.³⁶

2.4.3. Morfologi *Mesenchymal Stem Cell*

Gambaran morfologi dibawah mikroskop fase kontras adalah sebagai berikut.³⁷

- Fibroblast-like:
 - *Small cell body*, namun panjang dan tipis
 - Nukleus bundar dengan nukleolus menonjol, dikelilingi kromatin halus tersebar—clear appearance nucleus
 - Mengandung sejumlah kecil:
 - Golgi apparatus,
 - Rough endoplasmic reticulum,
 - Mitochondria, dan
 - Polyribosomes.



Gambar 2. 5 Morfologi MSC.³⁸

2.9. Hipoksia

2.5.1. Definisi

Hipoksia merupakan respon sel dan jaringan terhadap lingkungan dengan konsentrasi oksigen yang rendah. Hipoksia dapat memicu

terjadinya kerusakan DNA maupun stress cell. Pada kondisi hipoksia, metabolisme energi di tingkat seluler akan mengalami beberapa adaptasi sehingga terjadilah akumulasi metabolisme O₂, asam laktat dan amonia.³⁹

Kultur MSC dalam keadaan hipoksia dapat meningkatkan potensinya pada banyak studi. MSC yang diinkubasi pada kondisi hipoksia dianggap lebih mampu berproliferasi dan mempertahankan status stem cell nya.⁴⁰ Hal ini juga selaras dengan kondisi MSC yang secara fisiologis (in vivo) ditemukan pada jaringan dengan konsentrasi oksigen yang relatif rendah.. Misalnya pada kartilago kadar oksigen hanya sampai 5%, 4-7% pada sumsum tulang dan 10-13% pada arteri, paru dan liver. Kondisi kultur MSC secara normoksia, yaitu 20% O₂ (150 mmHg) tidak mencerminkan lingkungan asli stem sel pada jaringan.⁴¹ Namun kadar oksigen yang sangat rendah mulai dari 0,4%-2,3% ternyata dapat menimbulkan peningkatan apoptosis sel, sehingga pada penelitian ini digunakan kondisi hipoksia dengan oksigen 5%.⁴²

Selain kadar oksigen, lama waktu hipoksia merupakan parameter lain yang berpengaruh terhadap kualitas terapeutik MSC yang dihasilkan. Kultur hipoksia jangka pendek ditemukan lebih bagus meningkatkan potensi terapeutik dibanding hipoksia jangka panjang. Marker CD44 dan CD105 ditemukan turun pada MSC post kultur hipoksia jangka panjang (10 hari). Selain itu, dalam kultur jangka

panjang, MSC berproliferasi secara signifikan lebih lambat dan memberikan hasil yang lebih rendah secara hipoksia. Sebaliknya, dalam kultur jangka pendek (48 jam), MSC berproliferasi secara signifikan lebih cepat secara hipoksia. Pada kedua kultur jangka panjang dan jangka pendek, aktivitas metabolisme MSC secara signifikan lebih tinggi. Lebih-lebih lagi, MSC yang dikultur secara hipoksia memiliki ekspresi VEGF yang meningkat dengan penurunan HMGB1 dan gen apoptosis BCL-2 dan CASP3. Akhirnya, pada kedua lama kultur hipoksia, pro-inflamasi sitokin, IL-8, ditekan, sementara tingkat anti-inflamasi, IL-1ra dan GM-CSF, meningkat pada hipoksia jangka pendek saja.⁴³

2.5.2. Hypoxia Inducible-Factors

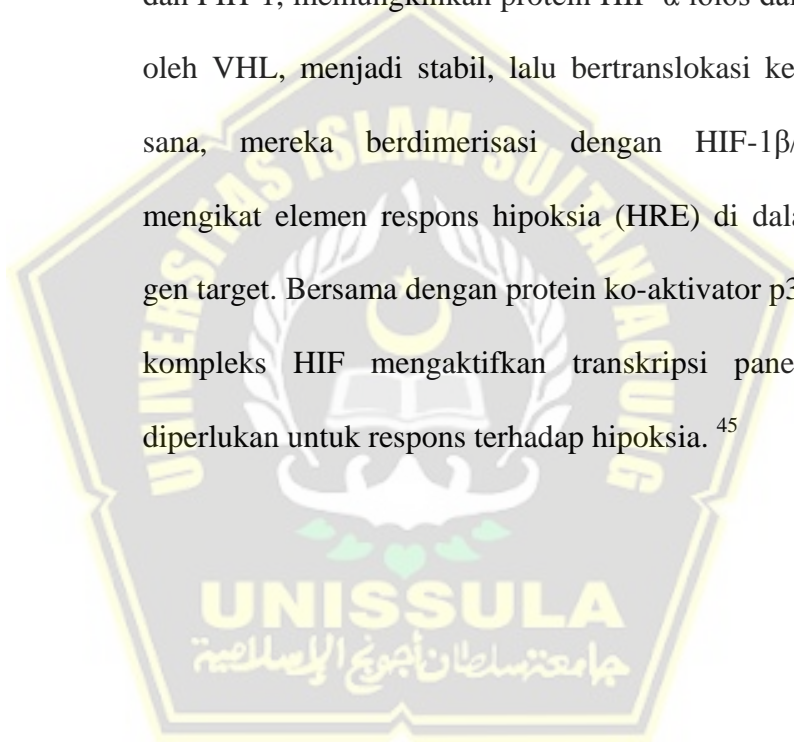
Respon sel terhadap hipoksia diperantarai oleh Hypoxia-Inducible factors (HIFs) seperti HIF-1a dan HIF-2a. HIF merupakan faktor transkripsi yang bertanggung jawab mengatur hingga lebih dari seribu gen sebagai targetnya.⁴⁴ Faktor ini akan menjadi heterodimer dengan subunit lainnya pada kondisi hipoksia untuk meningkatkan atau menurunkan transkripsi gen tertentu sebagai respon terhadap hipoksia.⁴⁴

Regulasi aktivitas HIF bersifat *dependent* terhadap oksigen. Dalam kondisi normoksik, subunit HIF- α di-*poliubiquitinasi* pada 2 residu prolin dalam *oxygen-dependent degradation domain* (ODDD). Proses ini diperantarai oleh keluarga enzim yang dikenal sebagai

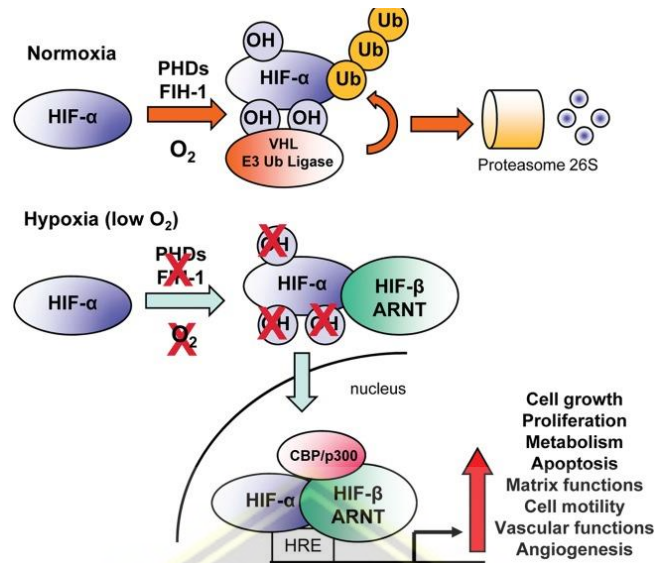
prolyl hidrosilase (PHDs). Hal ini lalu mendorong pengenalan oleh kompleks ligase ubiquitin VHL E3 memicu degradasi HIF- α oleh proteasome 26S. Selain itu, hidrosilasi residu asparagin terminal-C dari HIF- α oleh penghambat faktor HIF-1 (FIH-1) mencegah terikatnya kofaktor yang diperlukan untuk aktivitas HIF.

45

Sebaliknya, kondisi hipoksia menghambat aktivitas enzim PHD dan FIH-1, memungkinkan protein HIF- α lolos dari pengenalan oleh VHL, menjadi stabil, lalu bertranslokasi ke nukleus. Di sana, mereka berdimerisasi dengan HIF-1 β /ARNT dan mengikat elemen respons hipoksia (HRE) di dalam promotor gen target. Bersama dengan protein ko-aktivator p300 dan CBP, kompleks HIF mengaktifkan transkripsi panel gen yang diperlukan untuk respons terhadap hipoksia.⁴⁵



Gambar 2.6 Regulasi Oxygen-dependent HIFs



2.5.3. Efek Hipoksia terhadap proliferasi MSC

Aktivasi HIFs sebagai respon terhadap hipoksia akan memunculkan peristiwa adaptasi sel dimana akan terjadi perubahan pada proliferasi, diferensiasi, keseimbangan metabolisme sel serta proses fisiologis lainnya. HIF akan memberi respon jangka pendek maupun jangka panjang terhadap hipoksia. HIF akan meningkatkan vasodilatasi pembuluh darah dengan meningkatkan enzim iNOS, untuk memproduksi nitric Oxide agar terjadi peningkatan suplai darah dengan cepat. Kebutuhan sel terhadap O₂ juga ditekan dengan mengubah metabolisme energi dari aerob menjadi anaerob, meningkatkan penggunaan glikolisis dengan induksi enzim glikolitik, uptake glukosa yang ditingkatkan dengan GLUT-1 serta menghambat respirasi mitokondria dengan meningkatkan pyruvate dehydrogenase kinase1 (PDK1).⁴⁵

Hipoksia juga mempengaruhi proliferasi MSC. Hipoksia ditemukan mampu menghambat proliferasi sel pada berbagai macam tipe sel seperti fibroblas embrionik, ESC, limfosit, keratinosit, dan HSC.⁴⁶ Bahkan ditemukan bahwa overekspresi HIF-1 α sudah memadai untuk memicu terhentinya siklus sel.⁴⁷ Meski begitu penelitian menunjukkan bahwa inkubasi Umbilical cord derived MSC (UC-MSC) menunjukkan peningkatan proliferasi sel pada kondisi hipoksia.⁴⁸ Stem sel lebih resisten terhadap hipoksia dibanding *progenies* nya. Pada kultur MSC dengan kadar O₂ 5%, MSC ditemukan tumbuh lebih lambat hingga P₁, namun mengalami pertumbuhan yang progressive pada kultur selanjutnya.³ Penelitian lain juga menunjukkan bahwa *doubling time* berkurang pada kondisi hypoxia hingga P₁ dan meningkat setelahnya. Lima puluh persen MSC pada P₀ mengekspresikan STRO-1 dan semakin berkurang setelahnya.⁴⁹ STRO-1 berhubungan dengan ekspansi sel serta kemampuan multipoten nya. Bisa disimpulkan bahwa kondisi hipoksia membantu MSC meningkatkan proliferasi serta potensialnya untuk berdiferensiasi secara *multi-lineage*

2.10. Mesenchymal Stem Cell – Hypoxia Conditioned Medium (MSC-HCM)

2.6.1 Definisi

Stem cell selama dalam tahap pengkulturan mensekresikan faktor-faktor yang dapat ditemukan dalam medium kulturnya, yang kemudian dinamakan *Conditioned Medium* (CM). Medium yang diperoleh dari proses kultur MSC dengan modifikasi lingkungan hipoksia dinamakan *mesechymal stem cell-hypoxia conditined medium* (MSC-HCM). Faktor-faktor yang dikeluarkan pada medium kultur dikenal dengan secretome, microvesicle, atau exosome.⁵⁰ Terapi MSC secara konvetional dapat digantikan dengan secretome dari MSC, dengan kata lain *Conditioned Medium* (CM) memiliki peluang sebagai pengobatan regeneratif.^{51,52} *Stem cell* mensekresikan berbagai macam *growth factor* beserta agen regeneratif jaringan yang merupakan kandungan dari CM. Faktanya bahwa *stem cell* mensekresi berbagai *growth factor* juga ditunjukkan oleh studi proteomik, yang mengungkapkan adanya berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin lainnya pada CM.^{53,54,55,56}

2.6.2. Soluble Factor

Tabel 2. 2 Kadar *Growth factor* dar berbagai sumber sel, waktu kultur, jumlah sel dan proses dari *conditioned medium*.⁵²

No	Sumber SC	Kultur/Durasi	Jumlah Sel/Proses	Kadar <i>Growth Factor</i>
1	Human-BM- MSC	Monolayer -24 jam	4 × 10 ⁶ /Conc. 25x	VEGF Normoxia : 230 pg/mL Hypoxia : 450 pg/mL HGF Normoxia : 600 pg/mL Hypoxia : 750 pg/MI VEGF : 14.4 ± 0.4 ng/mL
2	Human- Adipose- SC	Spheroid- 2 hari	10 ⁵ /Centr	Pawitan J.A., 2014, Prospect of Stem Cell Conditioned

	dalam MEM- FBS			Medium in Regenerative Medicine, <i>BioMed Research International</i> (2014).
				HGF : 13.3 ± 2.3 ng/mL CXCL : $12\ 16.6 \pm 2.9$ ng/mL
3	Human- MSC	Monolayer -48 jam	70%/(—)	IGF-1 : 1515.6 ± 211.8 pg/mL VEGF : 465.8 ± 108.8 pg/mL TGF-b1 : 339.8 ± 14.4 pg/mL HGF : 20.3 ± 7.9 pg/mL

Stimulasi inflamasi pada pengkondisian MSC menggunakan *Tumor Necrosing Factor-Alpha* (TNF- α) dapat meningkatkan CM dari *stem cell*. Begitu juga dengan pengkondisian kultur MSC pada lingkungan hipoksia, berdasarkan data yang ada hipoksia CM memiliki kadar faktor pertumbuhan dan sitokin yang lebih tinggi dibandingkan dengan CM yang berasal dari kultur normoksia.

2.11. Regulasi Growth Factor pada Proliferasi dan Multipotensi

Jalur *growth factor* dalam mempengaruhi proses proliferasi MSC sedang banyak diteliti dalam beberapa tahun ini. Beberapa *growth factor* menyebabkan tidak hanya satu efek biologis. Mereka membawa pengaruh dalam perubahan motilitas, proliferasi, morfogenesis, dan pertahanan hidup.¹⁰

Beberapa dari growth factor yang mempengaruhi proferasi adalah:

1. *Transforming Growth Factor* (TGF)

Transforming growth factor beta (TGF β) beserta keluarganya bone *morphogenic protein* (BMP-2) dan BMP-3 memberikan sinyal proliferasi dengan mengaktifasi jalur mitogen aktifated protein kinase (MAPK) erk,

Rho GTPase, dan phosphoinositide-3 kinase (P13K). TFG β tidak hanya melalui jalur MAPK untuk mengaktifkan sinyal proliferasi, jalur yang kedua adalah aktivasi anaplastik limfoma kinase ALK-4, SMAD2, SMAD3, namun pada jalur ini akan dihambat oleh ekspresi Oct4 agar proliferasi tetap terjadi namun tidak berdiferensiasi menjadi sel tulang.

2. *Fibroblast Growth Factor* (FGF)

Keluarga FGF yang berperan dalam proliferasi adalah FGF-2 dan FGF-4. FGF-2 selain mempertahankan proliferasi MSC, juga diferensiasi osteogenik, adipogenik dan kondrogenik. Sinyal proliferasi TGF melalui jalur MAPK erk.

3. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa MSC tidak mengekspresikan reseptor VEGF. Tetapi ternyata VEGF mempengaruhi proliferasi dengan ikut bersamaan dapat berikatan dengan reseptor PDGF, kemudian mengaktifkan jalur MAPK erk.

4. *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF)

PDGF adalah agen mitogen yang ampuh pada MSC, dan terekspresi pada seluruh jenis dari MSC. Sejak pertama ditemukan, PDGF berikatan dengan PDGFR dan responsif terhadap proliferasi dengan mengaktifkan jalur Erk. Fungsi PDGF adalah untuk memicu proliferasi fibroblast otot polos dan monosit daerah radang dan luka.

5. *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)

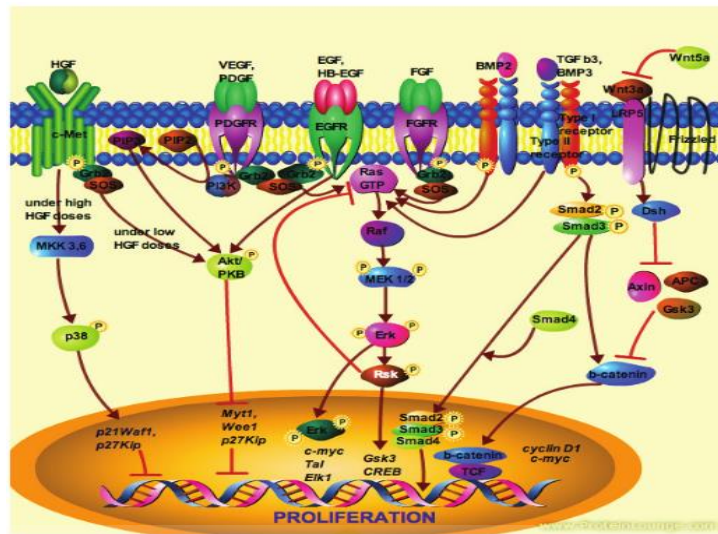
Reseptor HGF terdapat pada permukaan MSC adalah c-Met, expresinya cukup rendah pada MSC tikus. C-Met seringkali bermutasi atau mengalami oversekresi pada sel kanker, khususnya pada karsinoma papiler ginjal dan tiroid. Sistem sinyal HGF diperlukan dalam menjaga kehidupan embrio yang terbukti dari temuan bahwa embrio yang reseptor c-Met nya dihilangkan akan mengalami kelainan perkembangan otot, ginjal, hati dan otak.

6. *Epidermal Growth Factor (EGF) dan Heparin-Binding EFG*

Berperan dalam proliferasi dan mobilitas fibroblast dan keratinosit. Reseptor EGF (EGFR) yang paling banyak diketahui adalah EGFR1 dan Erb1. Berpengaruh pada proliferasi MSC dengan aktivasi ERK1/2.

7. *Wnt family.*

Jalur sinyal Wnt dengan reseptor Frizzel pada permukaan sel yang meneruskan signal biologisnya ke protein adaptor Dishevelled (Dsh) didalam sel. Pertama kali ditemukan dalam proses karsinogenesis dan embriogenesis. Jalur ini mengatur bentuk aksis tubuh, dan menentukan proliferasi dan migrasi sel. Jalur ini sangat berperan dalam embriogenesis, peran jalur ini ditemukan ketika komponennya yang mengalami mutasi genetik menyebabkan abnormalitas pada embrio lalat buah.



Gambar 2. 7. Jalur sinyal growth factor dalam memediasi proliferasi MSC.⁵⁷

Tabel 2. 3. Berbagai *growth factor* beserta efeknya pada proliferasi MSC⁵⁸

Growth factor family	Growth factor	Receptor/signaling modulator	Effect on proliferation/survival/morphogenesis	
1.	TGF-β	TGF-β1	ALK-1, ALK-2, ALK-3, ALK-6, ALK-4, ALK-5, ALK-7	Increases chondrogenesis Increases proliferation
		BMP-2	Erk	Increases osteogenesis, increases proliferation
		BMP-3	ALK-4/SMAD 2, SMAD 3	Increases proliferation
2.	FGF	FGF-2	FGFR/Erk (Putative)	Bias towards chondrogenesis on prolonged exposure, increases proliferation
		FGF-4	FGFR/Erk (Putative)	Increases proliferation
3.	VEGF	VEGF-A	VEGF receptor/PDGF receptor	Increases proliferation
			VEGF receptor/PDGF receptor	Increases survival
4.	PDGF	PDGF	PDGF receptor/Erk	Increases proliferation
			PDGF receptor/Erk	Increases survival
5.	EGF	Soluble EGF	EGF receptor/transient Erk	No effect in differentiation, increases proliferation
		Tethered EFG	EGF receptor/transient Erk	Increases spreading and survival
		Heparin-binding EFG	EGF receptor/Erk	No effect in differentiation, increases proliferation
6.	HGF	HGF	C-Met/p38MAPK	Enhances survival
			C-Met/PI3K	Inhibit proliferation
7.	Wnt	Wnt3a	β-catenin	Promotes proliferation

Jalur antara siklus sel dan multipotensi

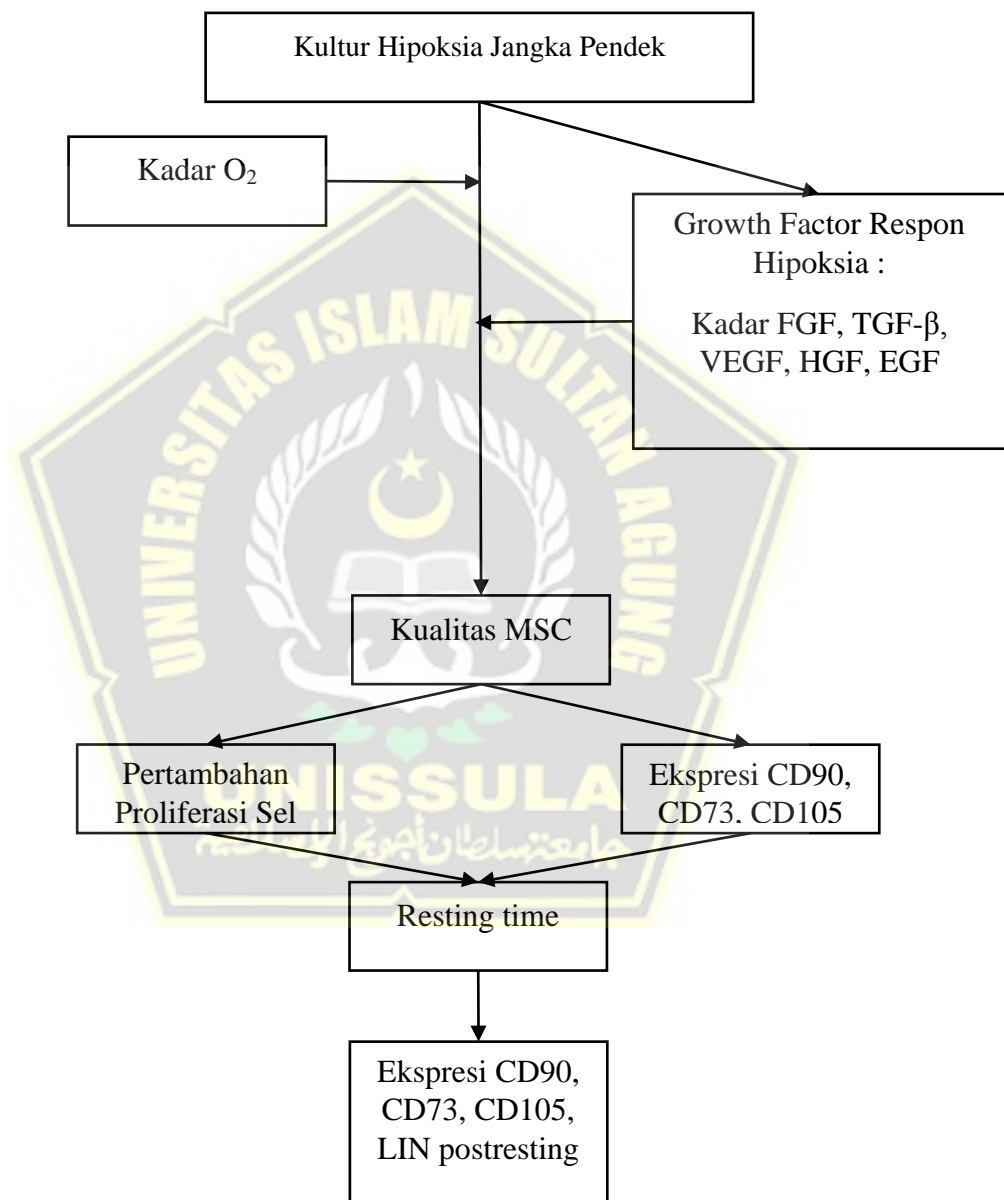
Proliferasi dan multipotensi MSC dapat dipelihara dengan menggunakan faktor pertumbuhan. MSC memiliki tiga jalur potensi yaitu menjadi jaringan lemak, tulang dan tulang rawan. Proliferasi dan multipotensi MSC terlihat cukup signifikan apabila dalam medium tumbuh kaya akan FGF dan EGF, jika dibandingkan dengan medium tumbuh tanpa FGF dan EGF.⁵⁹ Regulasi OCT4, NANOG, dan SOX2 adalah hal yang sangat berperan dalam reprogramming *embryonic stem cell* (ESC). Kehilangan ekspresi gen OCT4, SOX2, dan NANOG mengakibatkan ESC kehilangan sifat pluripotensinya.

Sinyal ekstrinsik yang berperan dalam mempertahankan sifat pluripotensi stem cell diantaranya, LIF/STAT3, PI3K, Wnt, TGF β , MAPK. Regulator pluripotensi hMSC hanya NANOG, sedangkan SOX2 dan OCT4 tidak terbukti terlibat. Ekspresi NANOG pada hMSC hanya terdeteksi saat sel berproliferasi, dan tidak terdeteksi saat MSC diinduksi untuk berdiferensiasi.⁶⁰

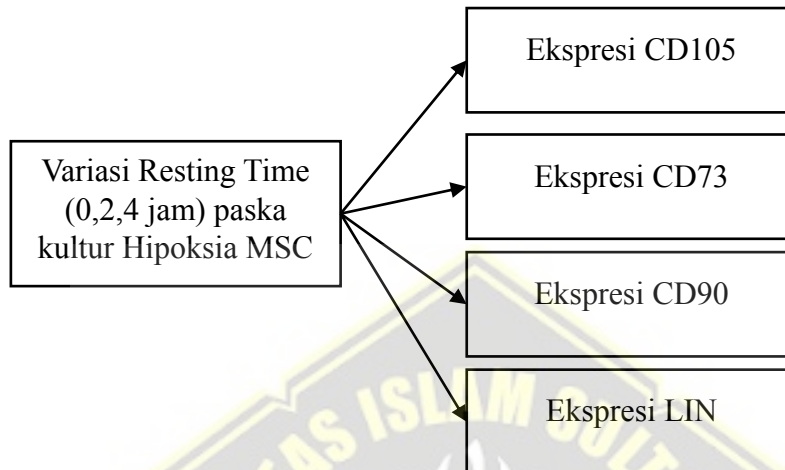
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori



3.2. Kerangka Konsep



3.3. Hipotesis

Resting Time pasca kultur Hipoksia *Mesenchymal Stem cell* meningkatkan ekspresi CD73, CD90, CD105 Dan LIN

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang dilakukan secara *in vitro* dengan jenis penelitian *post-test* dengan kelompok kontrol (*post-test only control group design*). Rancangan ini digunakan untuk menganalisis pengaruh pemberian waktu jeda paska hipoksia Mesenchymal Stem Cells (MSCs) pada kelompok penelitian dengan cara membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Kelompok penelitian ini terdiri dari 3 kelompok penelitian yang terdiri atas satu kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Masing masing kelompok terdiri dari 3 pengulangan sesuai dengan rincian dibawah ini :

Perlakuan terdiri dari:

1. Kelompok: Kontrol (resting 0 jam),
2. Kelompok Perlakuan 1: (resting 2 jam),
3. Kelompok Perlakuan 2 : (resting 4 jam)

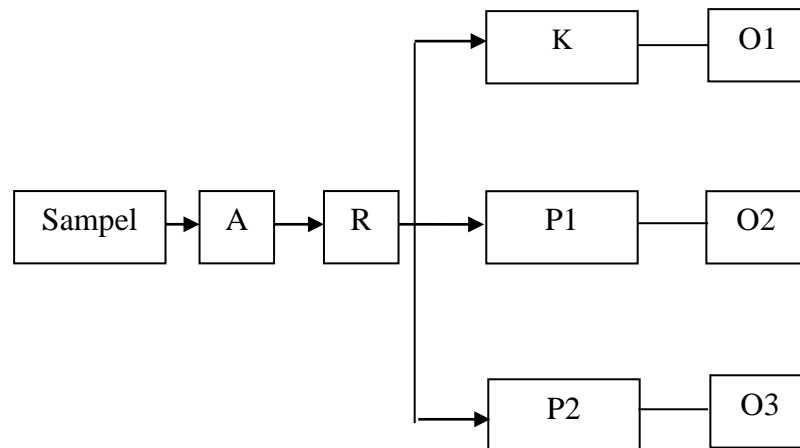
A : Adaptasi

R : Randomisasi

P : Perlakuan

O: Observasi

K: Kontrol



Gambar 4.1. Gambar rancangan penelitian

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Subjek penelitian ini adalah Mesenchymal Stem Cell. Sedangkan sampel adalah MSC yang memenuhi kriteria sesuai ISCT berikut :

- Sel yang dikultur mampu menempel pada plastik (*Plastic Adherent*) dengan gambaran *fibroblast-like cell*
- Memiliki positif marker CD73, CD90, dan CD105
- Tidak ada ekspresi CD34, CD45, CD11b, CD79a, HLA classII
- Mampu berdiferensiasi pada kultur *in vitro* menjadi sel tulang (osteogenik), menjadi sel tulang rawan (kondrogenik) dan menjadi sel lemak (adipogenik).

Kriteria eksklusi:

- Terjadinya kontaminasi pada sel

Kriteria faktor perancu

- Suhu 37°C

- PH 7 (normal)
- CO₂ 5% yang dikendalikan
- Kelembapan

4.3. Variabel

4.3.1. Variabel Bebas

Lama Waktu Resting Time MSC post kultur dalam kondisi Hipoksia.

4.3.2. Variabel Tergantung

Ekspresi CD73

Ekspresi CD90

Ekspresi CD105

Ekspresi Lin

4.4. Definisi Operasional

4.4.1. Lama Resting Time adalah lama waktu MSC diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kondisi Normoksia setelah MSC selesai dikultur dalam kondisi hipoksia. (Satuan : Jam., Skala : Ordinal)

Pada penelitian ini karakteristik sel dinilai pada 0 jam, 2 jam dan 4 jam. Sebagai penelitian pilot, pemilihan jam-jam tersebut didasarkan pada kemungkinan perubahan kadar level marker permukaan sel pada hitungan jam meskipun siklus sel terjadi pada kisaran 12-24 jam. Waktu paruh protein bervariasi mulai dari beberapa menit

hingga beberapa hari. Glikoprotein permukaan sel pun memiliki waktu paruh yang berkisar antara 10 hingga 30 jam⁶¹.

4.4.2. Ekspresi CD73,

4.4.3. CD90, dan

4.4.4. CD105 adalah persentase kadar yang dipresentasikan CD73, CD90, dan CD105 dalam bentuk grafik yang diexpresikan MSC sebagai hasil kultur dengan medium mengandung MSC-HCM, menggunakan alat flowcytometri. (Satuan : %, Skala : Ratio)

4.4.5. LIN adalah Cocktail marker negative yang tidak boleh ditemukan ekspresinya pada MSC mencakup CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 dan Human leukocyte antigen (HLA). Diukur dengan flowcytometri (Satuan : %, Skala : Ratio)

4.5. Instrumen dan Bahan

4.5.1. Instrumen

1. *Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip)*
2. *Pipette filler*
3. *Conical tube (15 ml, 50 ml)*
4. *Cryotube 1 ml*
5. *Inverted microscope*
6. *CO₂ cylinder*
7. *Scissor*
8. *Pinset*

9. *Scalpel dan bisturi*
10. *Thermostirrer*
11. *Sentrifuge*
12. *Beaker glass*
13. *Aluminium foil*
14. *Dish*
15. *Flask*
16. *Chamber*
17. *Oxygen meter*
18. *Tabung CO₂*
19. *Centrifuge*
20. *Imunocytochemistry*
21. *Biosafety Cabinet class 2*
22. *CO₂ Incubator*
23. *Hotplate stirrer*
24. *Disposable pipet*
25. *Heparin tube* جامعته سلطان أبجوع الإسلامية
26. *Cell counter*

4.5.2. Bahan

1. *Mesenchymal Stem Cell*
2. NaCl 0.9%
3. FBS
4. Medium dMEM

5. Alkohol 70%
6. Fungizon 0.5%
7. *Streptomisin-penicilin* 1% (penstrep)
8. PBS

4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja

4.6.1. Pengajuan *Ethical Clearence* Penelitian

Pengajuan proposal penelitian

4.6.2. Teknik Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan disimpan dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%.
 - Jika tidak diproses secara langsung, simpan pada suhu 4°C sampai proses isolasi (12-24 jam).
 - Jika dilakukan isolasi segera pada saat pengambilan *umbilical cord*, tidak perlu disimpan pada suhu 4°C.
2. *Umbilical cord* diletakkan ke petri dish dengan menggunakan pinset, lalu dicuci sampai bersih dengan PBS.
3. *Umbilical cord* dipotong menjadi 3-5 cm dengan pisau steril.
4. Pembuluh darah yang ada pada potongan *umbilical* dibuang
5. Potongan *umbilical* 3-5 cm ditempatkan ke petri dish yang steril.

6. Tiap potongan umbilical dihancurkan dengan gunting mata. tajam atau bisturi menjadi potongan-potongan kecil sebesar 1 mm.
7. Hasil potongan kecil umbilical diempatkan dengan menggunakan pinset pada cawan kultur jaringan 60 mm , dengan susunan titik-titik yang tersebar rata pada permukaan cawan kultur jaringan.
8. Medium komplit (α MEM yang ditambahkan dengan fungizon, penstrep, dan FBS) dibersihkan sebanyak 2-3 ml.
9. Sel diinkubasi dalam incubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂.
10. Sel diamati tiap 24 jam, untuk melihat ada sel yang keluar dari spot penanaman explant (kira-kira 14 hari akan muncul sel dari explant).
11. Medium diganti tiap 2-3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dengan menggunakan micropipette diganti dengan *fresh medium* komplit sebanyak yang dibuang.
12. Setelah sel muncul dari explant, medium komplit ditambah menjadi 5 ml.
13. Setelah 24-72 jam dari munculnya sel explant, sel yang mengapung dipindahkan ke cawan petri jaringan yang baru dengan cara:
 - Semua medium diambil dan dimasukkan ke conical tube 15 ml

- Sentrifugasi 2000 rpm selama 10 menit
- Supernatant dibuang.
- Pellet diresuspensi dengan medium komplit.

4.6.3. Kultur Sel

1. Sel ditanam ke cawan petri jaringan.
2. Sel diinkubasi 37°C dan 5% CO₂.
3. Setengah dari medium diganti tiap 2-3 hari sekali sampai sel konfluens 80%.

4.6.4. Proses Pemanenan Sel

1. Panen sel dilakukan menggunakan panen sel ketiga yang dipindahkan ke coverslip.
2. Wadah medium dibersihkan dengan menggunakan PBS 1 ml dan tripsin 1 ml untuk memisahkan medium dengan sel.
3. Sel diinkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C.
4. Sel dilihat di mikroskop untuk memastikan sel sudah lepas.
5. Jika sudah lepas, tripsin dan PBS diambil menggunakan micropipette.
6. Kemudian diganti dengan medium komplit.

4.6.5. Proses Penghitungan Sel

1. 10µl sel disiapkan dan dimasukkan ke *cryotube*.
2. Triptofan blue 90µl ditambahkan ke dalam *cryotube*.
3. 10µL suspensi diambil dengan pipet di bilik hitung yg sudah ditutup dengan *deck glass*.

4. Sel dilihat menggunakan mikroskop inverted pada 4 bilik hitung.
5. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan rumus:

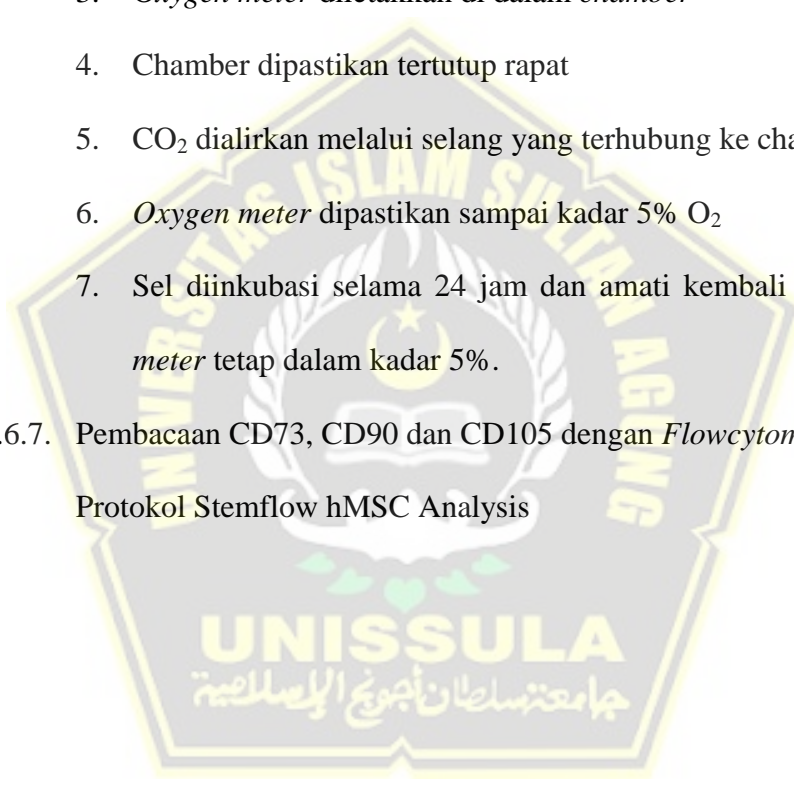
$$\frac{\sum n}{4} \times 10^4 \times \text{Pengenceran}$$

4.6.6. Prosedur Hipoksia

1. *Chamber* disiapkan
2. Well yang berisi MSC dimasukkan kedalam chamber
3. *Oxygen meter* diletakkan di dalam *chamber*
4. Chamber dipastikan tertutup rapat
5. CO₂ dialirkan melalui selang yang terhubung ke chamber
6. *Oxygen meter* dipastikan sampai kadar 5% O₂
7. Sel diinkubasi selama 24 jam dan amati kembali pada *oxygen meter* tetap dalam kadar 5%.

4.6.7. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan *Flowcytometri*

Protokol Stemflow hMSC Analysis



1. Sel dilepaskan dari flask dengan menggunakan BD™ Accutase™ Cell Detachment Solution (Cat. No 561527) atau larutan detachment solution yg lain , cuci cells dan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 cells/ml in BD Pharmingen™ Stain Buffer (Cat. No. 554656) atau PBS buffer. Sel dapat di resuspensi pada konsentrasi 5×10^6 cells/ml jika jumlah cell terbatas.

2. Tabung falcon 5 ml disiapkan dan dilabeli sbb :

Tabung	Reagent	Vol yg dimasukan
(1)	FITC Mouse Anti-Human CD90	(5 μ l)
(2)	PE Mouse Anti-Human CD44	(5 μ l)
(3)	PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD105	(5 μ l)
(4)	APC Mouse Anti-Human CD73	(5 μ l)
(5)	Nothing	
(6)	hMSC Positive Isotype Control Cocktail	(20 μ l)
	hMSC Negative Isotype Control Cocktail	(20 μ l)
(7)	hMSC Positive Cocktail	(20 μ l)
	PE hMSC Negative Cocktail	(20 μ l)

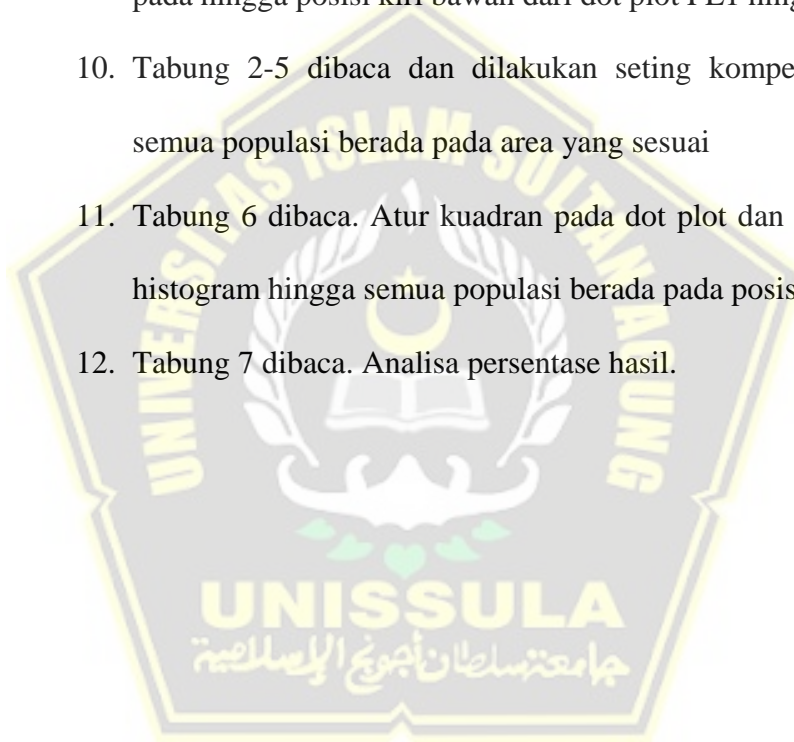
3. Tabung 5-7 diulangi untuk setiap penambahan sampel yang mau dianalisis

4. Pipette 100 ul sample ditambahkan kedalam masing-masing tabung

5. Vortex atau tapping tabung

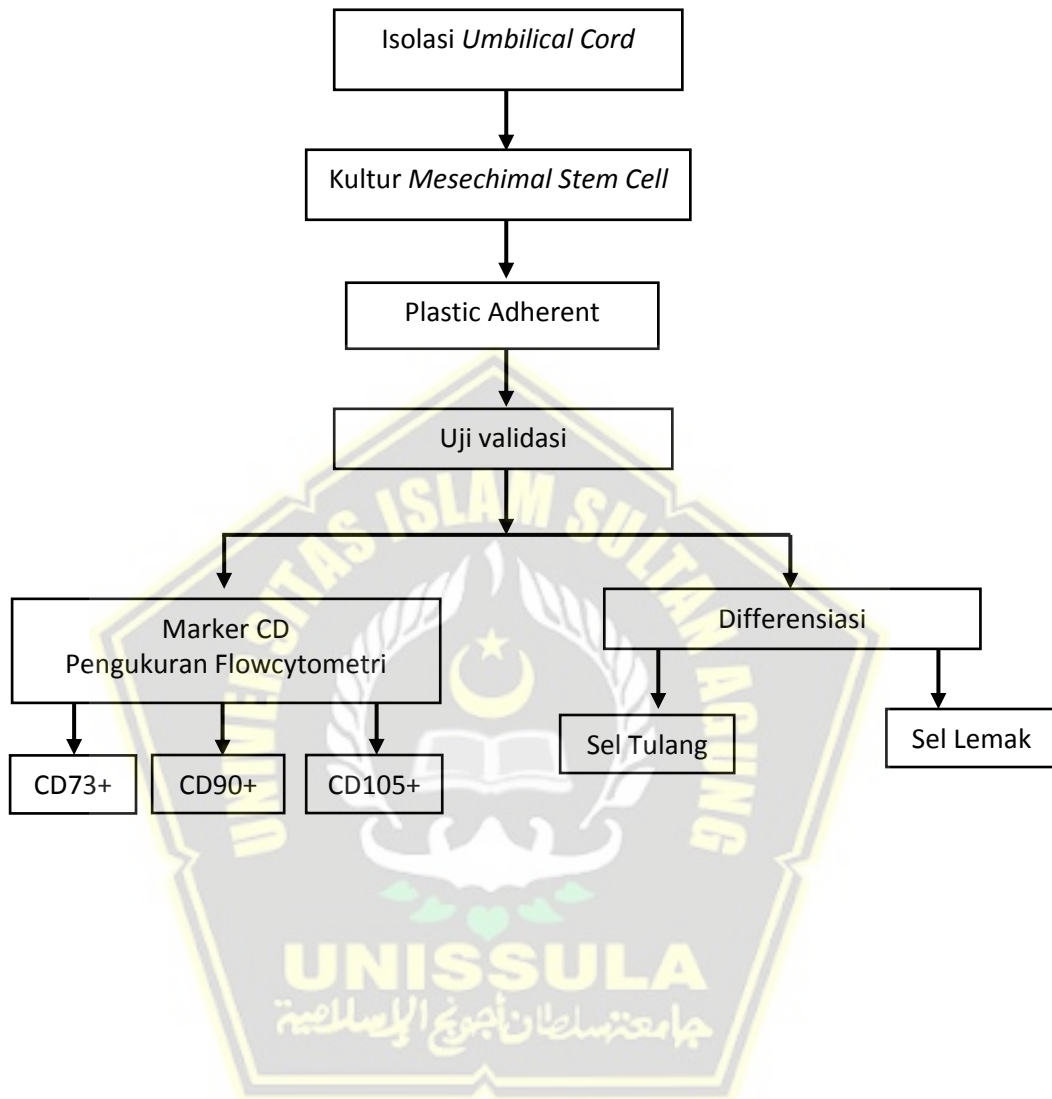
6. Sel diinkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap

7. Sel dicuci 2 kali dengan Stain Buffer (FBS) 2 kali dan resuspend dengan 300-500 ul stain buffer (FBS) atau 1 x washing buffer atau PBS
8. Hasil dibaca di flow cytometer . Gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk setup cytometer (yaitu kompensasi)
9. Tabung 5 dibaca di cytometer hingga sekitar berada pada posisi yang kita inginkan(di tengah-tengah) dan populasi sel berada pada hingga posisi kiri bawah dari dot plot FL1 hingga FL4
10. Tabung 2-5 dibaca dan dilakukan seting kompensasi hingga semua populasi berada pada area yang sesuai
11. Tabung 6 dibaca. Atur kuadran pada dot plot dan interval pada histogram hingga semua populasi berada pada posisis negatif.
12. Tabung 7 dibaca. Analisa persentase hasil.

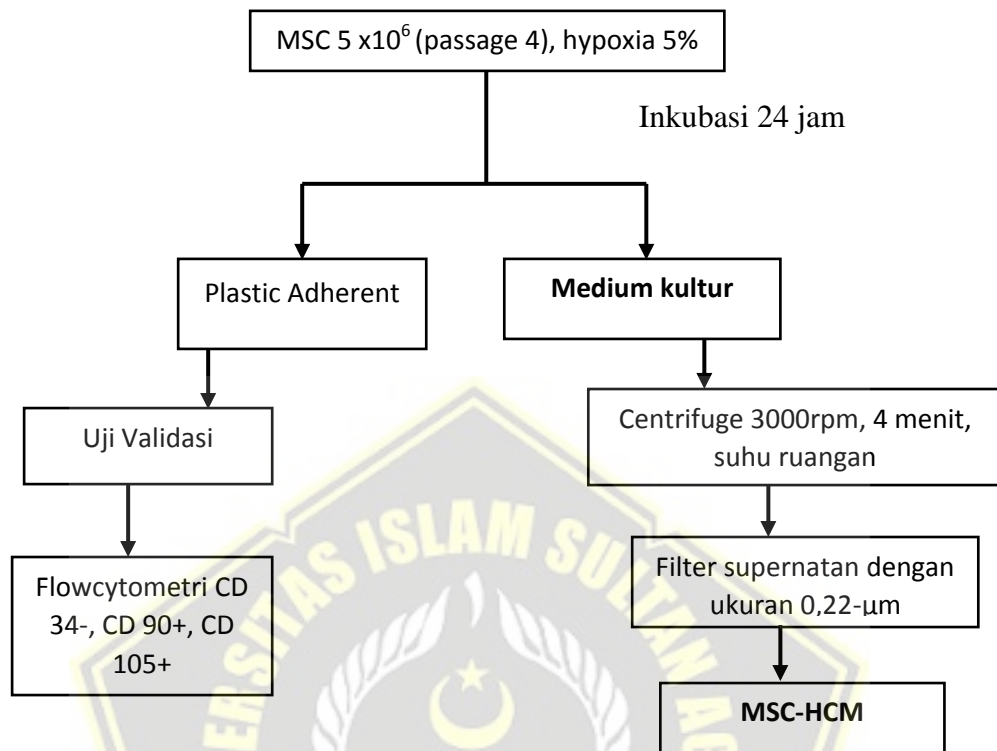


4.6.8. Alur Kerja

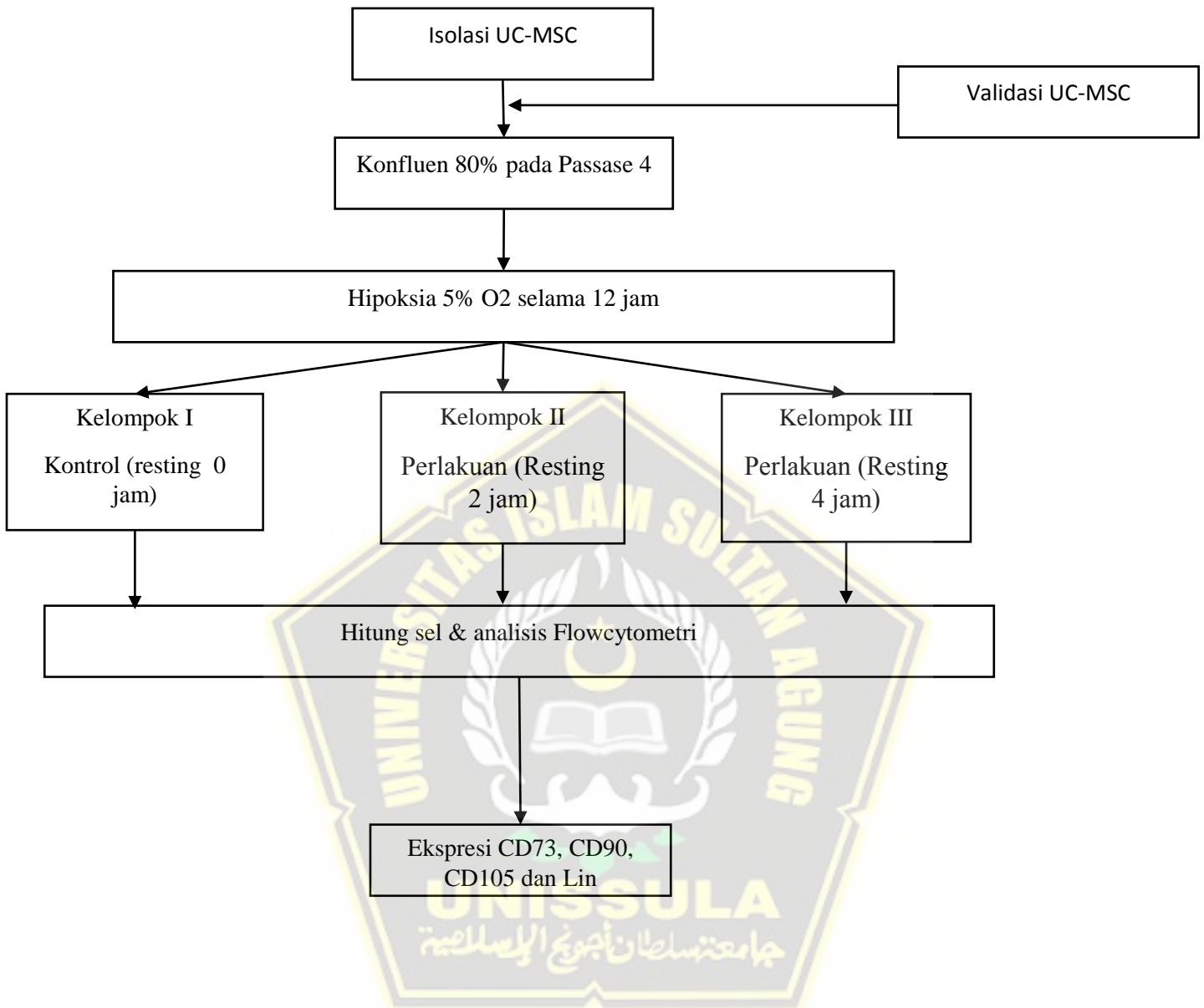
a. Pembuatan MSC



b. Pembuatan MSC-HCM



c. Alur Kerja



7	Perbaikan hasil seminar penelitian																
8	Sidang tesis																
9	Revisi dan Penggandaan																



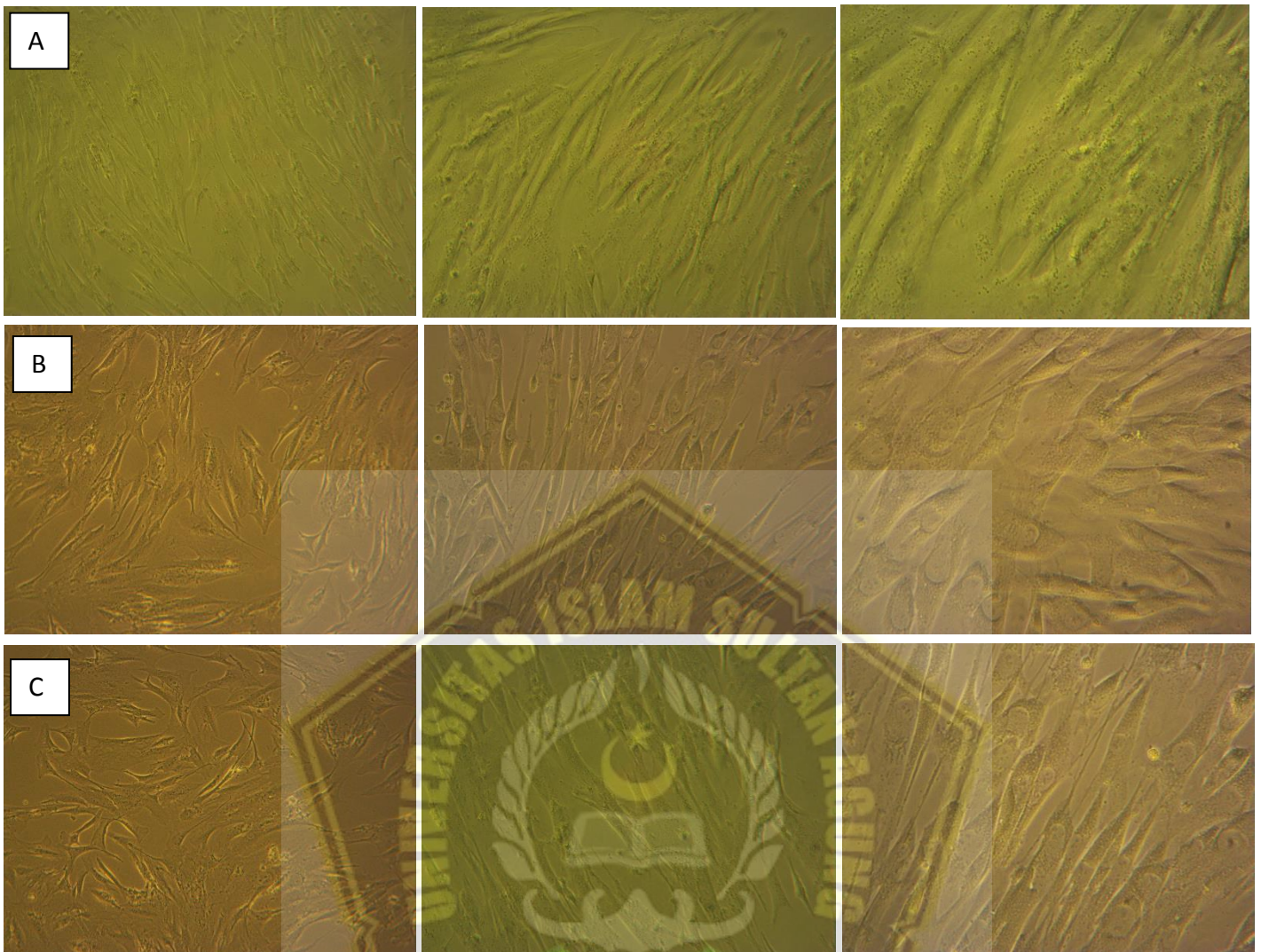
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh variasi resting time terhadap kadar *marker stemness* CD105, CD90, CD105 dan LIN secara in vitro di Lab Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Unissula. MSC yang digunakan diisolasi dari jaringan korda umbilikal bayi dan dikembangbiakkan selama 2 minggu sesuai dengan standar prosedur pembuatan kultur stem cell. Sel ditanam pada medium kemudian ditunggu hingga konfluen. Sel yang sudah konfluen disimpan pada *chamber* dengan kadar oksigen 5% dan ditempatkan pada inkubator selama 12 jam. *Setelah* sel dikeluarkan dari inkubator, dilakukan pengamatan mikroskopis untuk melihat morfologi MSC yang dikembangbiakkan.

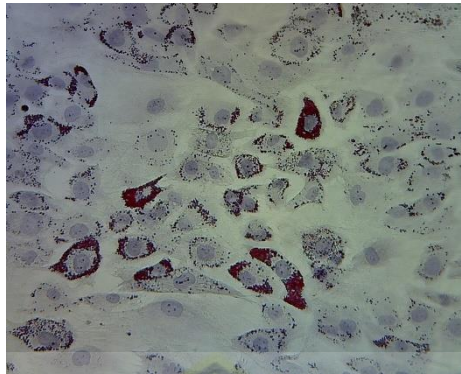
Kadar marker stemness dihitung menggunakan alat flowsitometri dengan protokol sesuai dengan pabrik. Sel yang sudah dipanen dari medium pada 0 jam, 2 jam dan 4 jam pasca kultur hipoksia disentrifuge dengan kecepatan 400 rpm, kemudian supernatan dianalisis dengan flowsitometri. Dari penelitian ini didapatkan hasil penelitian sebagai berikut



Gambar 5.1 Morfologi MSC pasca kultur hipoksia perbesaran (kanan-ke kiri) 10x; 20x dan 40x (a) Kontrol, 0 jam (b)P1, 2 jam; (c) P2, 4 jam.

5.1.1 Uji Hasil Deferensiasi

5.1.1.2 Uji Diferensiasi Adipogenik



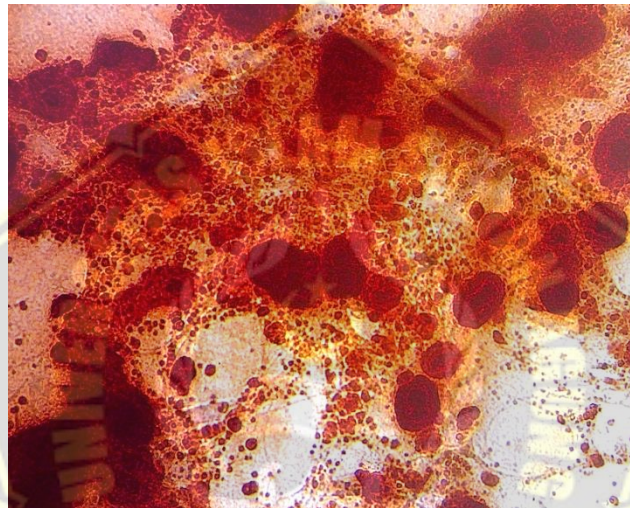
Gambar 5.2 Uji validasi MSCs diferensiasi adipogenik: Perbesaran 200x

Uji diferensiasi adipogenik bertujuan untuk mengidentifikasi kemampuan MSC untuk berdeferensiasi menjadi sel adiposit sebagai salah satu kriteria MSC menurut ISCT (2016). Uji ini bertujuan untuk menemukan adanya droplet-droplet atau vakuola berisi lipid yang terbentuk pada sel MSC. Sel Mesenchymal Stem Cell dibiakkan dalam medium induksi adipogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop inverter.

Tampak gambaran MSCs yang berdiferensiasi adipogenik ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan Oil Red O.

5.1.1.2 Uji Diferensiasi Osteogenik

Uji diferensiasi osteogenik bertujuan untuk mengidentifikasi kemampuan MSC untuk berdeferensiasi menjadi sel osteosit sebagai salah satu kriteria MSC menurut ISCT (2016). Uji ini bertujuan untuk menemukan adanya kristalisasikalsium yang terbentuk pada sel MSC. Sel dibiakkan dalam medium induksi osteogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop inverter.



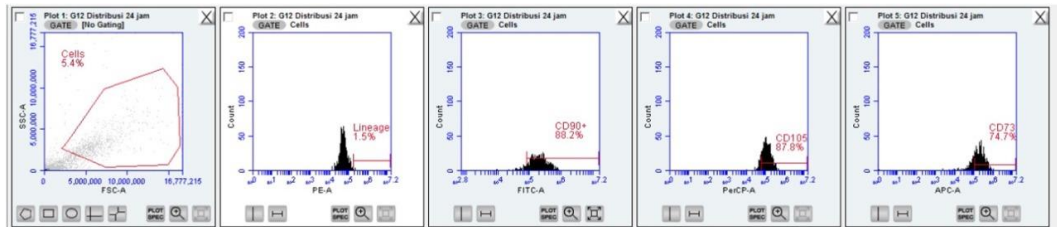
Gambar 5.3 Uji validasi MSCs diferensiasi osteogenic; perbesaran 200x.

Tampak gambaran MSCs yang berdiferensiasi osteogenic ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan Alizarid Red

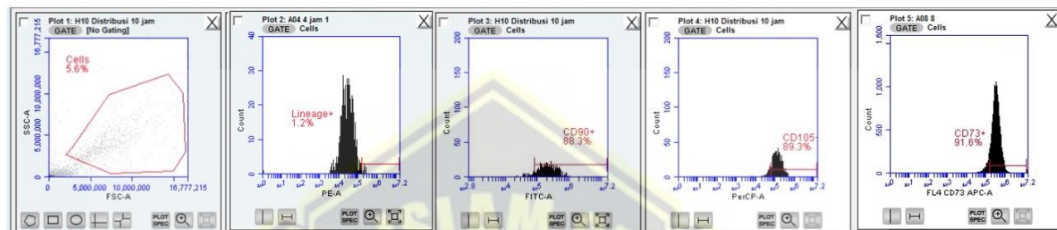
5.1.2 Kadar marker stemness

Marker stemness diukur menggunakan alat flowsitometri yang memiliki cara kerja menangkap pendaran cahaya laser yang melewati sel yang sudah diberi antibodi-fluoresence. Dengan konsep tersebut, bisa

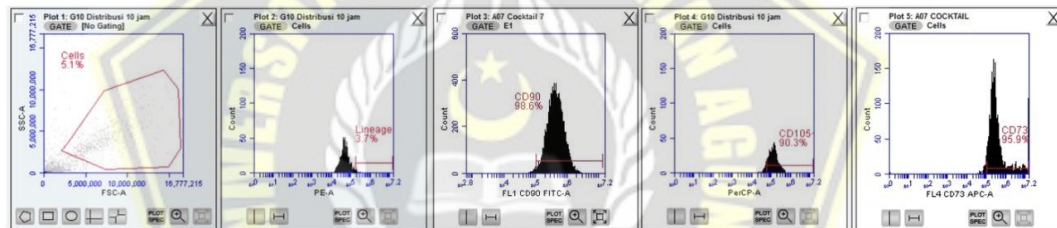
didapatkan grafik yang menunjukkan jumlah, ukuran sel, beserta granulosisnya seperti gambar dibawah ini.



(a)



(b)



(c)

Gambar 5.4 Hasil flowsitometri kadar LIN, CD90, CD105 dan CD73 pada tiga kelompok; (a) kelompok kontrol 0 jam; (b) kelompok P1 2 jam; (c) kelompok P2 4 jam

Rerata kadar CD73, CD90, CD105 dan LIN pada semua kelompok diuji normalitas data beserta homogenitasnya untuk menentukan uji beda yang digunakan.

Tabel 5.1 Uji Normalitas data (*Saphiro-wilk*)

Kelompok	Variabel	Sig.
Kontrol 0 jam	Lin	0.712
	CD90	0.979
	CD105	0.260
	CD73	0.606
Kelompok 2 jam	Lin	0.593
	CD90	0.425
	CD105	0.937
	CD73	0.532
Kelompok 4 jam	Lin	0.813
	CD90	0.880
	CD105	0.346
	CD73	1

*Data tidak normal. Data normal bila $p > 0,05$

Tabel 5.2 Uji Homogenitas data (*Lavene test*)

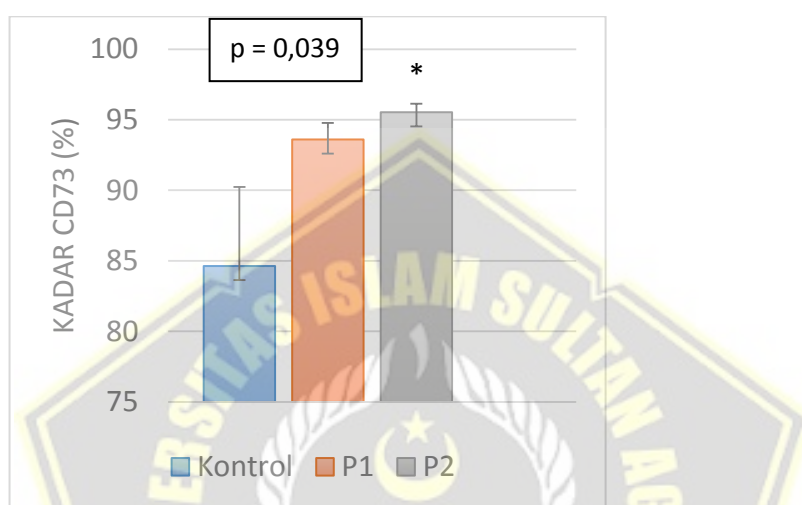
Variabel	Sig.
LIN	0.825
CD90	0.831
CD105	0.748
CD73	0.033*

*Data tidak Homogen. Data homogen bila $p > 0.05$

Dari uji normalitas dan homogenitas diatas didapatkan data normal pada data rerata semua variabel dan tidak homogen pada data rerata CD73. Uji beda yang digunakan pada kedua variabel CD73 adalah uji beda

nonparametrik untuk 2 kelompok lebih tidak bebasangan yaitu Uji *Kruskal-wallis* diikuti oleh Uji *Mann-Whitney*. Data rerata kadar CD105 dan CD90 dan LIN diuji beda dengan uji data parametrik One-way ANOVA diikuti dengan uji Post-Hoc.

5.1.2.1 Rerata kadar CD73



Gambar 5.5 Rerata kadar CD73 pada setiap kelompok.

Gambar diatas menunjukkan presentase kadar CD73 yang meningkat pada sampel sel yang sudah melalui resting time 2 jam dan 4 jam dibanding sel yang belum melalui resting. Kadar CD73 terendah ada pada kelompok kontrol yaitu 84,6% kemudian meningkat pada P1 (2 jam) 93,6% dan pada P2 (4 jam) 95,5%.

Hasil uji kruskal wallis rerata CD73 menunjukkan $P=0.039$ sehingga terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($p<0.05$). Selanjutnya dilakukan uji mann-whitney untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan.

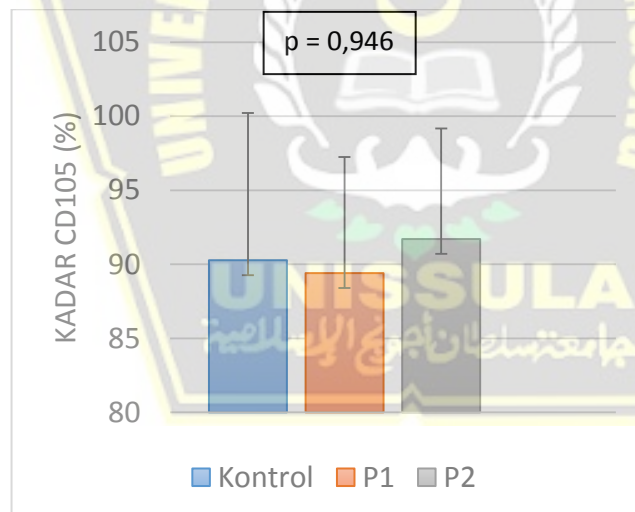
Tabel 5.3 Hasil Uji Mann-Whitney CD73

Kelompok	Sig.
0 jam – 4 jam	0.034 *
0 jam – 2 jam	0.408
2 jam – 4 jam	0.890

*Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0.05$)

Dari tabel diatas disimpulkan bahwa kadar rerata CD73 kelompok kontrol berbeda signifikan dengan kelompok P2 (resting 4 jam). Namun tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan P1 atau kelompok P1 dengan P2.

5.1.2.2 Rerata kadar CD105



Gambar 5.6 Rerata kadar CD105 pada semua kelompok.

Gambar diatas menunjukkan presentase kadar CD105 yang meningkat pada sampel sel yang sudah melalui resting time 2 jam dan 4 jam dibanding sel yang belum melalui resting. Kadar CD105 terendah ada

pada kelompok kontrol yaitu 90,27% kemudian meningkat pada P1 (2 jam) 89,40% dan pada P2 (4 jam) 91,70%. Hasil Uji ANOVA pada variabel CD105 menunjukkan $p=0.946$ sehingga tidak didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p>0.05$).

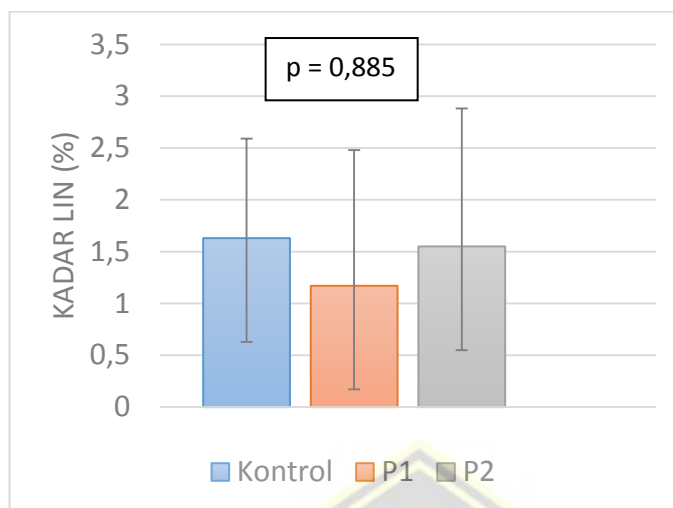
5.1.2.3 Rerata kadar CD90



Gambar 5.7 Rerata kadar CD90 pada semua kelompok.

Gambar diatas menunjukkan presentase kadar CD90 yang meningkat pada sampel sel yang sudah melalui resting time 2 jam dan 4 jam dibanding sel yang belum melalui resting. Kadar CD90 terendah ada pada kelompok kontrol yaitu 90,48% kemudian meningkat pada P1 (2 jam) 91,32% dan pada P2 (4 jam) 94,29%. Hasil Uji ANOVA pada variabel CD105 menunjukkan $p=0,627$ sehingga tidak didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p>0.05$).

5.1.2.4 Rerata kadar LIN



Gambar 5.8 Rerata kadar LIN semua kelompok

Gambar diatas menunjukkan presentase kadar LIN pada sampel sel kontrol dan sampel sel yang sudah melalui resting time 2 jam dan 4 jam. Berbeda dengan marker yang lain, data kadar LIN tidak menunjukkan adanya trend yang linier. Kadar LIN kelompok kontrol yaitu 1,63% kemudian meningkat pada P1 (2 jam) menjadi 1,17% dan pada P2 (4 jam) turun menjadi 1,55%. Hasil Uji One Way ANOVA variabel LIN menunjukkan $p=0,885$ sehingga tidak didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p>0,05$).

5.2 Pembahasan Hasil

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan rerata kadar CD73 secara signifikan pada semua kelompok ($p<0,05$) dan tidak adanya perbedaan signifikan rerata kadar LIN, CD1005 dan CD90 ($p>0,05$). Meskipun perbedaan yang signifikan hanya terdapat pada variabel CD73, didapatkan trend peningkatan pada

semua variabel marker *stemness* dengan dilakukannya resting pasca kultur hipoksia.

Marker positif CD105 biasanya didapatkan relatif lebih rendah dibanding kadar CD90 dan CD73 pada semua kelompok. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya seperti pada penelitian oleh Imam Rosadi, dkk dimana pasca kultur hipoksia, rerata CD73 memiliki rentang 98,8%-99,9% dan CD90 90,2%-99% sedangkan CD105 hanya 37,6%-54,51%.⁶² Penelitian lain yang serupa membandingkan marker *stemness* pasca kultur hipoksia 2% dan 5%. Kadar CD105 secara signifikan lebih rendah dibanding dua marker positif lainnya CD73 dan CD90 pada kultur hipoksia 5% padahal perbedaan tersebut tidak ditemukan pada kultur hipoksia 2%.⁴³

CD105 atau endoglin merupakan co-reseptor TGF-B yang berfungsi memodulasi sinyal dari TGF-B. Transkripsi Endoglin diregulasi oleh TGF-B, BMP-9 dan hipoksia.⁶³ Hipoksia mampu meningkatkan transkripsi endoglin, oleh karena itu kultur hipoksia pada MSC merupakan salah satu metode yang ditempuh untuk meningkatkan ekspresi endoglin sebagai marker *stemness*. Peran endoglin dalam memodulasi sinyal TGF-B adalah dengan menginduksi sinyal TGF-B melalui reseptor ALK-1.⁶⁴ TGF-B1 akan berikatan dengan ALK-5, kemudian terjadilah fosforilasi smad2/3. Dengan adanya Endoglin, ALK-1 akan ikut berikatan dengan kompleks TGF-B – ALK-5 sehingga yang difosforilasi adalah smad 1/5 dan respon sel terhadap TGF-B1 akan meningkat.⁶⁴

Pada banyak penelitian, overekspresi CD105 menunjukkan hambatan respon sel normal terhadap TGF- β mencakup hambatan proliferasi sel, down-regulasi c-myc RNA, stimulasi adhesi sel, agregasi homotypic dan fosforilasi *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* (CD31).⁶⁵ Inhibisi terhadap CD105 juga terbukti meningkatkan pertumbuhan sel yang diinduksi TGF- β 1 serta supresi migrasi sel.⁶⁶

Pada penelitian ini kadar CD90 juga menunjukkan trend peningkatan dengan dilakukannya resting pasca kultur hipoksia. Marker ini merupakan marker klasik MSC yang juga dianggap sebagai marker Cancer stem cell(CSCs). CD90 disebut berperan dalam aktivasi sel T, menghambat neurite outgrowth, pelepasan neurotransmitter pada sinaps, adesi astrosit, apoptosis pada sel karsinoma. Terlepas dari temuan peran CD90 secara fisiologis, fungsi CD90 pada MSC sendiri masih susah dijelaskan. Anggapan yang paling umum adalah bahwa ekspresi CD90 pada MSC menunjukkan status *undifferentiated* dari sel MSC.⁶⁷ Penurunan CD90 pada MSC mempermudah diferensiasinya menjadi osteosit dengan ditemukannya mineralisasi kalsium pasca induksi, dan adiposit dengan ditemukannya perubahan morfologi serta vakuola-vakuola adiposa pasca induksi⁶⁷. Dengan kata lain ekspresi CD90 menunjukkan status undifferentiated serta kemampuan multipotensi dari MSC.

CD73 merupakan satu-satunya marker stemness yang memiliki perbedaan signifikan antar kelompok. Resting selama 4 jam pasca kultur hipoksia terlihat meningkatkan ekspresi CD73 pada MSC dibanding MSC yang tidak diberi perlakuan resting. CD73 sendiri merupakan salah satu marker klasik MSC yang

dianggap berperan pada properti reparatif MSC.⁸ Hal itu didasari pada fungsi utama CD73 untuk menghidrolisis Adenosine triphosphate (ATP) menjadi adenosin dan fosfat. ATP ekstrasellular dalam kadar tinggi mampu memicu inflamasi sedangkan adenosine merupakan salah satu anti-inflamasi yang kuat.⁶⁸ Kemampuan immunomodulatori dianggap meningkatkan kualitas produk MSC karena mampu bersifat regeneratif pada jaringan transplant dengan mengatur inflamasi jaringan setempat.

Pada penelitian ini marker-marker stemness memiliki trend peningkatan bahkan CD73 secara signifikan meningkat dengan perlakuan resting pasca kultur hipoksia. Peningkatan marker stemness ini juga ditemukan pada MSC yang dikultur secara hipoksia dibanding MSC yang dikultur secara normoxia.² Hal ini dapat dijelaskan dengan anggapan bahwa peningkatan marker stemness diakibatkan oleh proses hipoksia yang terjadi sebelumnya atau disebabkan karena peningkatan ROS akibat proses resting.

Hipoksia melalui HIF- α menjadi salah satu regulator ekspresi CD73.⁶⁹ HIF- α adalah faktor transkripsi yang akan menjadi hetero dimer dengan HIF- β pada kondisi hipoksia. Pada kondisi hipoksia enzim PHD akan dihambat sehingga HIF- α tidak dikenali oleh VHL. HIF- α akan menjadi stabil sehingga memasuki nukleus dan berikatan dengan HIF- β . Kompleks HIF- $\alpha\beta$ beserta kofaktornya akan mengikat Hypoxia response element (HRE) dan menginduksi ekspresi-ekspresi gen sebagai respon hipoksia termasuk ekspresi CD73.⁶⁹ Regulasi CD73 tidak sepenuhnya berpaku pada induksi HIFs melainkan juga pada HRE, dimana contohnya pada beberapa penelitian, pemotongan 5' yang lebih besar dari urutan

promotor pada bp -518 hingga +63 (pGL20.57NT) menunjukkan peningkatan induksibilitas hipoksia dibandingkan dengan promotor *full-length*, menunjukkan adanya aktivitas represor parsial.⁷⁰ Mutasi pada HIF binding site bahkan dapat menimbulkan hilangnya induksibilitas hipoksia secara total. CD73 yang meningkat pada kondisi hipoksia dianggap memiliki peran fisiologis agar sel mampu menghadapi kondisi tersebut dengan memetabolisme ADP untuk menghasilkan adenosine ekstrasellular.⁷¹

Proses lain yang mungkin bisa menjelaskan peningkatan kadar CD73 adalah peningkatan ROS akibat resting. Resting sendiri hakikatnya adalah tindakan reoksigenasi setelah sel mengalami kondisi hipoksia untuk jangka waktu tertentu. Peningkatan ROS pada sel yang direoksigenasi pasca prekondisi hipoksia merupakan anggapan umum yang sudah dibahas pada banyak penelitian. Peningkatan ROS yang berlebih akibat proses hipoksia-reoksigenasi itu dapat menyebabkan apoptosis sel yang disebut *Hypoxia-Reoxygenation Injury (HRI)*. Kerusakan sel akibat HRI sering terjadi pada kasus *in vivo* seperti pada penyakit-penyakit akibat iskemia endotel namun jarang terjadi pada penelitian *in vitro*.⁷² ROS sudah lama dianggap sebagai zat yang membahayakan fungsi dan struktur sel namun anggapan ini semakin ditinggal karena temuan-temuan baru. Salah satunya adalah temuan famili enzim NADPH oksidase (NOX) pada awal abad ke-20. Rupanya NOX mengoksidasi NADPH menjadi NADP^+ dan menghasilkan superoksida sebagai produk utamanya. Hal ini menguatkan asumsi bahwa kadar ROS yang tepat diperlukan bahkan untuk fungsi sel normal. Bahkan pada MSC ROS dianggap mempengaruhi pathway sinyalisasi esensial sehingga

mempengaruhi fungsi sel, proliferasi, diferensiasi, survival serta apoptosisnya.

73,74,75

Mitokondria merupakan sumber ROS utama secara fisiologis. ROS dihasilkan oleh sistem transport elektron oleh NOX, xanthine oxidase, cytochrome p450, NO synthases, lipoxygenase, heme oxygenase, cyclooxygenase, myeloperoxidase dan monoamine oxidase.⁷⁶ ROS kadar rendah akan diproduksi oleh mitokondria dimana sekitar 0.2-2% oksigen yang dikonsumsi akan direduksi menjadi superoksida.⁷⁷ Dampak dari proses tersebut adalah kelebihan muatan proton di ruang intermembran yang dapat menyebabkan hiperpolarisasi membran mitokondria sehingga produksi ROS semakin meningkat. Uncoupling protein 2 (UCP2) bertanggungjawab untuk proteksi hiperpolarisasi tersebut dengan cara mengkonduksi proton dan reverse transfer ke ruang matrix. Aktivitas protein ini diatur oleh kadar ROS dimana pada saat kadar ROS rendah, protein ini akan terglutathionisasi sehingga menghentikan proses konduktansi proton dan sebaliknya.⁷⁸ Pada kondisi hipoksia, dimana produksi energi bergeser ke arah anaerobic, UCP2 mengalami deaktivasi bahkan hingga momen reoksigenasi terjadi. Akibatnya pada saat reoksigenasi, terjadilah hiperpolarisasi membran mitokondria dan produksi ROS meningkat.⁷⁹

Meskipun masih menjadi perdebatan ROS yang meningkat dianggap mampu menjadi stimulan non-hipoksia HIF- α . Hal ini didukung dengan temuan bahwa terjadi peningkatan HIF- α dengan aktivasi ROS oleh thrombin.⁸⁰ Transkripsi ini diperantarai oleh NF κ B pathway yang meningkatkan aktivitas promoter HIF- α . Sehingga secara tidak langsung peningkatan ROS diasumsikan

berakibat pada peningkatan induksi HIFs dan aktivasi Hypoxia Response Element di tingkat nukleus.

5.3 Kelemahan Penelitian

Penelitian ini masih jauh dari kata sempurna. Salah satu kelemahan penelitian ini adalah jumlah sel uji yang relatif sedikit. Hal ini bisa disebabkan karena beberapa hal diantaranya : 1) kekurangan pada metode kultur, misalnya sel yang digunakan adalah sel pasase awal, atau kultur belum cukup lama sehingga sel belum konfluen. 2) kekurangan pada metode panen sel, misalnya inkubasi tripsin belum cukup lama sehingga sel belum terangkat dari plastik dan 3) kecurigaan adanya apoptosis akibat HIR. Meskipun apoptosis ini jarang terjadi pada kasus *in vitro* dengan prekondisi hipoksia yang teratur, kecurigaan pada apoptosis harus dipertimbangkan. Sehingga saran untuk penelitian selanjutnya tetap diadakan proses hitung sel dan pengukuran proliferasi serta dilakukan metode uji tertentu untuk mendeteksi ada atau tidaknya sel MSC yang apoptosis. Proses resting yang lebih panjang juga harus diuji untuk melihat bagaimana kondisi atau ketahanan MSC setelah diresting selama lebih dari 12 jam paska kultur hipoksia.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa stem sel yang mendapatkan tindakan resting pasca kultur mengalami peningkatan potensi immunomodulasi ditandai dengan meningkatnya CD73 secara signifikan. Selain itu tidak ada perbedaan signifikan CD105 antar kelompok. Temuan ini penting untuk menunjukkan bahwa tindakan resting pasca kultur hipoksia tidak mengubah potensi diferensiasi stem sel, karena CD105 berhubungan dengan potensi

diferensiasi osteogenik MSC, setidaknya hingga 4 jam resting.⁸¹ Peneliti menganggap kadar marker stemness masih dapat terus meningkat dengan dilakukannya waktu resting yang lebih lama.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan data penelitian tentang pengaruh variasi resting time pasca hipoksia kultur MSC terhadap ekspresi LIN, CD90, CD105 dan CD73 ditemukan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan kadar CD73 pada kelompok resting 4 jam dibanding kelompok kontrol dan terdapat trend peningkatan marker stemness CD90 dan CD105 dengan dilakukannya resting. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa resting pada MSC pasca kultur hipoksia meningkatkan ekspresi marker stemness MSC yang secara tidak langsung juga mempengaruhi kualitas proliferasi, diferensiasi serta multipotensi dari MSC yang diproduksi.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek resting/reoksigenasi dengan jangka waktu yang lebih lama (>12 jam) pasca kultur hipoksia terhadap marker stemness dengan mempertimbangkan terjadinya Hypoxia-Reoxygenation Injury. Oleh karena itu hitung jumlah sel, hitung jumlah proliferasi serta identifikasi adanya apoptosis sel MSC sangat dianjurkan pada penelitian yang serupa.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 John G, Brigid H, Douglas M, Roger P. Essentials of Stem Cell Biology. 2009; : p:7-17.
- 2 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164–171.
- 3 Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Akbarzadehlaleh P, Dehdilani N, Abbasi P *et al.* The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Adv Pharm Bull* 2015; **5**: 141–149.
- 4 Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**. doi:10.1155/2017/8416763.
- 5 Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D *et al.* Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 2010; **107**: 1547–1552.
- 6 Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006; **2**: 351–360.
- 7 Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC *et al.* Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia. *J Exp Med* 2004; **200**: 1395–1405.
- 8 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315–317.
- 9 Carothers AM, Rizvi H, Hasson RM, Heit YI, Davids JS, Bertagnolli MM *et al.* Mesenchymal stromal cell mutations and wound healing contribute to the etiology of desmoid tumors. *Cancer Res* 2012; **72**: 346–355.
- 10 Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* 2009; **59**: 31–44.
- 11 Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C *et al.* Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Hematop Stem Cells* 2008; **111**: 2631–2635.
- 12 Sibov TT, Severino P, Marti LC, Pavon LF, Oliveira DM, Tobo PR *et al.* Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: Parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology* 2012; **64**: 511–521.

- 13 Saalbach A, Haustein UF, Anderegg U. A ligand of human Thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated Thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 882–888.
- 14 Rege TA. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 2006; **20**: 1045–1054.
- 15 Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003; **17**: 984–992.
- 16 Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002; **277**: 29197–29209.
- 17 Sarmoko, Larasati. Regulasi siklus sel. *Cancer Chemoprevention Res Cent* 2003; : 1–8.
- 18 Burns DK, Kumar V. Buku Ajar Patologi. 2007; **2**: 864–868.
- 19 Underwood J C E. Patologi Umum dan Sistemik. 2000; : 472–479.
- 20 Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: 1–14.
- 21 Nema R, Khare S. An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Adv Biosci Biotechnol* 2012; **03**: 219–226.
- 22 Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz MR, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells* 2014; **7**: 118–126.
- 23 Wang S, Qu X, Zhao R. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol* 2012; **5**: 19.
- 24 Walker E, Stanford WL. Regulatory Networks in Stem Cells. 2009. doi:10.1007/978-1-60327-227-8.
- 25 Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M *et al*. Pluripotency Regulators in Human Mesenchymal Stem Cells: Expression of NANOG But Not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 2011; **20**: 915–923.
- 26 Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M *et al*. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *J Vis Exp* 2017; : 1–13.
- 27 Cooper GM. The Eukaryotic Cell Cycle (2nd ed). Cell A Mol. Approach.

- 2nd Ed. Sunderl. 2000; : 106.
- 28 King R. Cancer Biology. *Mol. Biol. Cell.* 2010; : 4–5.
 - 29 Orlando, D.A, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JES IV. Global Control of Cell Cycle Transcription by Coupled CDK and Network Oscillators. 2008; : 453 (453): 944-947.
 - 30 Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem Rev* 2011; **111**: 3407–3432.
 - 31 Velazquez OC. NIH Public Access. *J Vasc Surg* 2009; **45**. doi:10.1016/j.jvs.2007.02.068. Angiogenesis.
 - 32 Musina, R.A, E.S. Bekchanova, A.V. Belyavskii GTS. Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cell of Different Origin. 2006; : 147–151.
 - 33 Jiang, R., Han, Z., Zhuo G et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study Authors. 2011; : 94–100.
 - 34 Martins AA, Paiva A, Morgado JM, Gomes A, Pais ML. Quantification and Immunophenotypic Characterization of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells by Multicolor Flow Cytometry. *Transplant Proc* 2018; **41**: 943–946.
 - 35 Klingemann H, Matzilevich D, Marchand J. Mesenchymal stem cells - Sources and clinical applications. *Transfus Med Hemotherapy* 2008; **35**: 272–277.
 - 36 Lee CY, Kang JY, Lim S, Ham O, Chang W, Jang D. Hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem cells promotes lymphangiogenesis by regulation of mitochondrial-related proteins. *Stem Cell Res Ther* 2016; : 1–11.
 - 37 Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy* 2012; **14**: 516–521.
 - 38 Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF- κ B- but not JNK-dependent mechanism. *AJP Cell Physiol* 2008; **294**: C675–C682.
 - 39 Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in. 2014; **2014**: 7–9.
 - 40 Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 2119–2134.
 - 41 Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F. Influence of

- oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 2005; **204**: 184–191.
- 42 Liu J, Hao H, Xia L, Ti D, Huang H, Dong L *et al.* Hypoxia pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells facilitates angiogenesis by improving the function of endothelial cells in diabetic rats with lower ischemia. *PLoS One* 2015; **10**: 1–18.
- 43 Antebi B, Rodriguez LA, Walker KP, Asher AM, Kamucheka RM, Alvarado L *et al.* Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2018; **9**: 1–15.
- 44 Prabhakar NR. O₂ sensing at the mammalian carotid body: Why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* 2006; **91**: 17–23.
- 45 Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes and Cancer* 2011; **2**: 1117–1133.
- 46 Hubbi ME, Semenza GL. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2015; **309**: C775–C782.
- 47 Hackenbeck T, Knaup KX, Schietke R, Schödel J, Willam C, Wu X *et al.* HIF-1 or HIF-2 induction is sufficient to achieve cell cycle arrest in NIH3T3 mouse fibroblasts independent from hypoxia. *Cell Cycle* 2009; **8**: 1386–1395.
- 48 Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 2010; **8**: 1–9.
- 49 Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; **78**: 55–62.
- 50 Kim HO, Choi SM, Kim HS. Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng Regen Med* 2013; **10**: 93–101.
- 51 Lotfinia M, Lak S, Mohammadi Ghahhari N, Johari B, Maghsood F, Parsania S *et al.* Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Iran Biomed J* 2016; **21**: 24–31.
- 52 Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in 10.1155/2014/965849 Medicine. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 965849.
- 53 Teodelinda M, Michele C, Sebastiano C, Ranieri C, Chiara G. Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials* 2011; **32**: 3689–3699.

- 54 Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noël A *et al.* Conditioned Medium from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Rats: An Original Strategy to Avoid Cell Transplantation. *PLoS One* 2013; **8**. doi:10.1371/journal.pone.0069515.
- 55 Chen L. World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Roles of Wnt / β -Catenin Signaling in Controlling the Dopaminergic Neuronal Cell Commitment of Midbrain and Therapeutic Application for Parkinson ' s Disease. .
- 56 Byung-soon P, Won-serk K, Joon-seok C, Hyung-ki K, Jong-hyun W, Fumio O. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia : evidence of increased growth factor secretion. 2010; **31**: 27–34.
- 57 Rodrigues M, Griffith LG, Wells A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; **1**: 32.
- 58 Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, Preciado S, Puig N, López-Ruano G *et al.* MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal* 2016; **14**: 1–14.
- 59 Zhang X, Wang Y, Gao Y, Liu X, Bai T, Li M *et al.* Maintenance of high proliferation and multipotent potential of human hair follicle-derived mesenchymal stem cells by growth factors. *Int J Mol Med* 2013; **31**: 913–921.
- 60 Aksoy I, Stanton LW. Pluripotency-Regulating Networks Provide Basis for Reprogramming. *Curr Mol Med* 2013; **13**: 695–706.
- 61 Xiao H, Wu R. Quantitative investigation of human cell surface N-glycoprotein dynamics. *Chem Sci* 2016; **8**: 268–277.
- 62 Rosadi I, Rosliana I, Sobariah S, Afini I, Widyastuti T, Barlian A. EKSPRESI PROTEIN CD73/CD90/CD105/CD34/CD45/CD11b/CD19/HLA-DR PADA SEL PUNCA ASAL JARINGAN LEMAK MANUSIA MENGGUNAKAN FLOW CYTOMETRY. *Al-Kauniyah J Biol* 2019; **12**: 133–141.
- 63 Nassiri. Endoglin Review. 2011; **2290**: 2283–2290.
- 64 Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M *et al.* Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J* 2004; **23**: 4018–4028.
- 65 Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U *et al.* Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J Cell Biol* 1996; **133**: 1109–1121.

- 66 LI C, HAMPSON IN, HAMPSON L, KUMAR P, BERNABEU C, KUMAR S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor β 1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000; **14**: 55–64.
- 67 Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR *et al.* A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2016; **7**: 1–14.
- 68 Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013; **19**: 355–367.
- 69 Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, Sauvage D, Van Moer K, Viry E *et al.* Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints. *Cancer Lett* 2019; **458**: 13–20.
- 70 Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 2002; **110**: 993–1002.
- 71 Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* 2013; **171**: 1–7.
- 72 Liaudet L, Szabó G, Szabó C. Oxidative stress and regional ischemia-reperfusion injury: The peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase connection. *Coron Artery Dis* 2003; **14**: 115–122.
- 73 Coso S, Harrison I, Harrison CB, Vinh A, Sobey CG, Drummond GR *et al.* NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: Current and emerging concepts. *Antioxidants Redox Signal* 2012; **16**: 1229–1247.
- 74 Storz P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal* 2011; **14**: 593–605.
- 75 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; **87**: 245–313.
- 76 Braunersreuther V, Jaquet V. Reactive Oxygen Species in Myocardial Reperfusion Injury: From Physiopathology to Therapeutic Approaches. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; **13**: 97–114.
- 77 Mailloux RJ, Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 1106–1115.
- 78 Zhou DGE-JZE-C. The Hypoxia-Reoxygenation Injury Model. IntechOpen: Rijeka, 2017, p Ch. 3.
- 79 Gero D, Szabo C. Salvage of nicotinamide adenine dinucleotide plays a

critical role in the bioenergetic recovery of post-hypoxic cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2015; **172**: 4817–4832.

- 80 Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C *et al.* Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 755–761.