

**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA PENYEMBUHAN
LUKA FASE INFLAMASI DAN PROLIFERASI**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi pada hari ke 3,
6 dan 9)**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Diajukan Oleh :

Nandiah Fatimah

30101507518

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2022

SKRIPSI

**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA
PENYEMBUHAN LUKA FASE INFLAMASI DAN PROLIFERASI
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi
pada harike 3, 6 dan 9)**

**Yang dipersiapkan dan disusun oleh :
Nandiah Fatimah
30.101.50.7518**

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Pada tanggal 20 juni 2022
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



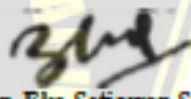
Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si, Med.

Pembimbing II



dr. Azizah Retno K, Sp.A, M.Biomed

Anggota Tim Penguji



Dr. Eko Setiawan Sp.B
Penguji I



dr. Conita Yuniarifa, M.Biomed
Penguji II

Semarang, 29 Juni 2022

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan



Dr.dr.Setyo Trisnadi, SH.,Sp.KF

PERNYATAAN PERSETUJUAN UNGGAB KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nandiah Fatimah
Nim : 30101507518
Program Studi : Kedokteran Umum
Fakultas : Kedokteran

Dengan ini menyerahkan karya ilmiah berupa Skripsi dengan judul :

**PENGARUH MSC HIPOKSIDA TERHADAP KADAR TGF- β PADA
PENYEMBUHAN LUKA FASE INFLAMASI DAN PROLIFERASI**

(STUDI EKSPERIMENTAL IN VIVO PADA TIKUS GALUR WISTAR JANTAN YANG
DIEKSISI PADA HARI KE 3, 6 DAN 9)

Dan menyetujuinya menjadi hak milik Universitas Islam Sultan Agung serta memberikan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif untuk disimpan, dialih mediakan, dikelola dalam pangkalan data, dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama masih tetap menguntungkan sama penulis sebagai pemilik Hak Cipta.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila dikemudian hari terbukti adanya pelanggaran Hak Cipta/Plagiarisme dalam karya ilmiah ini, maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung secara pribadi tanpa melibatkan pihak Universitas Islam Sultan Agung.

Semarang, 20 Juni 2022
UNISSULA
جامعتنا سلطان ابيجوي الإسلامية
Yang menyatakan



Nandiah Fatimah

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur kita panjatkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala. Dzat yang hanya kepada-Nya memohon pertolongan. Alhamdulillah atas segala rahmat-Nya penulis telah diberi kesempatan, kesehatan, serta kekuatan sehingga skripsi yang berjudul, "**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA PENYEMBUHAN LUKA FASE**

INFLAMASI DAN PROLIFERASI (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi Hari Ke 3, 6 dan 9) " yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang telah diselesaikan dengan baik.

Skripsi ini tentunya tidak lepas dari bimbingan, masukan, dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, MSi. Med. dan dr. Azizah Retno K, Sp.A. M.Biomed selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan, membimbing, dan memotivasi penulis sehingga terselesaikannya skripsi ini.

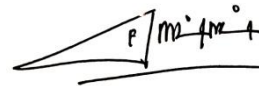
3. dr. Eko Setiawan, Sp.B. dan dr. Conita Yuniarifa, M.Biomed selaku dosen penguji yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Segenap Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Para staf Laboratorium SCCR Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah membantu penelitian sampai selesai.
5. Kedua orang tua dan keluarga yang tak henti-hentinya mendoakan, mendukung, dan memberi motivasi atas pengerjaan skripsi ini.
6. Sahabat-sahabat tersayang saya dari SMA yang telah memberi semangat dan dukungan atas pengerjaan skripsi ini.
7. Semua pihak yang telah banyak membantu terselesainya Karya Tulis Ilmiah ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu kritik maupun saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan demi tercapainya hal terbaik dari penelitian ini.

Akhir kata penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat sekaligus menambah pengetahuan bagi berbagai pihak di bidang kedokteran.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Semarang, 20 Juni 2022
Penulis



Nandiah Fatimah



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
INTISARI.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Umum.....	4
1.3.2. Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Teoritis	5
1.4.2. Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. TGF- β	6
2.1.1. Definisi	6
2.1.2. Sintesis TGF- β	7
2.1.3. Peranan TGF- β Secara Umum	9
2.1.4. Peranan TGF- β pada Penyembuhan Luka	11
2.2. Penyembuhan Luka.....	16
2.3. Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka	21
2.4. MSC Hipoksia	22
2.4.1. Definisi	22
2.4.2. Sumber	23
2.4.3. Karakteristik.....	24
2.4.4. Hipoksia	24
2.4.5. Respon Fisiologi Sel Terhadap Hipoksia.....	25
2.4.6. Respon MSC Terhadap Kondisi Hipoksia	26

2.6.	Hubungan MSC Hipoksia Terhadap Kadar TGF- β Pada Penyembuhan Luka Fase Inflamasi Dan Proliferasi	28
2.6.	Kerangka Teori	30
2.7.	Kerangka Konsep.....	31
2.8	Hipotesis	31
BAB III METODE PENELITIAN		32
3.1.	Jenis & Rancangan Penelitian	32
3.2.	Variabel Penelitian.....	32
3.2.1.	Independen.....	32
3.2.1.	Dependen.....	32
3.3.	Definisi Operasional.....	32
3.3.1.	MSC Hipoksia	32
3.3.2.	Kadar TGF- β	33
3.4.	Subyek dan Sampel Penelitian.....	33
3.4.1.	Subjek	33
3.4.2.	Sampel.....	34
3.4.3.	Tata Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	34
3.4.4.	Besaran Sampel.....	35
3.5.	Alat & Bahan Penelitian.....	35
3.5.1.	Alat.....	35
3.5.2.	Bahan.....	36
3.6.	Cara Penelitian.....	37
3.6.1.	Pengajuan <i>Ethical Clearance</i>	37
3.6.2.	Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	37
3.6.3.	Kultur Sel.....	39
3.6.4.	Proses Pemanenan Sel.....	39
3.6.5.	Proses Penghitungan Sel	40
3.6.6.	Pembacaan CD73, CD90, CD105 dengan <i>Flow Cytometry</i>	41
3.6.7.	Prosedur Hipoksia	42
3.6.8.	Pembuatan Luka Pada Hewan Coba.....	42
3.6.9.	Perlakuan Pada Luka Hewan Coba	43

3.6.10. Pengambilan Sampel Darah Tikus	44
3.6.11. Perhitungan Kadar TGF- β	44
3.7. Tempat & Waktu Penelitian	45
3.7.1. Tempat	45
3.7.2. Waktu	45
3.8. Analisis Data.....	45
3.9. Alur Penelitian	47
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN Error! Bookmark not defined.	46
4.1. Hasil	46
4.2. Pembahasan.....	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
5.1. Kesimpulan	54
5.2. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56
LAMPIRAN.....	60



DAFTAR SINGKATAN

ATP	= <i>Adenosine triphosphate</i>
CD	= <i>Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	= <i>Carbon dioxide</i>
DAMP	= <i>Damage Associate Molecule Pattern</i>
DMEM	= <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ECM	= <i>Extra cellular matrix</i>
ELISA	= <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	= <i>Epithelial to mesenchymal transition</i>
FBS	= <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	= <i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	= <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GSH	= <i>Glutathione</i>
HIF	= <i>Hypoxia-inducible factors</i>
HIF-1 α	= <i>Hypoxia-inducible factors-1 alpha</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
MSC	= <i>Mesenchymal stem cells</i>
NF- κ B	= <i>Nuclear factor kappa beta</i>
PBS	= <i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF	= <i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	= <i>Phycoerythrin</i>
PMN	= <i>Polymorphonuclear</i>
PrPC	= <i>Prion protein</i>
ROS	= <i>Reactive oxygen species</i>
SMAD3	= <i>SMAD Family Member 3</i>
SOD	= <i>Superoxide dismutases</i>
TGF- β	= <i>Transforming growth factor beta</i>

TNF- α = *Tumor necrosis factor alpha*
VEGF = *Vascular endothelial growth factor*
 α -SMA = *Alpha-smooth muscle actin*



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tahapan sintesis TGF- β	7
Gambar 2.2.	Peran TGF- β pada proses penyembuhan luka	13
Gambar 2.3.	Tahapan penyembuhan luka dan estimasi waktu yang diperlukan dalam setiap tahapan	14
Gambar 2.4.	Proses penyembuhan luka, fase inflamasi	15
Gambar 2.5.	Proses penyembuhan luka, fase proliferasi	17
Gambar 2.6.	Proses penyembuhan luka, fase pematangan dan <i>remodeling</i>	19
Gambar 2.7.	Morfologi MSC	21
Gambar 2.8.	Sumber utama MSC	21
Gambar 2.9.	Tiga kriteria dari MSC	22
Gambar 2.10.	Regulasi HIF-1 pada normoksia dan hipoksia	24
Gambar 2.11.	Lingkungan hipoksia meningkatkan kemampuan MSC	25
Gambar 2.12.	Kerangka teori	28
Gambar 2.13.	Kerangka konsep	29
Gambar 3.1.	Bilik Hitung	38
Gambar 3.2.	Alur penelitian	45
Gambar 4.1.	Kadar TGF- β antar Kelompok dan Pengamatan	47

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam <i>Flow Cytometry</i>	39
Tabel 4.1. Hasil <i>Shapiro Wilk</i> dan <i>Levene Test</i>	48
Tabel 4.2. Hasil <i>One Way Anova</i> Perbedaan Kadar TGF- β antar Kelompok pada Tiap Waktu Pengamatan	49



INTISARI

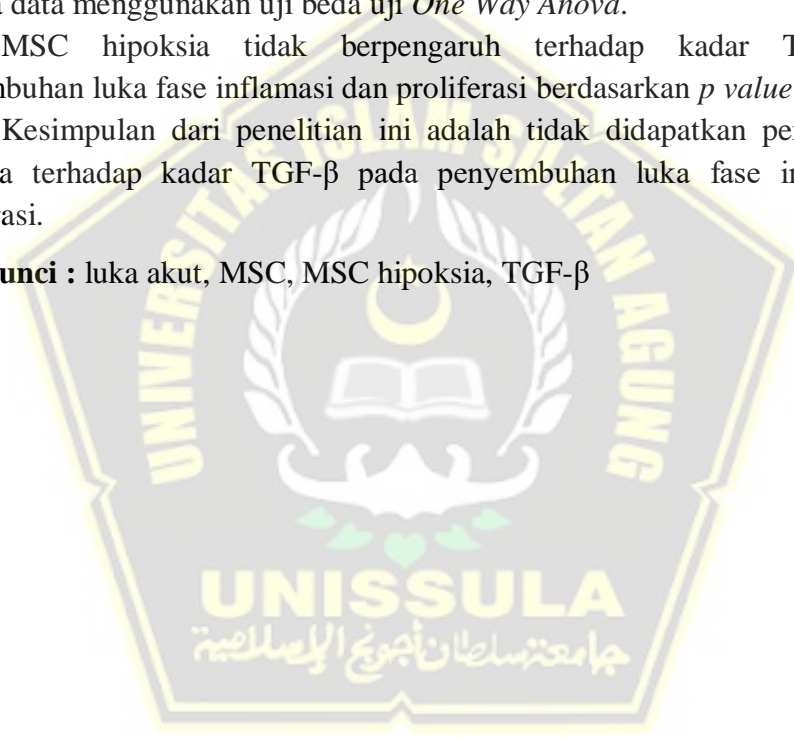
Luka akut yang normalnya dapat sembuh dengan cepat bisa saja berubah menjadi kronis dan menghasilkan jaringan parut sehingga membutuhkan terapi alternatif. Salah satu terapi alternatifnya adalah *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) normoksia. Penelitian ini memiliki tujuan guna memahami pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.

Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimental *post test only control group design*. Sampel penelitian ini merupakan 20 ekor tikus putih jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria eksklusi dan inklusi Sampel dibagi menjadi empat kelompok berisi sham, kontrol dengan *phospat buffer saline*, MSC normoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel, dan MSC hipoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel. Analisa data menggunakan uji beda uji *One Way Anova*.

MSC hipoksia tidak berpengaruh terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi berdasarkan *p value* = 0,083.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak didapatkan pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.

Kata kunci : luka akut, MSC, MSC hipoksia, TGF- β



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka ialah hilangnya kontinuitas epidermis, penyebabnya karena cedera mekanis, kimiawi, biologis, atau termal. Penyembuhan luka kulit adalah proses fisiologis yang sangat terorganisir yang memulihkan integritas kulit setelah cedera (Hu *et al.*, 2014). Permasalahan muncul ketika penyembuhan luka terganggu sehingga menyebabkan luka berkembang menjadi kronik dan munculnya jaringan parut. Metode yang saat ini paling banyak dikaji untuk menyembuhkan luka adalah *mesenchymal stem cell* (MSC) karena memiliki kemampuan diferensiasi serta mampu mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan yang berguna bagi penyembuhan luka, termasuk *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) (Aydemir *et al.*, 2016). Namun di sisi lain, penelitian terkini menyebutkan bahwa MSC yang dikultur dalam kondisi normoksia tidak mampu bertahan hidup pada area luka yang memiliki kondisi hipoksia. Oleh karena itu diperlukan metode untuk meningkatkan kemampuan bertahan hidup MSC pada area luka.

Beberapa teknik kultur dilakukan untuk meningkatkan kualitas MSC salah satunya adalah kultur pra kondisi pada lingkungan hipoksia. Kultur hipoksia mampu meningkatkan kualitas MSC dari segi proliferasi, kemampuan bertahan hidup, serta lebih banyak mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan seperti TGF- β (Ocansey *et al.*, 2020). TGF- β yakni

salah satu faktor pertumbuhan sentral yang mempunyai peran pada masing-masing tahapan penyembuhan luka khususnya di fase inflamasi dan proliferasi (Behm *et al.*, 2011). TGF- β melalui isoformnya pada penyembuhan luka membantu migrasi dan aktivasi sel inflamasi pada fase inflamasi serta mengatur reepitelisasi, angiogenesis dan pembentukan jaringan granulasi pada fase proliferasi (Gilbert *et al.*, 2016). Dalam mekanisme penyembuhan luka, peranan MSC hipoksia pada kadar TGF- β masih sedikit dilakukan penelitian khususnya selama fase inflamasi dan proliferasi, maka diperlukan riset mengenai pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka di fase inflamasi serta fase proliferasi pada hari ke 3, 6 dan 9.

Luka akut adalah permasalahan kesehatan yang umum terdapat di semua negara di dunia. Sekitar 11 juta orang di negara Amerika Serikat terkena dan sekitar 300.000 orang tiap tahunnya dirawat di rumah sakit (Demidova-Rice *et al.*, 2012). Sementara itu, prevalensi kejadian luka di Indonesia berdasar hasil dari suatu Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) pada 2013 yakni sebanyak 8,2% dan jenis luka paling tinggi yang dialami penduduk Indonesia ialah luka lecet 70,9 persen dan diikuti luka robek 23,2 persen. Sementara itu untuk etiologi luka paling banyak ialah akibat jatuh yakni sebesar 40,9% lalu kecelakaan lalu lintas sebesar 40,6% (Balitbang Kemenkes RI, 2013). Kondisi luka akut menjadi luka kronis akibat gagal untuk sembuh dan menjadi luka kronis atau gagal sembuh sempurna dan menjadi jaringan parut dimana dapat mengurangi estetika

kulit. Kondisi ini menyebabkan beban tersendiri bagi pasien karena menghabiskan biaya untuk berbagai perawatan yang tidak sedikit (Murphy & Evans, 2012).

MSC adalah populasi sel pleiotropik dengan kemampuan *selfrenewal* dan bisa berdiferensiasi jadi berbagai sel mesenkim, berupa adiposit, kondrosit, dan osteosit (Glenn & Whartenby, 2014). Kondisi hipoksia memberikan manfaat bagi MSC untuk meningkatkan kemampuan pembaruan diri, proliferasi, dan kemampuan bertahan hidup (Raoufi *et al.*, 2011). MSC hipoksia meniru kondisi fisiologis yang ada di sumsum tulang sehingga berpotensi meningkatkan kemampuan MSC pada tahapan penyembuhan luka. Perihal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan salah satunya kegagalan terapi pemberian MSC adalah kemampuan *engraftment* yang buruk dan kemampuan bertahan hidup sel yang rendah selama proses transplantasi di lokasi cedera yang bersifat hipoksia (Yustianingsih *et al.*, 2019). Selain itu penelitian terdahulu melaporkan bahwa MSC yang dikultur pada kondisi hipoksia lebih kuat dalam mengontrol peradangan dan mempercepat penutupan luka dibandingkan MSC normoksia melalui peningkatan produksi IL-10 yang merupakan sitokin antiinflamasi dan TGF- β yang merupakan pemicu sintesis kolagen (Lotfinia *et al.*, 2017).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar pada penjabaran yang sudah disampaikan pada latar permasalahan tersebut, bisa didapatkan suatu rumusan permasalahan

yakni: "Apakah terdapat pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi?"

1.3 Tujuan Riset

1.3.1 Umum

Guna memahami pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.

1.3.2 Khusus

Tujuan khusus yang diharapkan dari penelitian ini yakni untuk mengukur kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan fase proliferasi pada kelompok sham, kelompok kontrol, kelompok MSC normoksia, dan MSC hipoksia.

1.4 Manfaat Riset

1.4.1 Teoritis

Memberi berbagai info ilmiah kedokteran terkait peranan MSC hipoksia, sebab selaku fungsi agen regeneratif yang berpengaruh terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan fase proliferasi.

1.4.2 Praktis

MSC hipoksia selaku terobosan inovasi terapi regeneratif untuk mempercepat penyembuhan pada luka.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)*

2.1.1 Definisi

TGF-β ialah protein yang berfungsi dalam mengatur proliferasi, diferensiasi, dan kematian dari bermacam jenis sel. TGF-β dapat memicu pertumbuhan pembuluh darah (*angiogenesis*) meskipun dapat menghambat proliferasi sel endotelial, TGF-β juga termasuk senyawa kemotaktis yang kuat bagi makrofag. TGF-β dapat dihasilkan oleh bermacam jenis sel kekebalan, seperti makrofag, sel *dendritic*, sel B, dan sel T. TGF-β ialah *immunosuppressor* yang utama yang berkaitan dengan peradangan, autoimun dan kanker (Kumar *et al.*, 2018).

TGFβ merupakan famili dari sitokin pluripoten yang terdiri dari tiga isoform yakni TGF-β1, 2, dan 3 dengan peran dominan TGF-β1 dalam penyembuhan luka kulit (Ramirez *et al.*, 2014). TGF-β1 yakni anggota yang utama dan golongan tersebut lebih banyak diketahui peranannya. Diketahui, faktor pertumbuhan ini mempunyai spektrum efek yang luar biasa terhadap pertumbuhan dan perkembangan sel normal. TGF-β mempunyai peran selaku faktor regulasi transformasi beta superfamili, yang terdiri dari *activin*, *inhibins*, tulang *morphogenetic protein*, *anti-mullerian hormon*, dan

decapentaplegik. TGF- β juga dapat merangsang produksi sel molekul adhesi, molekul matriks ekstraselular, dan faktor pertumbuhan lainnya. Ketiga anggota keluarga TGF- β memiliki struktur peptida yang sangat mirip. TGF- β 1 terkandung 390 asam amino, dalam TGF- β 2 terkandung 412 asam amino, dan dalam TGF- β 3 terkandung 412 asam amino. Ketiga anggota keluarga TGF- β mempunyai terminal N-peptida yang meliputi 20 hingga 30 asam amino (Kumar *et al.*, 2018).

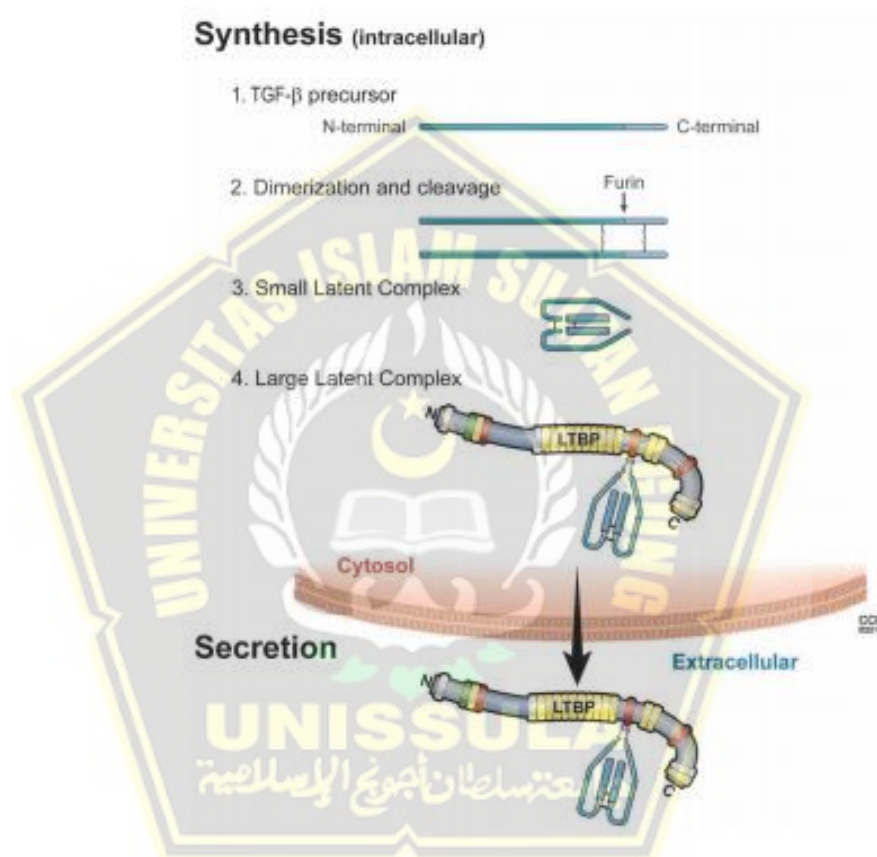
2.1.2 Sintesis TGF- β

TGF- β dan reseptornya terekspresi secara luas di semua jenis sel, regulasi ketat di setiap langkah sintesis, aktivasi, dan pensinyalan hilir harus diperlukan untuk menjaga homeostasis jaringan. TGF- β disintesis dan disekresikan sebagai kompleks laten dan diubah dari bentuk laten menjadi bentuk aktif untuk mengikat reseptor TGF- β berafinitas tinggi. Baru-baru ini, aktivasi TGF- β laten semakin dikenal sebagai langkah penting dalam pengendalian aktivitas TGF- β . Tahapan sintesis TGF- β yakni (Hayashi & Sakai, 2012):

1. TGF- β disintesis sebagai protein prekursor;
2. Dua protein prekursor TGF- β dimerisasi melalui jembatan disulfida;
3. Prekursor TGF- β -dimer dibelah oleh furin untuk menghasilkan kompleks TGF- β laten kecil, di mana peptida terkait latensi dan

peptida TGF- β dewasa dihubungkan dengan ikatan non-kovalen; dan

4. Kompleks laten besar dibentuk oleh hubungan kovalen antara kompleks laten kecil dan protein pengikat TGF- β laten (LTBP), kemudian disekresikan dan dimasukkan ke dalam matriks ekstraseluler.



Gambar 2.1. Tahapan sintesis TGF- β (Hayashi & Sakai, 2012)

2.1.3 Peran TGF- β Secara Umum

TGF- β merupakan sitokin multifungsional dimana memiliki peran secara umum dalam beberapa proses seluler seperti proliferasi, diferensiasi, migrasi, serta apoptosis yang diperlukan dalam menjaga

homeostasis suatu jaringan (Oshimori & Fuchs, 2012). TGF- β dan reseptornya terekspresi dalam seluruh jaringan didalam tubuh dan transduksi sinyalnya mempunyai peranan penting di bermacam penyakit. Kehilangan fungsi dari TGF- β sebabkan kelainan didalam tubuh, berupa inflamasi jaringan tumor dan normal, hiperproliferasi sel, penyakit autoimun. Ekspresi TGF- β yang berlebih pada dasarnya bersifat immunosupresi (Astawa, 2018).

Berikut ini, peran TGF- β pada beberapa kondisi dan penyakit yakni:

1. Fibrosis Hepar

Peradangan yang berkepanjangan adalah ciri umum fibrosis, yang diwakili oleh pelepasan berbagai faktor pertumbuhan dan mediator inflamasi, seperti TGF- β , IL-17, dan IL-13, untuk merangsang fibrosis organ, termasuk Fibrosis pada hepar (Borthwick *et al.*, 2016). Namun, TGF- β adalah mediator paling dominan yang memulai jalur kompleks yang terlibat dalam pembentukan fibrosis pada hepar (Györfi *et al.*, 2018). Ekspresi TGF- β yang berkepanjangan secara konsisten menghasilkan aktivasi dan diferensiasi sel stelata hepar menjadi myofibroblas aktif, ditandai dengan ekspresi α -SMA, dan menghasilkan pembentukan fibrosis hepar (Nakerakanti & Trojanowska, 2012).

2. Penyembuhan Luka

TGF- β berperan pada sejumlah tahapan penyembuhan luka: peradangan, stimulasi angiogenesis, proliferasi fibroblast, sintesis dan deposisi kolagen, serta remodeling ulang matriks ekstraseluler baru (Penn *et al.*, 2012).

2.1.4 Peran TGF- β pada Penyembuhan Luka

Isoform TGF- β menunjukkan sejumlah interaksi dinamis selama proses hemostasis dan inflamasi. Setelah cedera jaringan, pembuluh darah pecah dan mengakibatkan trombosit terpapar (trombosit) ke kolagen sub-endotel menyebabkan agregasi trombosit, degranulasi dan aktivasi kaskade koagulasi. Platelet *et alpha*-granules adalah sumber yang sangat kaya dari TGF- β 1 (lebih dari 40 sampai 100 kali lebih banyak daripada jenis sel lainnya). Butiran-alfa juga mengandung isoform TGF- β lainnya, meskipun rasionya tidak seimbang (4000 TGF- β 1: 1 TGF- β 2: 10 TGF- β 3). Aktivasi yang diinduksi platelet dari kaskade koagulasi menghasilkan pembentukan bekuan fibrin yang mencapai hemostasis serta berfungsi sebagai perancah untuk migrasi sel inflamasi ke dalam jaringan yang terluka (Gilbert *et al.*, 2016).

Setelah hemostasis, TGF- β selanjutnya berperan sebagai mediator kemoatraktan dan inflamasi yang kuat teruntuk bermacam jenis sel imun, meliputi neutrofil dan sel polimorfonuklear (PMN) dan jenis sel lainnya (basofil, eosinofil, sel mast). Sel-sel tersebut

meningkat dalam jaringan dimulai 24 hingga 48 jam sesudah luka dan monosit bersirkulasi 48 hingga 96 jam sesudah terjadinya luka. Menariknya, ligan TGF- β juga dikenal sebagai antagonis kemoatraktan neutrofil lainnya, seperti interleukin-8, dan dapat menekan kemampuan sel imun untuk berpindah ke jaringan yang cedera. Oleh karena itu, TGF- β berperan baik dalam menstimulasi respon imun awal, dengan perekrutan PMN, serta pembatasan tingkat respon inflamasi. Sedangkan trombosit dicirikan sebagai kaya akan TGF- β 1, dalam neutrofil, rasio isoform TGF- β bias terhadap TGF- β 3 (12 TGF- β 1 : 1 TGF- β 2 : 34 TGF- β 3), menunjukkan kemungkinan perbedaan spesifik isoform yang berbeda selama proses penyembuhan luka. Setelah perekrutan sel-sel tersebut, makrofag selanjutnya berperan dalam menginisiasi pembentukan jaringan granulasi dan angiogenesis yang dimediasi oleh TGF- β (Gilbert *et al.*, 2016).

Fase proliferasi mencakup 3 peristiwa utama yang dimediasi TGF- β : re-epitelisasi; angiogenesis; dan sintesis matriks ekstraseluler (ECM). Pada kondisi cedera, sel epitel yang terletak di tepi luka menjadi aktif dan mengalami perubahan fenotipik yang ditandai dengan perubahan sitoskeleton sel dan rusaknya ikatan antar sel. Migrasi dan proliferasi sel epitel didorong oleh berbagai jalur pensinyalan autokrin dan parakrin di mana TGF- β adalah salah satu yang paling banyak dipelajari. Sebelum cedera, TGF- β 1 di epidermis

fungsinya sebagai sitokin homeostatis, memblokir perkembangan siklus sel serta menekan hiperplasia epitel. Sesudah cedera, semua isoform TGF- β meningkatkan epitelisasi ulang dan memodulasi kondisi imunitas yang mengganggu selama penutupan luka. Namun, TGF- β 1 bertindak untuk mendorong migrasi keratinosit secara *in vitro* dan TGF- β 3 tidak (Gilbert *et al.*, 2016).

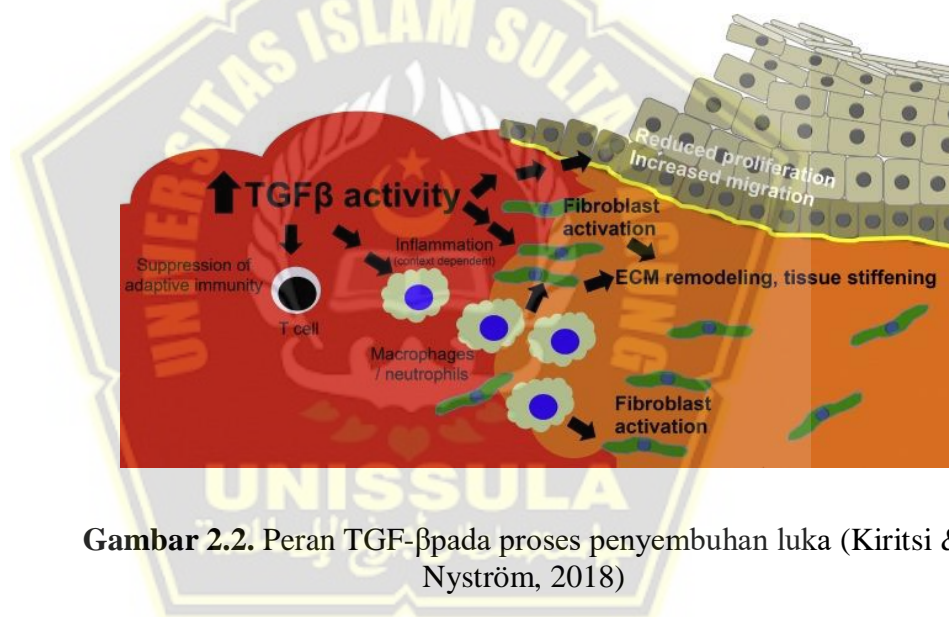
Mekanisme penting yang terlibat dalam re-epitelisasi adalah *epithelial to mesenchymal transition* (EMT). Peristiwa seluler utama selama EMT, termasuk hilangnya hubungan sel-sel dan peningkatan motilitas, didorong oleh sinyal TGF- β . Perubahan tingkat SMAD3 memainkan peran penting dalam peralihan fungsi TGF- β dari sitokin penekan pertumbuhan di epitel utuh menjadi yang menstimulasi EMT di epitel yang terluka. SMAD3 memediasi efek penekan pertumbuhan TGF- β , dan penurunan SMAD3 endogen terjadi secara paralel dengan EMT dan menyebabkan hilangnya respons penghambatan pertumbuhan terhadap TGF- β selama proses ini (Gilbert *et al.*, 2016).

Peristiwa penting lainnya selama fase proliferasi adalah angiogenesis. Angiogenesis melibatkan invasi dasar luka oleh kecambah kapiler untuk membuat jaringan mikrovaskuler *de novo*. Meskipun masih sepenuhnya belum dimengerti, peranan TGF- β selaku modulator angiogenesis telah lama diakui. Kemampuan TGF- β teruntuk melakukan induksi angiogenesis terkait dengan

kapasitasnya guna meningkatkan ekspresi VEGF di lokasi cedera. VEGF memediasi aktivitas angiogenik selama fase proliferasi penyembuhan luka dan TGF- β diketahui merekrut sel efektor hematopoietik penghasil VEGF untuk mendorong angiogenesis *in vivo*. Ketiga isoform TGF- β juga dapat menginduksi *endothelial to mesenchymal transition* yang telah banyak terlibat dalam fibrosis patologis berbagai organ (termasuk kulit, serta fase tumbuh dari angiogenesis (Gilbert *et al.*, 2016).

TGF- β terlibat dalam sintesis ECM dan perekrutan fibroblas dari dermis yang berdekatan serta dari sumber perivaskular (misalnya pericytes) dan sumsum tulang (yaitu, fibrocytes). Setelah sel-sel tersebut memasuki dasar luka, fibroblas berkembang biak dan mulai mensintesis ECM sementara (kebanyakan kolagen dan fibronectin) yang mendahului pembentukan jaringan granulasi yang tepat. Jaringan granulasi adalah organ reparatif yang sangat vaskularisasi sementara yang ditandai dengan matriks kolagen yang longgar, fibronectin dan asam hialuronat yang diselingi dengan fibroblas dan makrofag. Ligan TGF- β memainkan peran mendasar dalam regulasi fibroblast dan produksi jaringan granulasi. TGF- β 1 memediasi produksi kolagen fibroblast (khususnya tipe I dan III), serta dalam penghambatan MMP. Terkait dengan hal ini, pensinyalan yang dimediasi TGF- β 1 telah terlibat dalam penyakit yang ditandai dengan deposisi kolagen yang berlebihan termasuk

keloid dan skleroderma. Sementara TGF- β 1 dan TGF- β 2 meningkatkan deposisi kolagen dan pembentukan bekas luka, TGF- β 3 tampaknya menjadi anti-fibrotik. Oleh karena itu, efek gabungan dari TGF- β 3 dan TGF- β 1 diinterpretasikan sebagai *fine-tuning* produksi kolagen. Saat fase proliferasi penyembuhan luka berlangsung, subset fibroblas akan berdiferensiasi menjadi miofibroblas dan subset lainnya akan mengalami apoptosis, dengan demikian menandai dimulainya tahap akhir penyembuhan luka fase remodeling (Gilbert *et al.*, 2016).

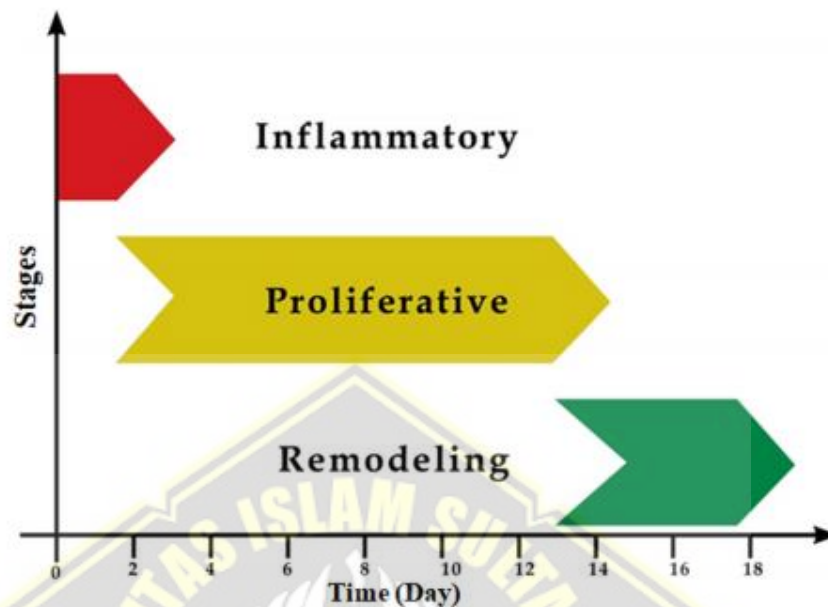


Gambar 2.2. Peran TGF- β pada proses penyembuhan luka (Kiritsi & Nyström, 2018)

2.2 Penyembuhan Luka

Penyembuhan ini ialah mekanisme dinamis yang rumit yang dikaitkan dengan pertumbuhan jaringan dan pembentukan kembali jaringan melalui pengaturan jalur antar sel dan ekstraseluler. Secara ringkas proses penyembuhan luka melibatkan tahapan homeostasis dan inflamasi,

proliferasi dan diakhiri dengan remodeling (Nour *et al.*, 2019). Estimasi waktu dari masing-masing tahapan tersebut bisa ditinjau di gambar 2. 3.



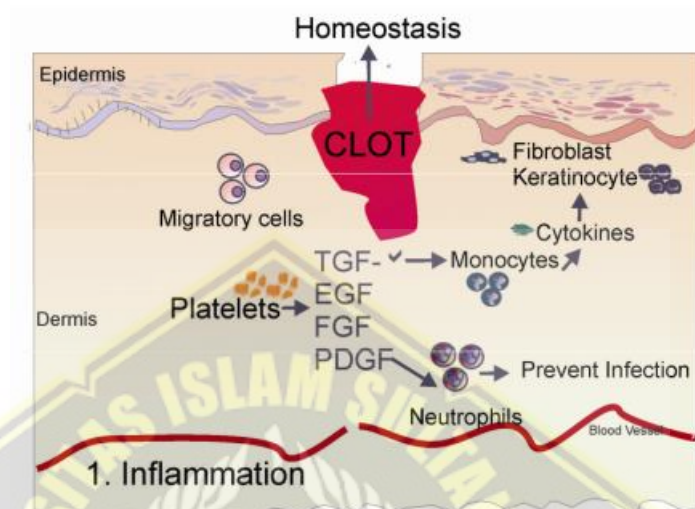
Gambar 2.3. Tahapan penyembuhan luka dan estimasi waktu yang diperlukan dalam setiap tahapan (Nour *et al.*, 2019).

Proses fisiologi penutupan luka meliputi beberapa fase antara lain sebagai berikut (Yolanda *et al.*, 2014):

1. Fase peradangan atau inflamasi

Fase peradangan dimulai dengan dikeluarkannya molekul *Damage Associate Molecule Pattern* (DAMP) oleh sel-sel yang rusak atau mati. DAMP akan memicu makrofag residen untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi seperti PDGF, TGF- β , TNF- α , IL-6, dan IL-8. TNF- α dan IL-6 berperan dalam menarik sel-sel leukosit ke daerah luka untuk membersihkan jaringan mati atau pun infeksi dari bakteri yang masuk ke daerah luka. Sedangkan PDGF dan TGF- β berfungsi dalam

mengaktivasi sel fibroblast menjadi myofibroblast yang akan memproduksi kolagen. Fase inflamasi sangat penting karena berfungsi membersihkan daerah luka dari agen-agen yang dapat menghambat tahapan penyembuhan luka.



Gambar 2.4. Proses penyembuhan luka, fase inflamasi (Yolanda *et al.*, 2014)

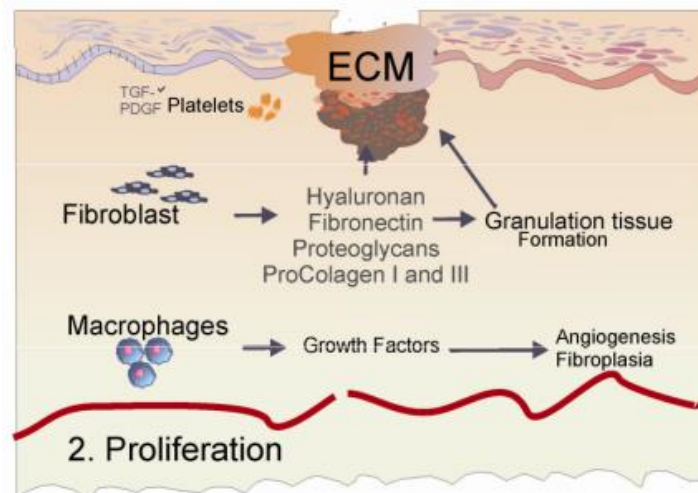
2. Fase Proliferasi

Ketika inflamasi sudah berhenti, hemostasis sudah dicapai dan respon imun telah membersihkan semua molekul yang berbahaya, luka akut akan berpindah mengarah ke perbaikan jaringan. Secara umum fase proliferasi diawali di hari ketiga sesudah cedera yang mana berjalan selama kisaran 14 hari. Perihal ini dibuktikan berdasar migrasi fibroblast serta deposisi ECM yang baru disintesis dan bergerak selaku penggantian jaringan temporer berupa fibrin dan fibronectin. Di tingkat makroskopik, fase penyembuhan luka bisa ditinjau selaku pembentukan yang melimpah pada jaringan granulasi. Pada fase ini sel-sel fibroblast

yang teraktivasi menjadi myofibroblas oleh PDGF dan TGF beta bermigrasi ke area luka. Setelah berada di area luka, myofibroblas akan berproliferasi dan memproduksi protein matriks hyaluronan, proteoglikan, fibronectin serta prokolagen tipe 1 dan 3. Semua produk tersebut disalurkan secara lokal di area lokasi.

Fase proliferasi juga terdapat proses sintesis kolagen oleh fibroblas. Kolagen ialah komponen penting keseluruhan fase penyembuhan luka. Kolagen berfungsi dalam memberi integritas dan kekuatan teruntuk seluruh jaringan dan berperan dalam kunci, khususnya pada fase perbaikan remodelling dan proliferasi. Kolagen berperan untuk dasar pembentukan matriks intraseluler pada luka. Pembentukan dan pemodelan pembuluh darah baru ini terbilang penting sekali ketika penyembuhan luka dan berjalan secara bersama-sama selama seluruh fase tahapan reparatif. Tidak hanya menarik neutrofil dan makrofag saja, namun terdapat faktor-faktor angiogenik yang disekresi selama fase hemostatik yang berfungsi dalam tingkatkan proses angiogenesis.

Migrasi sel epitel diawali dari tepi luka selama beberapa jam sesudah luka. Pada awalnya, di atas defek satu lapisan sel terbentuk, bersama naiknya aktivitas mitosis sel epitel di kisaran tepi luka. Sel yang bermigrasi melekat di matriks provisional. Saat berbagai sel epitel yang bergerak saling bertemu, migrasi terhenti dan membran dasar mulai terbentuk.



Gambar 2.5. Proses penyembuhan luka, fase proliferasi (Yolanda *et al.*, 2014)

3. Fase Remodeling

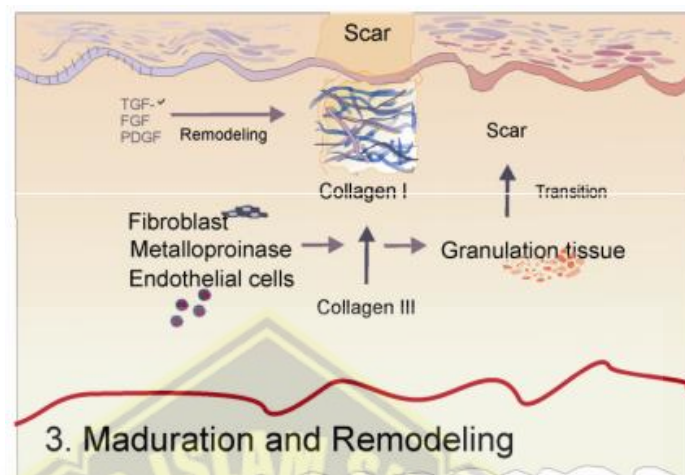
Ialah fase akhir didalam penyembuhan luka yang bertanggung jawab pada pembentukan epitel baru dan jaringan parut akhir. Sintesis ECM pada fase proliferasi dan remodeling diawali dengan kontemporer disertai perkembangan jaringan granulasi. Fase remodeling bisa terjadi 1 hingga 2 tahun, dan bisa memakan waktu lebih lama. Oleh mekanisme pengaturan, renovasi luka akut dikendalikan secara ketat yang bertujuan untuk tetap menjaga keseimbangan degradasi dan sintesis, yang berarah pada penyembuhan normal. Sejalan dengan pematangan matriks intraseluler, diameter gumpalan kolagen bertambah dan asam hialuronic beserta fibronectin terdegradasi. Kekuatan kontraksi luka naik dengan progresif sejalan dengan pengumpulan kolagen. Serat kolagen bisa mendapatkan lagi berkisar 80 persen dari kekuatan asli daripada jaringan yang tak terluka. Perolehan kekuatan

akhir bergantung pada lokalisasi durasi dan perbaikannya, namun perolehan kekuatan asli jaringan ini tak didapatkan kembali.

Sintesis dan penguraian kolagen serta remodeling matriks ekstraseluler berjalan secara menerus. Keduanya condong untuk membuat keseimbangan akan keadaan yang stabil berkisar 3 minggu sesudah cedera. Enzim matriks metalloproteinase dihasilkan oleh makrofag, neutrofil, dan fibroblas di area luka, memiliki tanggung jawab akan degradasi kolagen. Pengaturan aktivitas enzim ini ketat dan disinkronkan oleh aspek penghambat. Dengan bertahap, aktivitas inhibitor jaringan dari metalloproteinase ini naik dimana berakhir pada turunnya aktivitas enzim metalloproteinase, sehingga naiknya akumulasi matriks yang baru.

Walaupun deposisi awal kolagen sangat tak teratur, matriks kolagen baru jadi lebih berorientasi serta saling terkait setelah berberapa lama. Organisasi selanjutnya dicapai selama tahap akhir fase remodeling, sebagian besar oleh kontraksi luka yang telah dimulai pada fase proliferasi. Jaringan ikat yang mendasarinya menyusut dalam ukuran dan membawa margin luka lebih dekat, karena interaksi fibroblast dengan matriks ekstraseluler. Tahapan ini diatur oleh beberapa faktor, dengan PDGF, TGF- β dan FGF menjadi yang terpenting. Saat luka sembuh, kepadatan fibroblas dan makrofag semakin berkurang dengan apoptosis. Berjalannya waktu, terhentinya pertumbuhan kapiler, menurunnya aliran darah ke daerah dan

berkurangnya metabolisme di lokasi luka. Hasilnya bekas luka yang sempurna seluruhnya dengan turunnya total sel dan pembuluh darah serta tingginya kekuatan tarik.



Gambar 2.6. Proses penyembuhan luka, fase pematangan dan remodeling (Yolanda *et al.*, 2014)

2.3 Faktor -Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Menurut Kumar *et al.* (2018), beberapa aspek yang dapat memberi pengaruh pada penyembuhan luka yakni:

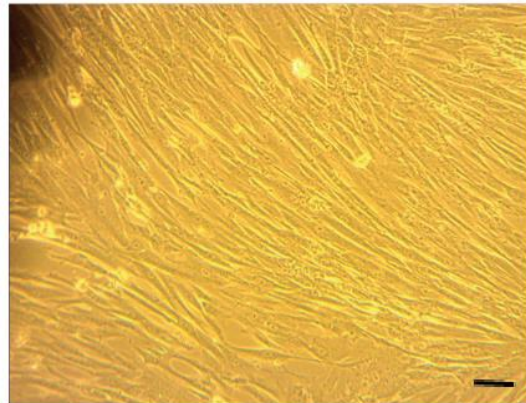
1. Infeksi yakni penyebab paling penting yang bisa memperlambat tahapan penyembuhan luka. Terjadinya infeksi ini akan memperlama inflamasi serta mempunyai potensi untuk menambahnya luka pada luas area.
2. Nutrisi mempunyai peranan penting saat pemulihan. Misal kekurangan vitamin C bisa sebabkan sintesa kolagen dan penghambatan dalam penyembuhan luka.

3. Glukokortikoid (steroid) mempunyai dampak anti inflamasi. Pemberiannya ini bisa mengakibatkan melemahnya jaringan parut dikarenakan inhibisi TGF- β serta berkurangnya fibrosis.
4. Buruknya perfusi karena arteriosklerosis, diabetes atau dikarenakan obstruksi drainase vena yang memperlambat tahapan penyembuhan.
5. Luas serta tipe jejas jaringan bisa memberi pengaruh pada tahapan penyembuhan.
6. Lokasi jejas serta sifat jaringan pada jejas terdapat penentuan tahapan penyembuhan.

2.4 Mesenchymal stem cell (MSC) Hipoksia

2.4.1 Definisi

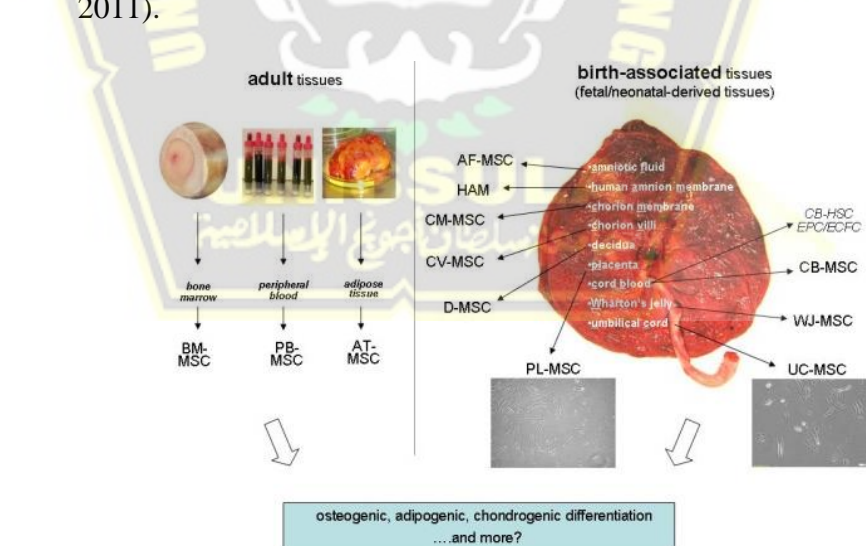
MSC merupakan sel multipotensi yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai sel dewasa seperti osteosit, adipositas, dan neurosit. Beberapa jaringan seperti adipose, folikel rambut, hingga wharton jelly dari tali pusat merupakan sumber MSC. Secara morfologi MSC memiliki bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum pinal dan secara fenotipe, MSC mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44, CD73, CD90, dan CD 105 namun tidak mengekspresikan marker *hematopoietic stem cell* (Halim *et al.*, 2010).



Gambar 2.7. Morfologi MSC (Sunarto *et al.*, 2020)

2.4.2 Sumber

Sumber dari MSC dapat terbagi menjadi dua golongan yaitu dari jaringan dewasa dan jaringan neonatal. Pada jaringan dewasa antara lain: sumsum tulang, darah perifer dan jaringan lemak. Sedangkan pada sumber MSC dari jaringan neonatal antara lain: plasenta, *umbilical cord* dan *umbilical cord blood* (Hass *et al.*, 2011).

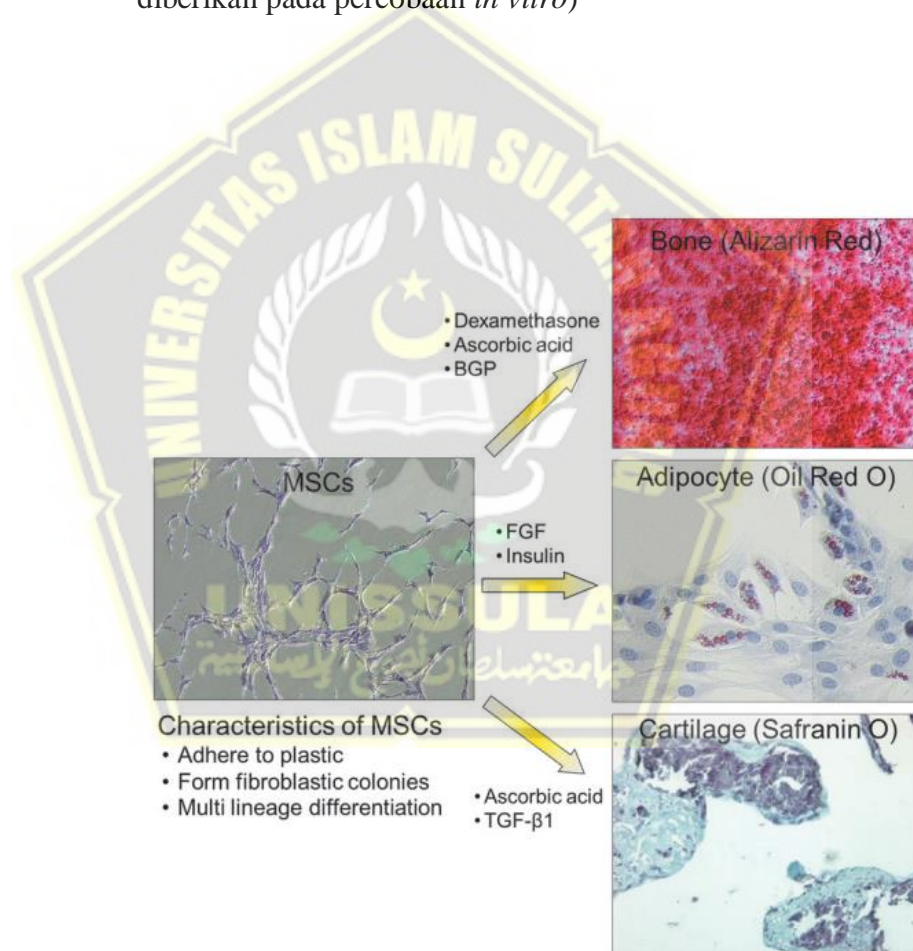


Gambar 2.8. Sumber utama MSC (Hass *et al.*, 2011).

2.4.3 Karakteristik

Karakteristik dari MSC adalah sebagai berikut (King *et al.*, 2014):

1. Sel-sel mampu menempel pada plastik,
2. Dapat membentuk koloni mirip fibroblas,
3. Mampu berdiferensiasi menjadi beberapa garis keturunan (tulang, otot, atau adiposa tergantung pada rangsangan yang diberikan pada percobaan *in vitro*)



Gambar 2.9.Tiga kriteria dari MSC (King *et al.*, 2014)

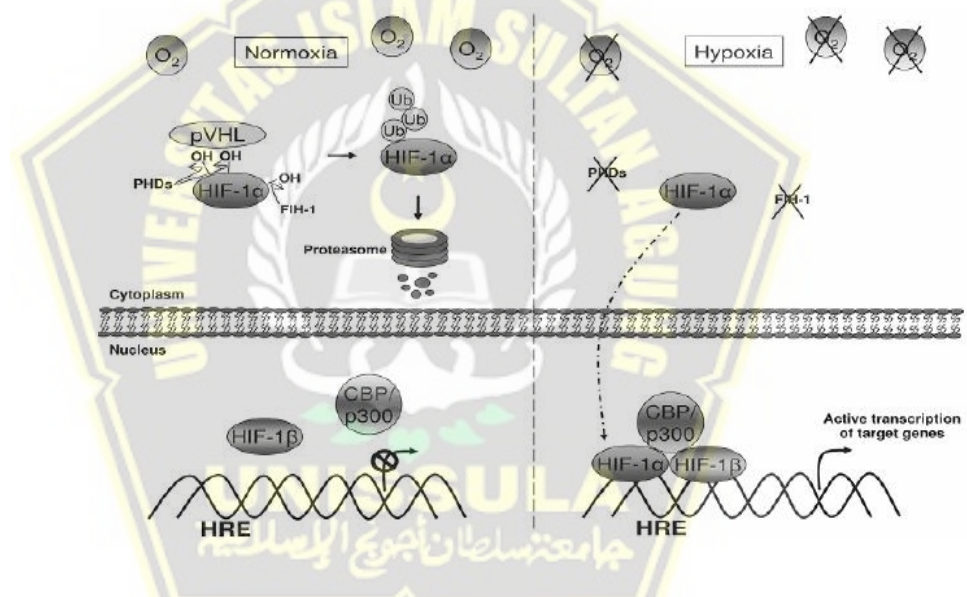
2.4.4 Hipoksia

Hipoksia adalah kondisi adaptasi sel dan jaringan terhadap konsentrasi oksigen yang rendah. Oksigen merupakan syarat untuk kehidupan semua organisme aerobik. Pengambilan oksigen sementara dapat menyebabkan kerusakan protein dan DNA, yang mengakibatkan *stresscell* (Hawkins *et al.*, 2013). Hipoksia merupakan gambaran penurunan dari suplai oksigen karena ketidakseimbangan dari fungsi seluler seperti penurunan aliran darah yang dapat menyebabkan dari suplai nutrisi dan akumulasi metabolisme O_2 , asam laktat, dan amonia (Gilany & Vafakhah, 2010).

2.4.5 Respon Fisiologi Sel Terhadap Hipoksia

Pada kondisi hipoksia metabolisme sel akan melewati proses metabolisme anaerob yang menghasilkan energi yang lebih rendah dari metabolisme aerob. ATP berfungsi sebagai energi sel dan digunakan dalam metabolisme sel. Kadar oksigen yang rendah memiliki efek pada sel yang berbeda pada berbagai jaringan. Hipoksia memiliki efek kuat seperti pada metabolisme, angiogenesis, imunitas non spesifik dan induksi sel untuk sifat *stem cell*. Pada proses *hypoxic* kronis peningkatan intraseluler CA^{2+} yang berikatan dengan Calmodulin, sehingga mengaktifasi dari CaM kinase II mengalami fosforilasi (koaktivator p300) pada aktivitas transkripsi HIF-1 (*Hypoxia-inducible factors-1*) (Gilany & Vafakhah, 2010).

Jalur sinyal respons hipoksia mengaktifkan HIF-1. Proses ini dimulai dari sebuah rangkaian kejadian transkripsional yang menghasilkan peningkatan kadar protein seperti VEGF dan eritropoietin (Hawkins *et al.*, 2013). Sel memiliki *factor inhibiting* HIF-1 (FIH-1) yang terdapat pada asparagine residu di aktivasi transkripsi C-terminal untuk mencegah interaksi antara transkripsi co-aktivator CBP/p300 sehingga menghambat ekspresi dari HIF-1. Pada kondisi hipoksia, FIH-1 menjadi non aktif sehingga aktivasi dari transkripsi HIF-1 berlangsung (Gilany & Vafakhah, 2010).



Gambar 2.10. Regulasi HIF-1 pada normoksia dan hipoksia (Gilany & Vafakhah, 2010)

2.4.6 Respon MSC Terhadap Kondisi Hipoksia

Kultur MSC dalam kondisi hipoksia menunjukkan peningkatan viabilitas sel, peningkatan potensi proliferasi, penurunan produksi ROS, dan peningkatan kadar GSH dan SOD antioksidan. Selain

MSC, mereka menunjukkan peningkatan ekspresi HIF-1 α dan Akt yang lebih tinggi, dimana peningkatan ekspresi ini penting dalam kemampuan bertahan terhadap hipoksia dan stres ROS, yang penting dalam pengaturan transplantasi. MSC yang dipicu hipoksia menunjukkan efek terapeutik yang lebih jelas dibandingkan dengan normoksia MSC (Noronha *et al.*, 2019).

Kultur MSC dalam kondisi hipoksia telah digunakan untuk meniru kondisi lingkungan MSC *in vivo* yang bertujuan untuk meningkatkan efek terapeutik MSC dari berbagai sumber dan atau jaringan. Secara umum, kultur hipoksia dapat mengubah metabolisme sel selama ekspansi, meningkatkan ketahanan terhadap stres oksidatif, dan dengan demikian meningkatkan engraftment, kelangsungan hidup di lingkungan mikro iskemik, dan potensi angiogenik dari MSC yang ditransplantasikan (Noronha *et al.*, 2019).



Gambar 2.11. Lingkungan hipoksia meningkatkan kemampuan MSC (Madrigal *et al.*, 2014)

2.5 Hubungan MSC Hipoksia Terhadap Kadar TGF- β Pada Penyembuhan Luka Fase Inflamasi Dan Proliferasi

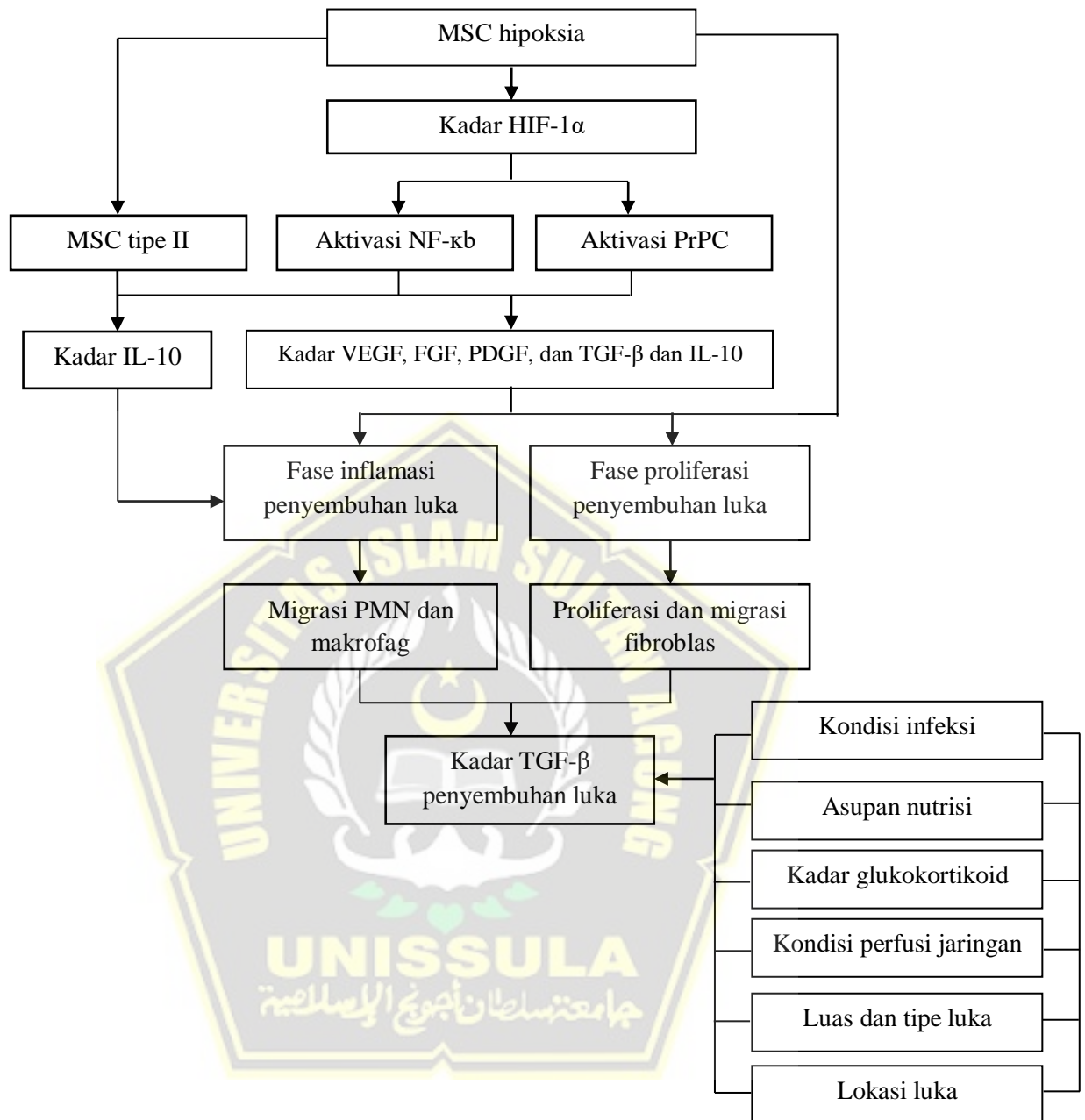
Peran MSC dalam tahapan penyembuhan luka meliputi dua mekanisme, yaitu yang pertama sebagai imunomodulator yang mengendalikan proses inflamasi, proliferasi, dan remodeling dan yang kedua secara langsung berdiferensiasi dan mengganti sel yang rusak (Isakson *et al.*, 2015). Peran MSC sebagai imunomodulator diawali dari perubahan MSC menjadi MSC tipe II yang bersifat antiinflamasi akibat dari sitokin proinflamasi yang dilepaskan oleh sel endogenous makrofag di sekitar area luka. MSC tipe II akan mengsekresikan molekul-molekul antiinflamasi seperti IL-10 untuk menurunkan tingkat inflamasi dan segera berpindah ke fase proliferasi. Selain itu MSC tipe II mengeluarkan TGF- β yang berperan dalam mengkativasi fibroblast dan memproduksi kolagen (Isakson *et al.*, 2015; Putra *et al.*, 2018).

MSC sebagian besar tumbuh di lingkungan *hipoksia* pada kondisi *in vivo*. MSC yang dikultur di dalam lingkungan hipoksia secara *in vitro* juga menunjukkan pertumbuhan dan kemampuan bertahan hidup yang baik (Lv *et al.*, 2017). Ketika sel dikultur pada kondisi lingkungan oksigen yang rendah (hipoksia) O₂ yang tersedia akan berdifusi ke mitokondria selanjutnya menghasilkan lingkungan dalam sitosol yang kekurangan O₂, sehingga penghambat aktivitas prolyl hidrosilase yang mengatur aktivasi *Hypoxia-Inducible Factors* (HIF). HIF yakni heterodimer yang meliputi

subunit α (1α dan 2α) yang berfungsi mengatur oksigen dan subunit β yang diekspresikan secara terus menerus (Mas-Bargues *et al.*, 2019).

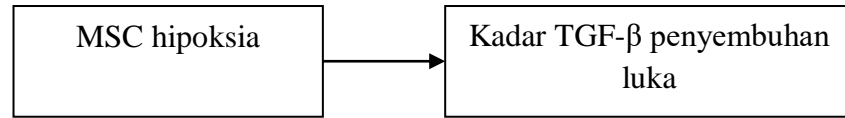
Saat dalam kondisi lingkungan hipoksia, MSC diatur oleh sinyal HIF- 1α . HIF- 1α pada keadaan normoksia akan alami tahapan degradasi oleh HIF *prolyl-4-hydroxylases*. Pada kondisi hipoksia HIF- 1α akan terus dipertahankan (Hawkins *et al.*, 2013). Kultur hipoksia meningkatkan kadar HIF- 1α sehingga dapat menurunkan tingkat ROS di mitokondria MSC. Selanjutnya kondisi ini akan mengaktifkan NF κ B. HIF- 1α juga merangsang sintesis protein PrPC. NF κ B dan PrPC menyebabkan peningkatan ekspresi protein anti-apoptosis, faktor pertumbuhan dan sitokin yang bersifat regenerasi serta enzim antioksidan (Silva *et al.*, 2018). Faktor yang disekresi yakni VEGF, IL-10, TGF- β , PDGF, serta FGF (Madriral *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). Pada jaringan sehat, TGF- β menjaga proliferasi sel dan pertumbuhan sel menjadi terkendali (Heikkinen & Yliopisto, 2015). Pada kondisi terjadinya luka, peningkatan isoform TGF- β (β 1, β 2 dan β 3) mempercepat proses penyembuhan luka dengan cara berperan sentral pada ke-3 fase penyembuhannya yaitu homeostasis dan inflamasi, proliferasi dan fase remodeling (Gilbert *et al.*, 2016).

2.6 Kerangka Teori



Gambar 2.12. Kerangka teori

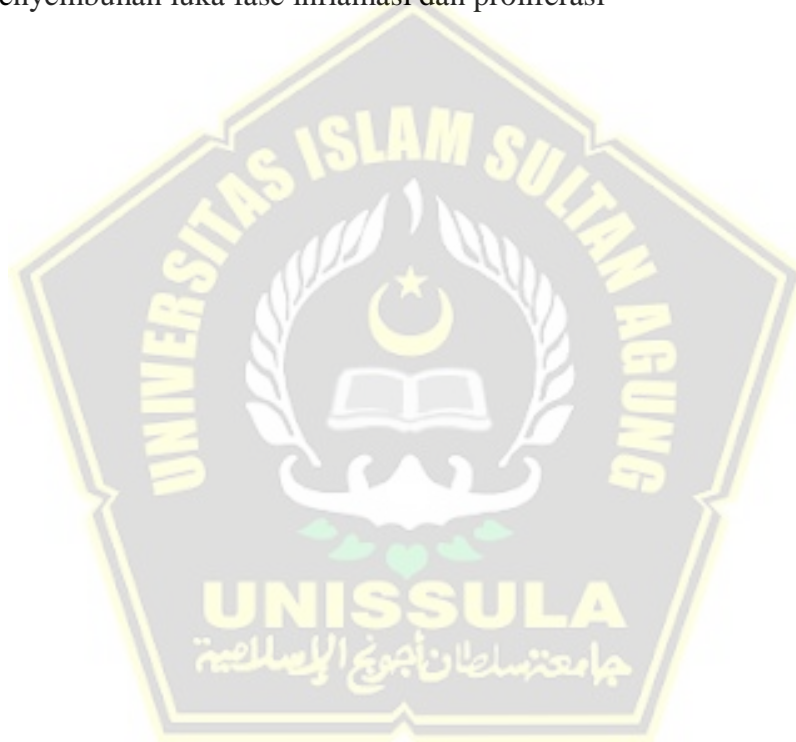
2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.13. Kerangka konsep

2.8 Hipotesis

Terdapat pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Riset ini yakni riset eksperimental yang mempergunakan rancangan “*post test only control group design*” yang mana mempergunakan hewan coba.

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1. Bebas (Independen)

Variabel yang dipergunakan pada riset ini yakni MSC hipoksia.

3.2.2. Terikat (Dependen)

Variabel yang dipergunakan pada riset ini yakni kadar TGF- β pada hari ke 3, 6, dan 9

3.3 Definisi Operasional

3.3.1. MSC Hipoksia

MSC yakni *stem cell* yang bisa rekat di wadah plastik yang mana mempunyai bentuk kumparan berujung runcing. Ekspresi MSC yakni CD73+, CD90+, CD105+ dengan mempergunakan pemeriksaan *flow cytometry*. Pengisolasian MSC dari tikus yang sedang hamil selama 19 hari. Hipoksia yakni keadaan dimana kekurangan oksigen, diakibatkan terjadinya kerusakan MSC karena turunnya respirasi oksidatif aerob seluler. Hipoksia mengalirkan gas

nitrogen didalam *chamber* maka kadar O₂ jadi 1,5 persen hingga 5 persen mempergunakan peralatan *oxygen* meter selama 24 jam yang ditaruh pada *chamber* bersuhu 37°C. Penggunaan dosis MSC hipoksia sebesar 1,5 x10⁶ sel serta MSC non hipoksia sebesar 1,5 x10⁶ sel.

Skala: Rasio

3.3.2. Kadar TGF-β

TGF-β yakni protein yang diciptakan dari isolasi serum tikus luka eksisi pada kelompok perlakuan kelompok sham, kelompok kontrol, kelompok P1 (MSC normoksia 1,5 x10⁶ sel) dan kelompok P2 (MSC hipoksia 1,5 x10⁶ sel) dan dianalisis dengan ELISA. Pengambilan darah lewat vena orbita mempergunakan tabung hematokrit, lalu disentrifuse berkecepatan 3000 rpm selama 10 menit yang berfungsi untuk memperoleh serum. Pengambilan serumnya dilaksanakan dalam fase inflamasi dan proliferasi di hari ke-3, 6 serta 9 sesudah perlakuan. Cara melakukan pengukuran kadar TGF-β ini dengan menggabungkan *antibody monoclonal* TGF-β lalu dilakukan pengukuran ELISA dengan panjang gelombangnya sebesar 450 nm.

Skala: Rasio.

3.4 Subyek dan Sampel Penelitian

3.4.1. Subjek

Penggunaan subjek pada riset ini ialah tikus jantan galur Wistar.

3.4.2. Sampel

Penggunaan sampel riset ini ialah tikus putih jantan galur Wistar yang mempunyai ketentuan seperti di bawah ini:

Kriteria inklusi:

1. Berumur 2 hingga 3 bulan
2. Tidak sedang sakit
3. Mempunyai berat badan 200 hingga 250 gr

Ketentuan eksklusinya:

1. Mempunyai kelainan anatomis
2. Telah dipergunakan pada riset sebelumnya

Ketentuan *drop out*:

1. Mati ketika dilakukan teliti

3.4.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampelnya mempergunakan cara *randomized sampling*. Tikus tersebut dirandomisasi dan diklasifikasikan jadi empat kelompok, yakni kelompok:

1. Sham, tidak diberi tindakan
2. Kontrol, dibuat luka eksisi

3. P1, dibuat luka eksisi dan diberi MSC normoksia berdosis 1,5 x10⁶ sel)
4. P2, dibuat luka eksisi dan diberi MSC hipoksia berdosis 1,5 x10⁶ sel.

3.4.4. Besar Sampel

Minimal sampel dilakukan perhitungan mempergunakan ketentuan WHO sebesar 5 ekor sampel tiap kelompoknya. Riset mempergunakan 20 ekor tikus putih jantan dengan tiap kelompok sampelnya sebanyak 5 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Diperlukan peralatan yang dipergunakan riset yakni:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1. <i>Micropipette with tip (blue, yellow, pink)</i> | 9. <i>Beaker glass</i> |
| 2. <i>Pipette filler</i> | 10. <i>Aluminium foil</i> |
| 3. <i>Conical tube (15 ml, 50 ml)</i> | 11. <i>Dish</i> |
| 4. <i>Inverted microscope</i> | 12. <i>Flask</i> |
| 5. <i>Scissor</i> | 13. <i>Tabung CO₂</i> |
| 6. <i>Pinset</i> | 14. <i>Centrifuge</i> |
| 7. <i>Scalpel</i> | 15. <i>Biosafety Cabinet class 2</i> |
| 8. <i>Bisturi</i> | 16. <i>CO₂ incubator</i> |
| | 17. <i>Hotplate stirrer</i> |

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| 18. <i>Heparin tube</i> | 25. Kertas label |
| 19. <i>Cell counter</i> | 26. <i>Flow cytometry</i> |
| 20. <i>Freezer</i> | 27. <i>Chamber</i> |
| 21. Kapas | 28. <i>Oxygen meter</i> |
| 22. <i>Punch biopsy 6 mm</i> | 29. <i>Sentrifuge (Sarvall MC 12</i> |
| 23. Timbangan digital | V) |
| 24. Stemper | 30. ELISA <i>reader</i> |

3.5.2. Bahan

Diperlukan material yang akan dipergunakan pada riset ini yakni:

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. <i>Umbilical cord</i> | 10. Aquades |
| 2. NaCl 0,9% | 11. <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| 3. FBS | 12. <i>Allophycocyanin</i> |
| 4. PBS | 13. <i>Phycoerythrin (PE)</i> |
| 5. Medium dMEM | 14. Antibodi CD105, CD90, CD73; |
| 6. Fungizon 0,5 persen | 15. Ketamine 90 persen |
| 7. <i>Streptomisin-penicilin 1</i> | 16. <i>Xylasine.</i> |
| persen | 17. TGF- β kit |
| 8. Tikus putih jantan galur Wistar | |
| 9. Pakan standart tikus | |

3.6 Cara Penelitian

3.6.1. Pengajuan Ethical Clearance

Pengajuan riset ini oleh FK UNISSULA Semarang.

3.6.2. Teknik Isolasi *Mesenchymal stem cell* dari *Umbilical cord*

Keseluruhan tahapan dilaksanakan pada *biosafety cabinet class* 2, alat yang dipergunakan ini harus steril dan dilakukan dengan tingginya teknik sterilitas.

1. Pengumpulan *umbilical cord* ini, lalu diletakkan pada wadah yang telah steril dengan terdapat kandungan NaCl 0.9 persen.
 - Bila tak dilakukan proses secara langsung, dilakukan penyimpanan bersuhu 4°C hingga tahapan isolasi (12 hingga 24 jam).
 - Bila diisolasi, dengan segera ketika mengambil *umbilical cord*, tak memerlukan penyimpanan bersuhu 4°C.
2. Mempergunakan pinset, untuk pengambilan *umbilical cord* yang akan ditaruh pada petri dish, dengan PBS melakukan pencucian *umbilical cord* hingga bersih.
3. Pemotongan dengan pisau *umbilical cord* yang telah steril jadi 3 hingga 5 cm.
4. Pembuangan pembuluh darah yang terdapat di *umbilical*.
5. Memotong *umbilical* 3 hingga 5 cm, lalu dipindah ke *petri dish* yang telah dibersihkan.

6. Setiap potongan *umbilical* ini dipotong kecil-kecil memakai gunting bisturi, dihancurkan hingga jadi berukuran 1 mm.
7. Hasil dari potongan *umbilical* yang kecil-kecil itu diambil dengan pinset lalu ditaruh di cawan kultur berjaring 60 mm, yang mana di permukaan cawan susunan titik-titik menyebar dengan rata.
8. Pembersihan medium komplit (α -MEM lalu ditambah fungizon, penstrep, FBS) sebanyak 2-3 ml.
9. Dilakukannya inkubasi pada inkubator bersuhu 37°C dan 5 persen CO₂.
10. Dilakukan pengamatan tiap 24 jam, guna meninjau terdapat keluarnya sel dari tempat penanaman *explan* (berkisar 14 hari akan timbul sel dari *explan*).
11. Penggantian medium setiap 2-3 hari sekali, dilakukannya pembuangan setengah medium dengan cara mempergunakan *micropipette* yang diubah dengan fresh medium komplit sebesar yang terbuang.
12. Sesudah sel timbul dari *explan*, medium komplit ditambah jadi 5 ml.
13. Sesudah 24 hingga 72 jam dari timbulnya sel *explan*, dimana terdapat sel yang mengapung ini diambil dan diletakkan pada cawan petri jaringan baru. Caranya:

- Pengambilan seluruh medium, diletakkan ke *conical tube* 15 ml.
- 10 menit dilakukannya sentrifugasi 2000 rpm.
- Pembuangan *supernatant*.
- Dengan medium komplet dilaksanakan resuspensi pellet.

3.6.3. Kultur Sel

1. Ditanam pada cawan petri jaringan
2. Inkubasi 37°C serta 5 persen CO₂
3. Penggantian 1/2 medium tiap 2 sampai 3 hari sekali hingga sel konfluensnya 80 persen.

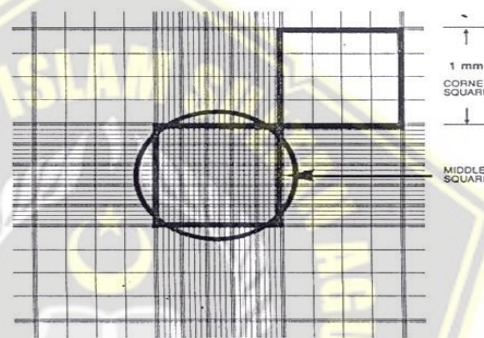
3.6.4. Proses Pemanenan Sel

1. Pemanenan sel ini dilaksanakan dengan mempergunakan panen sel ke-3 lalu dipindah kedalam *coverslip*.
2. Pembersihan wadah medium mempergunakan PBS 1 ml serta tripsin 1 ml teruntuk pemisahan medium dengan sel.
3. Inkubasi 3 menit bersuhu 37°C.
4. Pastikan sel telah terlepas yang ditinjau dengan mikroskop.
5. Bila telah lepas, tripsin diambil lalu PBS mempergunakan *micropipette*.
6. Penggantian dengan medium komplet.

3.6.5. Proses Penghitungan Sel

1. Mempersiapkan 10 µl sel lalu memasukkan kedalam *cryotube*

2. Penambahan 90 μ l Triptofan blue kedalam *cryotube*
3. Memipetkan 10 μ L pada bilik hitung yang telah dilakukan penutupan dengan *deck glass*
4. Meninjau mempergunakan mikroskop inverted di 4 bilik hitung
5. Tata cara perhitungannya:
 - Menghitung sel di 4 bilik hemositometer.
 - Sel yang hidup menjadi \rightarrow bening terang.
 - Sel yang mati menjadi \rightarrow biru gelap.



Gambar 3.1. Bilik Hitung

Pada penjabaran tersebut yang memperlihatkan kotak di *haemocytometer* yang dipergunakan teruntuk perhitungan total sel. Yang dipergunakan yakni 4 kotak paling pojok (atas, bawah, kiri, kanan). Lalu kotak tengah tak dipergunakan. Perhitungan total sel dengan mempergunakan rumusnya:

$$\frac{\sum n1 + \sum n2 + \sum n3 + \sum n4}{4} \times 10^4 \times \text{pengenceran}$$

3.6.6. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan *Flow Cytometry*

1. Melepaskan sel dari *flask* mempergunakan BD™ accutase™ *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau dengan larutan *detachment solution* lainnya. Pencucian sel dan melakukan resuspensi berkonsentrasi 1×10^7 sel/ml pada BD Pharmingen™ Stain Buffer (cat. No. 554656) atau PBS *buffer*. Sel bisa diresuspensi dalam konsentrasi 5×10^6 sel/ml bisa total sel terbatas.
2. Mempersiapkan tabung *falcon* 5 ml dengan label seperti di bawah ini:

Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam *Flow Cytometry*

Tabung	Reagen	Volume (μ l)
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD90	5
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD44	5
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD105	5
4	APC <i>Mouse anti-human</i> CD73	5
5	Kosong	-
	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20
6	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20
	hMSC <i>positive cocktail</i>	20
7	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20 μ l

3. Pengulangan tabung 5 hingga 7 teruntuk tiap tambahan sampel yang dilakukan analisa.
4. Pengambilan 100 μ l sampel pada tiap tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.

6. Di ruang yang gelap melakukan inkubasi setengah jam bersuhu kamar.
7. Mencuci dengan *stain buffer* 2 kali, resuspensi 300 hingga 500 μ l *stain bufer* atau *washing buffer* 1 kali.
8. Membaca di *flow cytometry*, mempergunakan tabung 1 hingga 5 selaku pengendali teruntuk *set up cytometry*.

3.6.7. Prosedur Hipoksia

1. Menyiapkan *chamber*
2. Memasukkan *well* pada *chamber* yang berisikan MSC
3. Meletakkan *oxygen meter* pada *chamber*
4. Memastikan *chamber* menutup dengan rapat
5. Mengalirkan CO₂ lewat selang yang menghubungkan kedalam *chamber*
6. Mengamati *oxygen meter* hingga kadar O₂ 1,5 persen hingga 5 persen
7. Menginkubasi selama 24 jam, lalu lakukan pengamatan kembali pada *oxygen meter* tetap berkadar 1,5 persen hingga 5 persen.

3.6.8. Pembuatan Luka pada Hewan Coba

1. Selama 3 hari tikus diadaptasikan.
2. Sesudahnya, semua tikus dirandomisasi dan dibagi jadi 4 kelompok.
3. Tikus dibuat sedasi, melakukannya dengan diinfeksi dulu mempergunakan usapan alkohol di bagian perut kiri bawah

tikus, lalu suntik sebanyak 0,5 cc ketamine 90 persen + xylasine 10 persen pada Intraperitoneal tikus.

4. Sesudah tikus dalam keadaan tenang atau mengantuk, rambut pada kisaran pembuatan luka ini dilakukan pencukuran, kemudian dibersihkan pada daerah yang akan dilukai dengan kasa serta *povidine iodine*.
5. Tikus dilukai mempergunakan *punch biopsy* 6 mm pada punggung dengan kedalaman hingga dermis.
6. Semua tikus diletakkan kedalam kandang berdasar kelompok, dibiarkan tanpa adanya perlakuan. Selama 24 jam diberi pakan standar.

3.6.9. Perlakuan pada Luka Hewan Coba

1. Melakukan pembagian kelompok:
 - a. Sham, yakni tikus yang luka tidak diberi tindakan.
 - b. Kontrol, yakni tikus yang luka diberi PBS dengan sub kutan
 - c. Perlakuan 1 (P1), yakni tikus yang luka diberi MSC normoksia berdosisi $1,5 \times 10^6$ didalam PBS dengan sub kutan
 - d. Perlakuan 2 (P2), yakni tikus yang luka diberi MSC hipoksia berdosisi $1,5 \times 10^6$ didalam PBS dengan sub kutan
2. Sesudah 1 hari atau 24 jam setelah pembuatan luka pada hewan coba, lalu mempersiapkan tikus berdasar kelompok

3. Mempersiapkan untuk kelompok (kontrol, P1 dan P2) masing-masing dengan 5 spuit. Tiap 1 spuit meliputi 1 cc dosis berdasar kelompok
4. Pembersihan daerah yang akan dilakukan injeksi dengan mempergunakan usapan alkohol
5. Melakukan injeksi di 4 sisi luka (kanan, kiri, atas, bawah) berjarak 0,5 cm dari tepi luka mempergunakan teknik injeksi sub kutan
6. Setelah perlakuan, dihitung (hari kesatu).

3.6.10. Pengambilan Sampel Darah Tikus

1. Pengambilannya lewat vena orbita dengan mempergunakan tabung hematokrit
2. Sentrifuge selama 10 menit berkecepatan 3000 rpm guna memperoleh serum.
3. Dilakukannya pengambilan serum di hari ke-3, 6, 9 sesudah tindakan.

3.6.11. Perhitungan Kadar TGF- β

1. Pencampuran standard serta dilusi standard jadi konsentrasi 300, 150, 75, 37,5, 18,7 , serta 0 pg/ml.
2. Mempersiapkan sumuran kosong, standard, serta sampel.
3. Penambahan 50 μ l cairan conjugasi ke sumuran standard.
4. Penambahan 40 μ l dilusi spesial dan 10 μ l sampel.

5. Penambahan 50 μ l *horse radish peroxidase* di setiap lubang, kemudian menginkubasi 1 jam bersuhu 37° C.
6. Menghilangkan cairan lalu mengeringkan setiap sumuran.
7. Selama 30 menit memberi cairan pencuci, aduk, lalu *mix*. Dilakukan pengulangan 5 kali kemudian dikeringkan.
8. Memberi 50 μ l chromogen solution A & B di setiap sumuran. Mengaduk dengan rata, selama 10 menit menginkubasi 10 menit bersuhu 37 °C.
9. Memberi 50 μ l larutan *stopper* di setiap sumuran
10. Baca mempergunakan ELISA dengan panjang gelombangnya 450 nm

3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1. Tempat

Riset dilaksanakan di laboratorium *Stem Cell&Cancer Research* (SCCR) FK Unissula.

3.7.2. Waktu

Riset dijalankan pada September 2021.

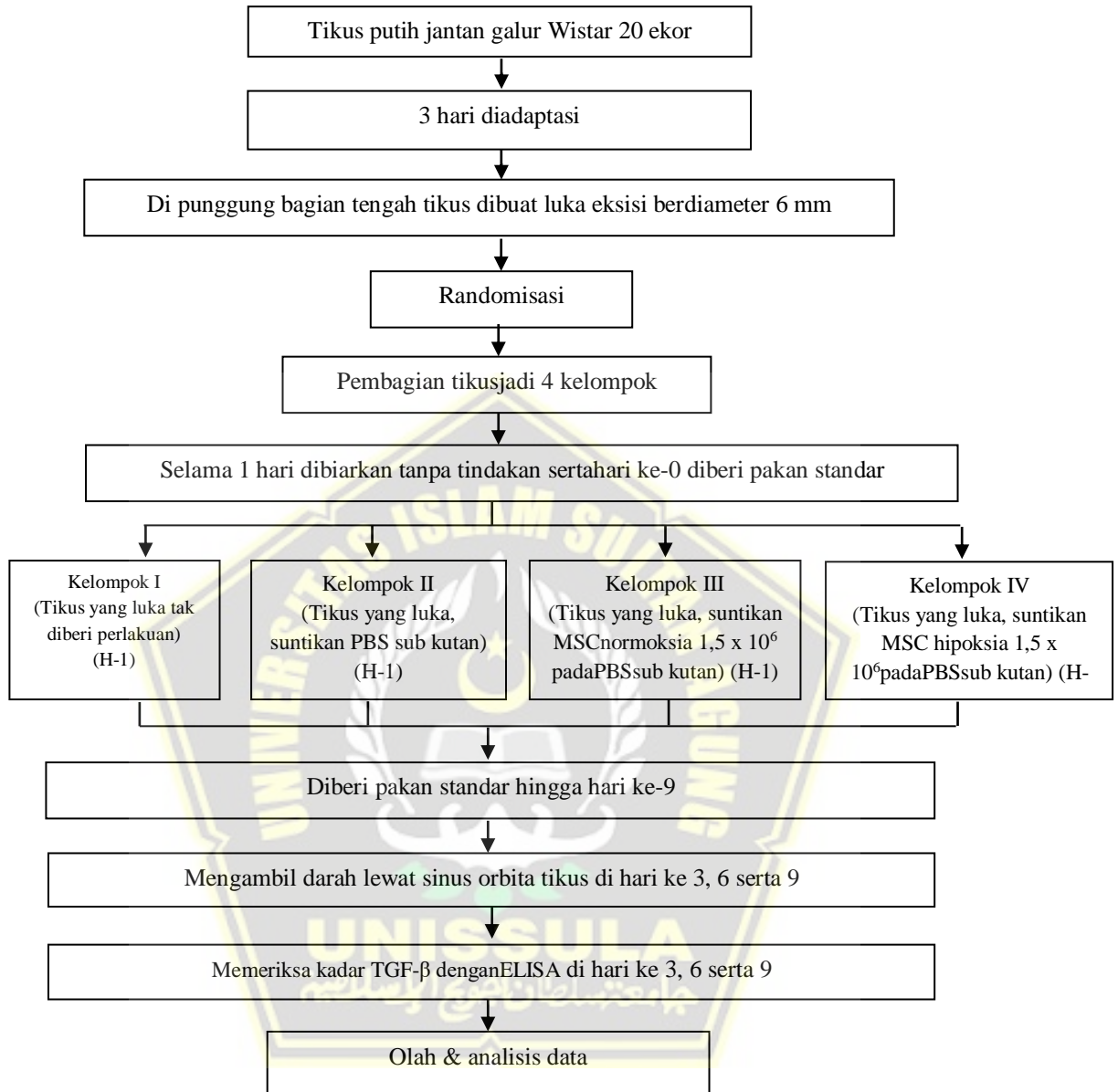
3.8 Analisa Data

Perolehan data pada riset ini lalu akan dilakukan pemrosesan, disunting, ditabulasi, serta dibersihkan. Kemudian dilaksanakan pengujian deskriptif dengan variabel bebas yang mana mempergunakan skala data rasio, serta variabel tergantung dengan mempergunakan skala data rasio.

Sesudah dilaksanakan pengujian tersebut, lalu selanjutnya melakukan pengujian normalitas data menggunakan pengujian *Shapiro Wilk* dan pengujian varian data menggunakan pengujian *Levene*. Diperoleh persebaran data normal (p melebihi 5%) serta varian data sama (p melebihi 5%), sehingga diteruskan dengan uji beda pengujian *One Way Anova*. Pengolah analisa data pada riset ini menggunakan SPSS 22. 0 for *Windows*.



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur penelitian

BAB IV

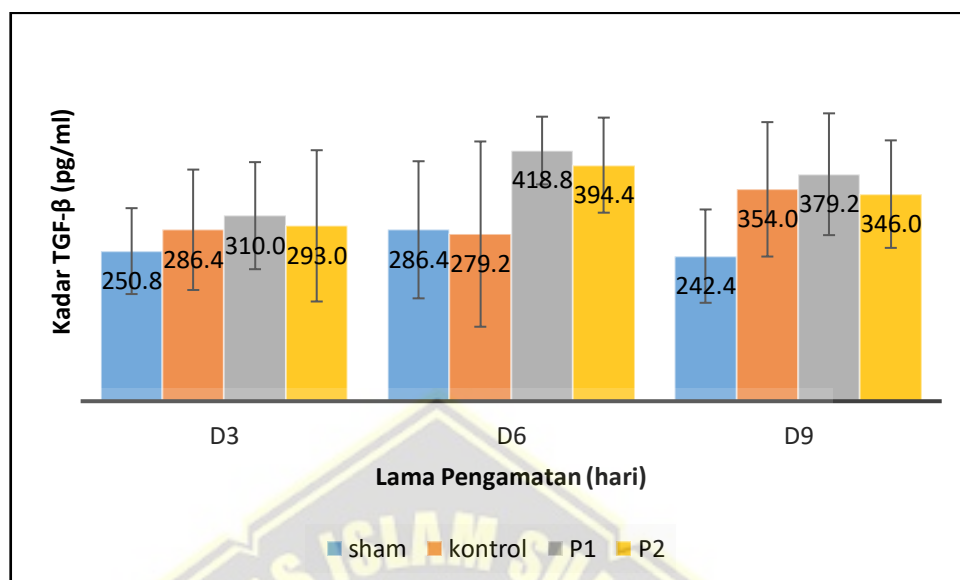
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4. 1. Hasil Penelitian

Riset ini ialah jenis riset eksperimental yang dijalankan di Laboratorium SCCR FK Unissula Semarang pada bulan September 2021, menggunakan tikus Wistar model luka eksisi. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan penurunan kadar TGF- β pada tikus Wistar model luka eksisi yang diinjeksi MSC hipoksia. Desain riset ini ialah *post test only control group* dengan replikasi sebanyak 5 kali dengan 3 kali waktu pengamatan yaitu di hari ke-3, ke-6, serta ke-9. Sistematika hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambaran umum, hasil, dan pembahasan. Hasil kemudian disajikan dalam bentuk data deksriptif untuk nilai variabel penelitian dan diakhiri dengan data analisis untuk hasil akhirnya.

Kadar TGF- β antar kelompok dan lama perlakuan diperlihatkan di

Gambar 4. 1.



Gambar 4. 1. Kadar TGF- β pada kelompok sham: tikus sehat/normal tanpa perlukaan, kontrol: tikus luka eksisi yang diinjeksi PBS subkutan, P1: tikus luka eksisi yang diinjeksi MSC normoksia $1,5 \times 10^6$, P2: tikus luka eksisi yang diberi injeksi MSC hipoksia $1,5 \times 10^6$, yang masing-masing diamati pada hari ke-3 (D3), ke-6 (D6), serta ke-9 (D9)

Pengamatan hari ke-3 perlihatkan bahwa kelompok P1 mempunyai rerata kadar TGF- β tertinggi ($310,0 \pm 89,4$ pg/ml), lalu kelompok sham ialah yang paling rendah yakni $250,8 \pm 71,8$ pg/ml. Pengamatan hari ke-6 juga demikian kelompok P1 memiliki rata-rata kadar TGF- β tertinggi ($418,8 \pm 56,6$ pg/ml), dan kelompok kontrol memiliki rata-rata kadar TGF- β terendah ($279,2 \pm 100,6$ pg/ml). Pengamatan hari ke-9, kelompok P1 tetap di posisi dimana kadar TGF- β tertinggi ($379,2 \pm 101,7$ pg/ml), dan kelompok sham yang terendah ($242,4 \pm 78,0$ pg/ml).

Berikutnya, sebelum menganalisis perbedaan kadar TGF- β antar kelompok dalam berbagai pengamatan, terlebih dahulu dilakukan pengujian prasyarat uji parametrik yaitu normalitas persebaran data dengan pengujian Shapiro Wilk dan homogenitas varian dengan pengujian Levene. Hasil pengujiannya seperti ini:

Tabel 4.1. Hasil *Shapiro Wilk* dan *Levene Test*

Hari Pengamatan	Jenis Perlakuan	<i>p-value</i>	
		<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene Test</i>
Hari ke-3	Sham	0,494	0,801
	Kontrol	0,447	
	P1	0,619	
	P2	0,413	
Hari ke-6	Sham	0,889	0,092
	Kontrol	0,391	
	P1	0,645	
	P2	0,876	
Hari ke-9	Sham	0,293	0,806
	Kontrol	0,966	
	P1	0,830	
	P2	0,083*	

Keterangan: * = setelah ditransformasi ke log₁₀

Hasil pengujian normalitas sebaran data kadar TGF- β antar kelompok dalam berbagai waktu pengamatan menunjukkan semua berdistribusi normal, serta memiliki varian data yang homogen. Hal tersebut ditunjukkan dari perolehan nilai p uji *Shapiro Wilk* dan *Levene test* yang masing-masing adalah melebihi dari taraf signifikansi yang ditentukan yakni 5% ($p < 5\%$), kecuali untuk normalitas persebaran data kadar TGF- β hari ke-9 pada kelompok P2 yang semula tak normal ($p = ,030$) namun sesudah ditransformasi kedalam logaritma angka menjadi normal dengan perolehan

nilai p sebesar 0,083 sehingga dengan demikian syarat pengujian rata-rata kadar TGF- β antar kelompok dalam berbagai pengamatan dapat diuji secara parametrik menggunakan pengujian *one way anova* yang hasilnya ditunjukkan seperti di bawah ini:

Tabel 4.2. Hasil *One Way Anova* Perbedaan Kadar TGF- β antar Kelompok pada Tiap Waktu Pengamatan

Hari pengamatan	p -value	Keterangan
Hari ke-3	0,814	Tidak signifikan
Hari ke-6	0,123	Tidak signifikan
Hari ke-9	0,160	Tidak signifikan

Pada Tabel 4. 2 didapatkan hasil bahwa nilai p masing-masing hari pengamatan kadar TGF- β antar kelompok adalah 0,814; 0,123 dan 0,160 untuk pengamatan hari ke-3, ke-6 serta ke-9. Hasil tersebut perlihatkan bahwa tak ada perbedaan rerata kadar TGF- β diantara kelompok sham, kontrol, P1 dan P2 baik pada pengamatan hari ke-3, ke-6 maupun ke-9, yang juga artinya kadar TGF- β pada keempat kelompok relatif serupa.

4. 2. Pembahasan

Penelitian ini telah dilakukan pada tikus Wistar sehat yang telah diadaptasi terlebih dahulu selama 3 hari yang selanjutnya dilakukan luka eksisi pada kelompok kontrol, P1 dan P2 untuk pengujian manfaat MSC hipoksia dalam proses penyembuhan luka. Luka eksisi dibuat dengan cara tikus disedasi dengan injeksi 0,5 cc ketamine 90% + xylasine 10% pada bagian intraperitoneal. Pasca sedasi, rambut di area punggung yang akan menjadi target perlukaan dicukur selanjutnya dibuat perlukaan menggunakan

punch biopsy 6 mm dengan kedalaman hingga area dermis. Pembuatan luka eksisi ini dimaksudkan agar dapat diketahui perjalanan proses penyembuhan luka, yang diantaranya dapat diamati dari kadar TGF- β karena sebagai salah satu aspek pertumbuhan sentral yang mempunyai peran pada setiap penyembuhan luka (Behm *et al.*, 2011).

Hasil deskriptif penelitian ini menunjukkan bahwa dalam beberapa waktu pengamatan, kadar TGF- β pada kelompok kontrol relatif lebih tinggi daripada di kelompok sham, sehingga dapat diartikan bahwa pembuatan luka eksisi cenderung menyebabkan peningkatan kadar TGF- β . TGF- β cenderung tinggi pada kelompok kontrol karena sejak jam pertama pembuatan perlukaan termasuk dalam fase inflamasi dari proses normal penyembuhan luka (Al-Shaibani *et al.*, 2016). Pada fase inflamasi TGF- β terekspresi tinggi karena banyak disekresi oleh makrofag akibat munculnya molekul-molekul DAMP oleh kerusakan atau kematian sel sebagai dampak dari perlukaan (Yolanda *et al.*, 2014).

Injeksi MSC dalam dosis $1,5 \times 10^6$ baik dalam kondisi normoksia maupun hipoksia menghasilkan kadar TGF- β cenderung lebih banyak daripada kelompok kontrol. Hasil ini dikarenakan MSC memiliki peran imunomodulator yang dapat menstimuli perubahan makrofag tipe I (M1) menjadi makrofagi tipe II (M2) yang diantaranya berperan dalam mensekresi TGF- β (Isakson *et al.*, 2015; Putra *et al.*, 2018).

Injeksi MSC hipoksia, kadar TGF- β yang teramati cenderung lebih sedikit daripada di kelompok injeksi MSC normoksia. Hal tersebut

disebabkan karena dalam kondisi hipoksia MSC diregulasi oleh sinyal HIF-1 α (Hawkins *et al.*, 2013). HIF-1 α menurunkan kadar ROS di mitokondria MSC sehingga meningkatkan aktivasi NF κ B. HIF-1 α juga menstimuli sintesis protein PrPC (Silva *et al.*, 2018). Aktivasi NF κ B dan produksi PrPC meningkatkan faktor pertumbuhan salah satunya TGF- β (Madrigal *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). Peningkatan TGF- β dalam kondisi luka berpotensi menghasilkan percepatan proses penyembuhan ke fase berikutnya yaitu fase proliferasi (Gilbert *et al.*, 2016).

Kadar TGF- β pada kelompok P2 diharapkan lebih tinggi daripada di kelompok P1 karena MSC hipoksia bersifat parakrin, dimana tingginya kadar TGF- β dapat membantu mempercepat proses penyembuhan luka. Namun yang didapatkan adalah kadar TGF- β pada kelompok P2 cenderung lebih rendah daripada di kelompok kontrol dan P1 dalam semua waktu pengamatan. Mengingat penelitian ini dilakukan pada hari ke-3 sampai ke-9 pasca pembuatan luka eksisi yang merupakan fase inflamasi dan proliferasi dimana umumnya kadar TGF- β banyak terekspresi (Kiritsi & Nyström, 2018), maka kadar TGF- β yang lebih rendah pada kelompok P2 dapat menunjukkan bahwa fase inflamasi dan proliferasi telah terlewati. Hal tersebut relevan dengan penelitian Gilbert *et al.*(2016) bahwa peningkatan TGF- β dalam kondisi luka berpotensi menghasilkan percepatan proses penyembuhan ke fase berikutnya. Hasil ini juga didukung dengan penelitian sebelumnya bahwa MSC hipoksia dapat mengendalikan pembentukan adesi peritoneal dengan cara menurunkan kadar TGF- β karena MSC hipoksia

memiliki kemampuan tinggi untuk hidup di lokasi cedera (Trisnadi *et al.*, 2020).

Perbedaan kadar TGF- β yang tidak signifikan antar kelompok dan berbagai waktu pengamatan dapat disebabkan karena dosis perlakuan yang diberikan dalam dosis rendah yaitu $1,5 \times 10^6$ sel. Terkait dengan penggunaan MSC hipoksia dosis rendah maka efek terhadap TGF- β yang didapat belum signifikan. Penelitian yang menggunakan MSC hipoksia pada dosis lebih rendah (5×10^5 sel) juga menunjukkan efek penurunan kadar TGF- β 1 yang signifikan pada hari ke-21 pada tikus model cedera reperfusi iskemik (Ishiuchi *et al.*, 2020). Pada penelitian lain yang meneliti potensi MSC hipoksia pada pengendalian adesi peritoneal didapatkan penurunan TGF- β beta yang signifikan pada hari ke-14 pada tikus model bedah abdomen, sedangkan pada penggunaan MSC hipoksia dosis tinggi (3×10^6 sel) didapatkan penurunan kadar TGF- β yang signifikan pada hari ke-8 (Trisnadi *et al.*, 2020). Pada riset oleh Istiqomah *et al.* yang menggunakan MSC hipoksia dosis tinggi juga didapatkan hasil penurunan kadar TGF- β yang signifikan mulai dari hari ke-3, ke-6 dan ke-9 pada tikus wistar model luka eksisi (Istiqomah *et al.*, 2022). Penurunan kadar TGF- β tersebut menunjukkan bahwa injeksi MSC mempercepat pergantian dari fase inflamasi ke proliferasi. Riset oleh Hamra *et al.* (2021) juga melaporkan bahwa injeksi MSC normoksia dan hipoksia dosis 3×10^6 mempercepat proses penyembuhan luka pada model luka eksisi melalui peningkatan ekspresi α -SMA pada fibroblas dan proses penutupan luka. Penelitian

sebelumnya juga menunjukkan bahwa pemberian MSC hipoksia sebanyak 3×10^6 dapat mempercepat proses penutupan luka yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar PDGF dan densitas kolagen pada hari ke-6 dan 9 setelah perlukaan (Daryanti *et al.*, 2021).

Perbedaan kadar TGF- β antar perlakuan dan waktu pengamatan yang tidak bermakna juga dapat terjadi karena TGF- β terekspresi di tiap-tiap fase proses penyembuhan luka dan termasuk didalam regulasi berbagai tahapan perbaikan jaringan seperti produksi ECM, protease, penghambat protease, migrasi, kemotaksis, proliferasi makrofag, fibroblas granulasi jaringan, sel endotel epitel serta kapiler melalui pensinyalan SMAD (Valluru *et al.*, 2011). Sebab tersebut menjadi salah satu keterbatasan penelitian ini yaitu tidak ada data terkait SMAD yang dapat mengkonfirmasi lama fase inflamasi serta fase proliferasi. Keterbatasan lain yaitu pengamatan kadar TGF- β dilakukan hingga hari ke-9 sehingga kemungkinan efek MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β yang signifikan belum dapat tercapai.

BAB V

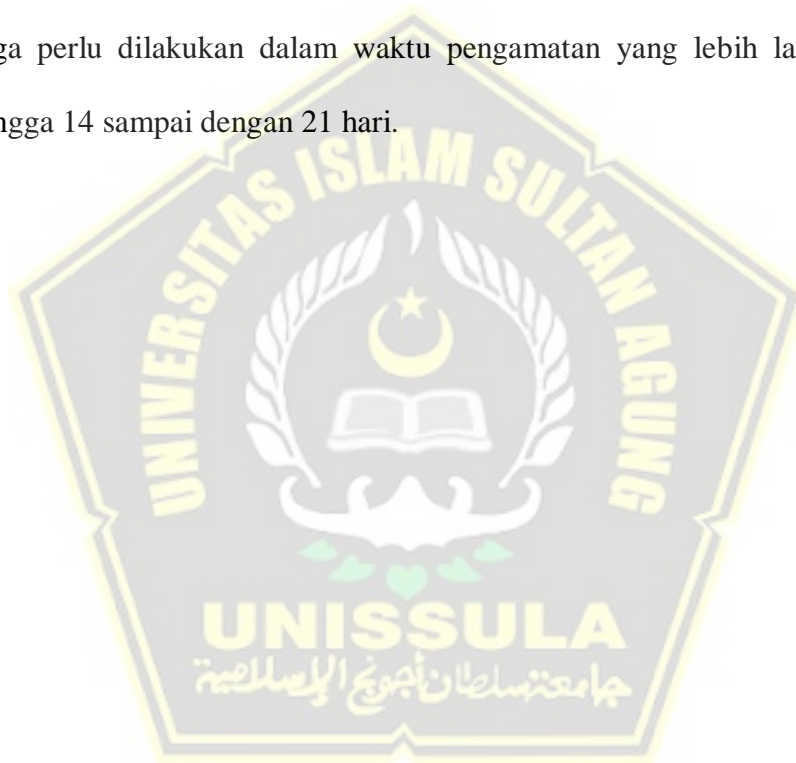
KESIMPULAN DAN SARAN

5. 1. Kesimpulan

5. 1. 1. MSC hipoksia tidak berpengaruh terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.
5. 1. 2. Di kelompok sham, kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi pada pengamatan hari ke-3, ke-6 serta ke-9 yang masing-masing adalah sebesar $250,8 \pm 71,8$; $286,4 \pm 114,5$ dan $242,4 \pm 78$ pg/ml.
5. 1. 3. Di kelompok kontrol (tikus luka eksisi), kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi pada pengamatan hari ke-3, ke-6 serta ke-9 yang masing-masing adalah sebesar $286,4 \pm 100,6$; $279,2 \pm 154,8$ dan $354,0 \pm 112,3$ pg/ml.
5. 1. 4. Kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi di kelompok tikus luka eksisi yang diinjeksi MSC normoksia pada pengamatan hari ke-3, ke-6 serta ke-9 masing-masing adalah sebesar $310,0 \pm 89,4$; $418,8 \pm 56,6$ dan $379,2 \pm 101,7$ pg/ml.
5. 1. 5. Kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi di kelompok tikus luka eksisi yang diinjeksi MSC hipoksia pada pengamatan hari ke-3, ke-6 serta ke-9 masing-masing adalah sebesar $293,0 \pm 126,4$; $394,4 \pm 79,4$ dan $346,0 \pm 89,8$ pg/ml.

5. 2. Saran

Harapannya dalam riset mendatang dapat dilaksanakan pengamatan mengenai pengaruh injeksi MSC hipoksia dalam dosis $1,5 \times 10^6$ terhadap proses-proses yang terkait dengan perbaikan jaringan yang diinisiasi oleh TGF- β melalui pensinyalan SMAD seperti produksi ECM, protease, penghambat protease, tingkat migrasi, tingkat kemotaksis, jumlah makrofag, fibroblas granulasi jaringan, sel endotel epitel serta kapiler. Riset mendatang juga perlu dilakukan dalam waktu pengamatan yang lebih lama misalnya hingga 14 sampai dengan 21 hari.



DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shaibani, M.B.H., Wang, X., Lovat, P.E. & Dickinson, A.M. 2016. Cellular Therapy for Wounds: Applications of Mesenchymal Stem Cells in Wound Healing. *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*.
- Astawa, I.N.M. 2018. *Dasar Dasar Patobiologi Molekuler Apoptosis Dan Onkogenesis*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Aydemir, I., Öztürk, Ş., Kılıçaslan Sönmez, P. & Tuğlu, M.İ. 2016. Mesenchymal stem cells in skin wound healing. *Anatomy*, 10(3): 228–234.
- Balitbang Kemenkes RI 2013. *Riset Kesehatan Dasar Tahun 2013*. Jakarta: Balitbangkes Kemenkes RI.
- Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M. & Schreml, S. 2011. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26(7): 812–20.
- Borthwick, L.A., Barron, L., Hart, K.M., Vanella, K. V & Thompson, R.W. 2016. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13- dependent lung inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol*, 9(1): 38–55.
- Daryanti, E., Putra, A. & Sumarawati, T. 2021. *Pengaruh Mesenchymal Stem Cell (MSC) Hipoksia Terhadap Kadar PDGF dan Densitas Kolagen (Studi In Vivo pada Tikus Galur Wistar dengan Luka Eksisi)*. Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R. & Herman, I.M. 2012. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: Normal and chronic wounds: Biology, causes, and approaches to care. *Advances in Skin and Wound Care*, 25(7): 304–314.
- Gilany, K. & Vafakhah, M. 2010. Hypoxia : a Review. *Journal of Paramedical Sciences*, 1(2): 43–60.
- Gilbert, R.W.D., Vickaryous, M.K. & Vilorio-Petit, A.M. 2016. Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration. *Journal of Developmental Biology*, 4(2).
- Glenn, J.D. & Whartenby, K.A. 2014. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6(5): 526.
- Györfi, A.H., Matei, A.E. & Distler, J.H.W. 2018. Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis. *Matrix Biol.*, 68(69): 8–27.

- Halim, D., Murti, H., Sandra, F., Boediono, A., Djuwantono, T. & Setiawan, B. 2010. *Stem Cell Dasar Teori dan Apikasi Klinis*. Jakarta: Erlangga.
- Hamra, N.F., Putra, A., Tjipta, A., Amalina, N.D. & Nasihun, T. 2021. Hypoxia mesenchymal stem cells accelerate wound closure improvement by controlling α -smooth muscle actin expression in the full-thickness animal model. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 8(A): 35–41.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1): 12. Tersedia di <http://www.biosignaling.com/content/9/1/12>.
- Hawkins, K.E., Sharp, T. V & McKay, T.R. 2013. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen. Med.*, 8(6): 771–782.
- Hayashi, H. & Sakai, T. 2012. Biological significance of local TGF- β activation in liver diseases. *Frontiers in Physiology*, 3 FEB(February): 1–11.
- Heikkinen, P. & Yliopisto, T. 2015. *Modulation of TGF- β Signaling by Hypoxia*. University and Turku Graduate School of Biomedical Sciences. Finland: University and Turku Graduate School of Biomedical Sciences.
- Hu, M.S., Maan, Z.N., Wu, J.C., Rennert, R.C., Hong, W.X., Lai, T.S., Cheung, A.T.M., Walmsley, G.G., Chung, M.T., McArdle, A., Longaker, M.T. & Lorenz, H.P. 2014. Tissue Engineering and Regenerative Repair in Wound Healing. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7): 1494–1507.
- Isakson, M., De Blacam, C., Whelan, D., McArdle, A. & Clover, A.J.P. 2015. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells International*, 2015: 831095.
- Ishiuchi, N., Nakashima, A., Doi, S., Yoshida, K., Maeda, S., Kanai, R., Yamada, Y., Ike, T., Doi, T., Kato, Y. & Masaki, T. 2020. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1): 1–15.
- Istiqomah, D.A.F., Putra, A. & Djannah, D. 2022. *Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkimal Hipoksia terhadap Kadar TGF- β pada Tikus Wistar Model Luka Eksisi*. Unissula.
- King, A., Balaji, S., Keswani, S.G. & Crombleholme, T.M. 2014. The Role of Stem Cells in Wound Angiogenesis. *Advances in Wound Care*, 3(10): 614–625.
- Kiritsi, D. & Nyström, A. 2018. The role of TGF in wound healing pathologies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 172: 51–58.

- Kumar, V., Abbas, A.K. & Aster, J.C. 2018. *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia: Elsevier.
- Lotfinia, M., Lak, S., Ghahhari, N.M., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Tabrizi, B.S. & Kadivar, M. 2017. Hypoxia pre-conditioned embryonic mesenchymal stem cell secretome reduces IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells. *Iranian Biomedical Journal*, 21(1): 24–31.
- Madrigal, M., Rao, K.S. & Riordan, N.H. 2014. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*, 12(1): 1–14.
- Mas-Bargues, C., Sanz-Ros, J., Román-Domínguez, A., Inglés, M., Gimeno-Mallench, L., El Alami, M., Viña-Almunia, J., Gambini, J., Viña, J. & Borrás, C. 2019. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5).
- Murphy, P.S. & Evans, G.R.D. 2012. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plastic Surgery International*, 2012: 1–8.
- Nakerakanti, S. & Trojanowska, M. 2012. The Role of TGF- Receptors in Fibrosis. *Open Rheumatol J*, 6(1): 156–162.
- Noronha, N.D.C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J.G., Rocha, J.L.M., Covas, D.T., Swiech, K. & Malmegrim, K.C.R. 2019. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies (Stem Cell Research and Therapy (2019) 10 (131) DOI: 10.1186/s13287-019-1224-y). *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1): 1–21.
- Nour, S., Baheiraei, N., Imani, R., Khodaei, M., Alizadeh, A., Rabiee, N. & Moazzeni, S. 2019. A review of accelerated wound healing approaches: Biomaterial assisted tissue remodeling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30: 120.
- Ocansey, D.K.W., Pei, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., Xu, W. & Mao, F. 2020. Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: An update. *Journal of Translational Medicine*, 18(1): 1–14. Tersedia di <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02234-x>.
- Oshimori, N. & Fuchs, E. 2012. The Harmonies Played by TGF- β in Stem Cell Biology. *Cell Stem Cell*, 11(6): 751–764.
- Penn, J.W., Grobbelaar, A.O. & Rolfe, K.J. 2012. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *International journal of burns and trauma*, 2(1): 18–28. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928164> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3415964>.

- Putra, A., Antari, A.D., Kustiyah, A.R., Intan, Y.S.N., Sadyah, N.A.C., Wirawan, N., Astarina, S., Zubir, N. & Munir, D. 2018. Mesenchymal stem cells accelerate liver regeneration in acute liver failure animal model. *Biomedical Research and Therapy*, 5(11): 2802–2810.
- Ramirez, H., Patel, S.B. & Pastar, I. 2014. The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. *Advances in Wound Care*, 3(7): 482–491.
- Raoufi, M.F., Tajik, P., Dehghan, M.M., Eini, F. & Barin, A. 2011. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reprod Domest Anim*, 46: 95–9.
- Silva, L.H.A., Antunes, M.A., Dos Santos, C.C., Weiss, D.J., Cruz, F.F. & Rocco, P.R.M. 2018. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(45).
- Sunarto, H., Trisnadi, S., Putra, A., Sa'dyah, N.A.C., Tjipta, A. & Chodidjah, C. 2020. The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 11(3): 134.
- Trisnadi, S., Muhar, A.M., Putra, A. & Kustiyah, A.R. 2020. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β inhibition. *Universa Medicina*, 39(2): 97.
- Valluru, M., Staton, C.A., Reed, M.W.R. & Brown, N.J. 2011. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Frontiers in Physiology*, 2(November): 1–12.
- Yolanda, M.-M., Alvarez-Viejo, M., Ferrero-Gutierrez, A. & Perez-Basterrechea, M. 2014. Adult Stem Cell Therapy in Chronic Wound Healing. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 04(01).
- Yustianingsih, V., Sumarawati, T. & Putra, A. 2019. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina*, 38(3): 164–171.