

PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELL
HYPOXIC TERHADAP EKSPRESI IL 10 PADA TIKUS LUKA EKSISI
Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar*

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun oleh

Olifiarsy Wiet Ramadhanti

30101700139

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG

2021

SKRIPSI

**PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELL HYPOXIC
TERHADAP EKSPRESI IL 10 PADA TIKUS LUKA EKSISI
Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar***

Dipersiapkan dan Disusun Oleh:

Olifiarsy Wiet Ramadhanti

30101700139

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Pada tanggal, 18 Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Anggota Tim Penguji



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

dr. Azizah Retno Kustiyah Sp.A

Pembimbing II



dr. Hj. Nur Anna Chalimah Sadyah, Sp.PD-KEMD.,
FINASM

dr. Menik Sahariyani M.Sc.



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi S.H.,Sp.KF,

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Olifiarsy Wiet Ramadhanti

NIM : 30101700139

Dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul :

“PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELL

HYPOXIC TERHADAP EKSPRESI IL 10 PADA TIKUS LUKA EKSISI”

Studi Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar*

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai aturan yang berlaku.

Semarang, 22 Februari 2022



Olifiarsy Wiet Ramadhanti

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah *rabbi' alamin*, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT berkat segala rahmat dan karunia-Nya penulis telah diberi kesehatan, ketabahan, kesehatan, kesabaran, dan kekuatan sehingga dapat menyelesaikan dengan baik skripsi yang berjudul, **“PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELLHYPOXIC TERHADAP EKSPRESI IL 10 PADA TIKUS LUKA EKSISI” Studi Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar*”** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan studi serta untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang .

Penulis ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak yang telah memberi bantuan, bimbingan, dorongan, dan petunjuk sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan baik. Ucapan terimakasih penulis diberikan kepada :

1. Ibunda saya tercinta Dr. Hj Animah M.Pd, yang telah memberikan dukungan sehingga Skripsi ini selesai.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si, Med dan dr. Hj. Nur Anna Chalimah Sadyah, Sp.PD-KEMD., FINASM, selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar membimbing dan meluangkan waktu untuk

memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.

4. dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A, dan dr. Menik Sahariyani, M.Sc., selaku dosen penguji yang telah dengan sabar membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Staf Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah membantu dalam berjalannya penelitian ini.
6. Sahabat-sahabat tersayang yang selalu setia menemani dan ikhlas membantu dalam tiap kesulitan.
7. Semua pihak yang telah ikut membantu terselesainya Skripsi ini.

Semoga Allah SWT, membalas semua kebaikan serta bantuan yang telah diberikan. Penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Semarang, 2 Februari 2022

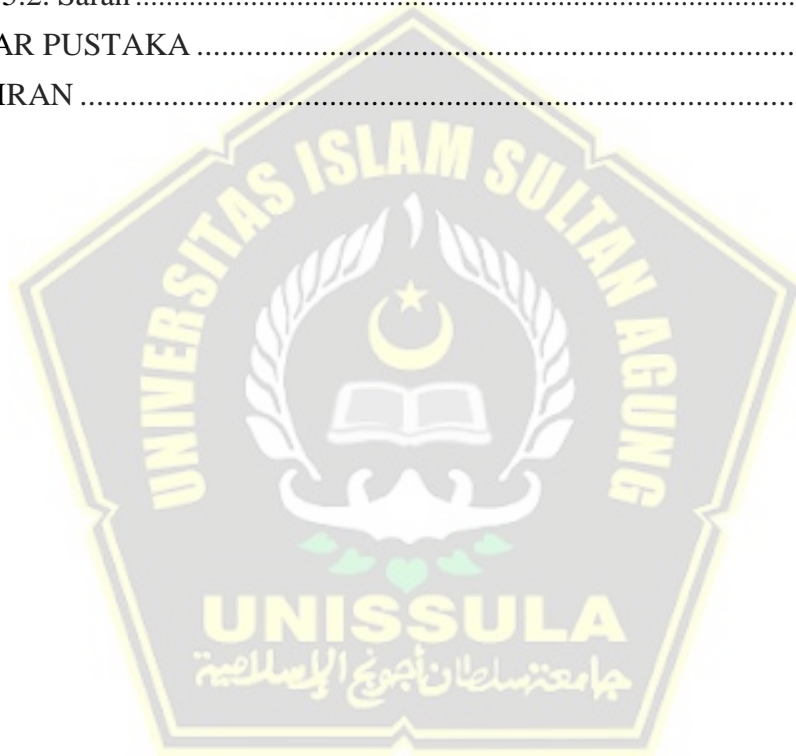
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
SURAT PERNYATAAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR SINGKATAN	xii
INTISARI	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Metodologi	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Luka	6
2.1.1. Definisi Luka	6
2.1.2. Jenis-jenis Luka	7
2.1.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi	8
2.2. Interleukin 10	9
2.2.1. Definisi IL-10	9
2.2.2. Fungsi Sel IL-10	9
2.3. <i>Stem Cell</i>	10
2.3.1. Definisi	10
2.3.2. Karakteristik	11
2.3.3. Klasifikasi	11
2.4. <i>Mesenchymal Stem Cell (MSC)</i>	13

2.5. Mesenchymal Stem Cell (MSC) Hipoksik	14
2.5.1. Definisi Hipotesis	14
2.5.2. Patogenesis Hipoksia	14
2.6. Efek Kultur Stem Cell Hipoksik	16
2.7. Perkembangan Kultur Mesenchymal Stem Cell hypoxic pada penelitian terdahulu	18
2.8. Pengaruh Mesenchymal Stem Cell terhadap ekspresi IL 10 pada Tikus Luka Eksisi.....	20
2.9. Kerangka Teori	21
2.10. Kerangka Konsep.....	22
2.11. Hipotesis	22
BAB III METODE PENELITIAN	23
3.1. Jenis Penelitian.....	23
3.2. Variabel dan Definisi Operasional.....	23
3.2.1. Variabel.....	23
3.2.2. Definisi Operasional.....	23
3.3. Populasi dan Sampel.....	24
3.3.1. Populasi.....	25
3.3.2. Sampel.....	25
3.3.3. Cara Pengambilan Sampel	25
3.3.4. Besar Sampel	26
3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian	26
3.4.1. Instrumen	26
3.4.2. Bahan Penelitian.....	27
3.5. Cara Penelitian	28
3.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	28
3.5.2. Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	28
3.5.3. Proses Pemanenan Sel.....	31
3.5.4. Proses Penghitungan Sel.....	32
3.5.5. Perbacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan alat <i>Flow</i> <i>Cytometry</i>	32
3.5.6. Prosedur Hipoksia	34
3.5.7. Pembuatan Hewan Coba Model Luka Kesisi.....	34
3.5.8. Perlakuan pada Luka Hewan Coba	35
3.5.9. Pengambilan Sampel Serum	35

3.5.10. Pengambilan Sampel Jaringan.....	35
3.5.11. Perhitungan Ekspresi IL 10	36
3.6. Tempat dan Waktu Penelitian	43
3.7. Analisis Data	43
3.8. Alur Penelitian	45
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	46
4.1. Hasil Penelitian	46
4.2. Pembahasan.....	51
BAB V KESIMPULAN	54
5.1. Kesimpulan.....	54
5.2. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	58



DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Reagen yang digunakan dalam flow cytometry	33
Tabel 3. 2 Konversi total RNA menjadi cDNA	37
Tabel 3. 3 Konversi total RNA menjadi cDNA	39
Tabel 3. 4 Hitung volume yang diperlukan dari masing masing komponen	40
Tabel 3. 5 Prosedur RT-qPCR.....	42
Tabel 4. 1 Hasil Analisis RT-qPCR pada hari ke-3, 6, dan 9.....	48
Tabel 4. 2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Ekspresi IL10	50
Tabel 4. 3 Hasil uji perbedaan ekspresi IL10 dengan uji Post Hoc LSD.....	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Kerangka Teori.....	Error! Bookmark not defined.
Gambar 2. 2 Kerangka Konsep	22
Gambar 3. 1 Alur Penelitian.....	45
Gambar 4. 1 Kemampuan diferensiasi sel kultur	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Deskriptif Data Ekspresi IL10	58
Lampiran 2. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Ekspresi IL10	62
Lampiran 3. Hasil Uji Perbedaan dengan <i>One Way Annova</i>	64
Lampiran 4. Hasil Uji Perbedaan Antar Kelompok dengan Post Hoc LSD.....	64
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.....	66
Lampiran 6. <i>Ethical Clearance</i>	67
Lampiran 7. Surat Keterangan Penelitian.....	68



DAFTAR SINGKATAN

AP-1	:	<i>Activator Protein 1</i>
BM-MSC	:	<i>Bone marrow - Mesenchymal Stem cell</i>
CD	:	<i>Cluster of Differentiation</i>
ESCs	:	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FIH-1	:	<i>Factor Inhibiting HIF 1</i>
GF	:	<i>Growth Factor</i>
HSCs	:	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
HIF	:	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
hMSC	:	<i>Human Mesenchymal Stem Cell</i>
IL 10	:	<i>Interleukin 10</i>
IPSCs	:	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
ICM	:	<i>Inner Cell Mass</i>
MAPK	:	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MSC-BM	:	<i>Mesenchymal stem cells-Bone Marrow</i>
MHC	:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MSC	:	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NF- κ B	:	<i>Nuclear Factor Kappa</i>
PHD	:	<i>Prolyl Hydroksilase</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
STAT 3	:	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TNF	:	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

UC-MSC	:	<i>Umbilical Cord - Mesenchymal Stem cell</i>
RT-qPCR	:	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SCCR	:	<i>Stem cell and Cancer Research</i>
PBS	:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
MSChypo	:	<i>Mesencymal Stem Cell Hypoxic</i>
MSCnor	:	<i>Mesencymal Stem Cell Normoxic</i>



INTISARI

Proses penyembuhan luka merupakan rangkaian respons seluler yang terintegrasi. Proses ini terdiri dari beberapa fase yang sangat tumpang tindih serta koordinasi sitokin-sitokin antiinflamasi, terutama interleukin 10 (IL-10). Di sisi lain, Mesenchymal Stem Cell Hypoxic (MSC_{hypo}) diketahui dapat meningkatkan sekresi IL-10 dan berkontribusi pada percepatan penyembuhan luka dibandingkan dengan Mesenchymal Stem Cell Hypoxic dalam kondisi normoxic (MSC_{nor}).

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kemampuan MSC yang dikondisikan hypoxic dan normoxic dalam ekspresi serial IL-10 yang terkait dengan peningkatan penyembuhan luka pada model hewan luka eksisi.

Metode penelitian dengan enam puluh tikus Wistar jantan dengan luka eksisi dibuat sebagai model hewan dengan metode biopsi 6 mm. Hewan secara acak dibagi menjadi empat kelompok yang terdiri dari empat kelompok perlakuan: Hypoxic, Normoxic, Kontrol (perlakuan NaCl) dan Sham (tikus sehat yang tidak diobati). Injeksi dilakukan 2 kali secara intra peritoneal pada hari ke 0. Jaringan kulit dikoleksi pada hari ke 3, 6 dan 9 pasca injeksi. Ekspresi IL-10 diperiksa dengan qPCR.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan IL-10 yang signifikan pada hari ke 6 dan 9 setelah perlakuan Hypoxic dan menurun pada hari dibandingkan dengan perlakuan

Terdapat adanya hubungan antara MSC hypoxic terhadap peningkatan ekspresi IL 10. Hal ini dibuktikan pada kelompok perlakuan ditemukan adanya peningkatan ekspresi IL 10 yang signifikan

Kata Kunci : Mesenchymal Stem Cell Hypoxic (MSC_{hypo}), Penyembuhan luka eksisi, Ekspresi IL 10

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perbaikan luka kulit adalah rangkaian respons seluler yang sangat terkoordinasi terhadap cedera yang berfungsi memulihkan integritas epidermis (Tottoli *et al.*, 2020). Dalam kondisi yang tidak optimal dan dipengaruhi beberapa faktor, perbaikan luka pada kulit dapat menyebabkan proses penyembuhan tertunda serta terbentuknya jaringan parut (Grubbs H, Manna B. 2020). Terapi menggunakan *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dinilai efektif dalam meningkatkan penyembuhan luka kulit karena memiliki potensi diferensiasi dan imunoregulasi serta tidak adanya potensi penolakan pasca penyuntikan (Jeschke *et al.*, 2019). Sel punca mesenkimal mampu mensekresi serta menginduksi produksi Interleukin 10 (IL 10) yang merupakan faktor anti-inflamasi sehingga dapat mengendalikan inflamasi. Terkendalinya inflamasi berkorelasi dalam percepatan proses penyembuhan luka (Xiao *et al.*, 2019).

Namun, di sisi lain MSC yang umum dikultur pada kondisi normoksia dilaporkan memiliki tingkat pelekatan yang lemah serta tidak mampu bertahan hidup pada area luka yang bersifat hipoksia. Penelitian yang dilakukan oleh (Haque *et al.*, 2013) mengungkapkan bahwa MSC yang dikultur pada kondisi hipoksia memiliki kemampuan hidup, pelekatan serta sekresi sitokin anti inflamasi yang lebih tinggi. Namun demikian, pengaruh

MSC yang dikultur pada kondisi hipoksia terhadap luka eksisi yang dikaji dari ekspresi IL 10 belum pernah dikaji sebelumnya

Proses penyembuhan luka terdiri dari empat fase yang sangat terintegrasi dan tumpang tindih yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling atau resolusi jaringan (Wallace *et al.*, 2020) Fase ini dan fungsi biofisiologisnya harus terjadi dalam urutan yang tepat, pada waktu tertentu, dan berlanjut selama durasi tertentu pada intensitas optimal (Tottoli *et al.*, 2020). Luka dengan gangguan penyembuhan, termasuk luka akut yang tertunda dan luka kronis, umumnya telah gagal untuk melewati tahap penyembuhan yang normal. Gangguan pada penyembuhan luka dapat disebabkan oleh adanya peradangan yang berkepanjangan sehingga fase proliferasi tidak berjalan sehingga luka menjadi kronis (Grubbs H, Manna B. 2020). Luka kronis yang tidak dapat disembuhkan dapat mengakibatkan pengeluaran perawatan kesehatan yang sangat besar.

Fase pertama penyembuhan luka adalah fase peradangan, yang dimulai pada saat terjadinya luka. Peradangan mengontrol invasi mikroba dan membersihkan lokasi luka dari sisa sel yang rusak, namun, peradangan yang berkepanjangan dapat menyebabkan pembentukan jaringan parut Selain itu di sisi lain, respons inflamasi yang tidak memadai dapat menyebabkan luka kronis yang tidak sembuh. Penelitian (Hamm, 2019) melaporkan bahwa MSC juga menekan aktivitas proinflamasi sel myeloid termasuk monosit, makrofag, dan granulosit. Selain itu MSC mempengaruhi sel dendritik untuk mengeluarkan lebih sedikit TNF α dan lebih banyak IL-10.

Sel punca dan sel stroma di dalam sumsum tulang hidup dalam kondisi *hypoxic*. Tekanan oksigen yang rendah berpengaruh pada sel yang berbeda di banyak jaringan (Xu *et al.*, 2019). *Hypoxic* memiliki efek yang kuat pada beberapa aspek biologi sel seperti metabolisme, angiogenesis, imunitas bawaan dan induksi stemness. Efek *hypoxic* biasanya dimediasi oleh *Hypoxia-inducible factors* (HIFs), yaitu HIF-1a dan HIF-2a. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa kondisi *hypoxic* dapat meningkatkan kemampuan homing dan pelekatan MSC (Sylakowski *et al.*, 2020). Selain itu, MSC dilaporkan meningkatkan ekspresi IL 10 dalam mencegah fibrogenesis pada usus pasca operasi. Penelitian lain melaporkan bahwa berdasarkan data yang telah dilaporkan sebelumnya, MSC dapat berperan dalam percepatan penyembuhan luka melalui peningkatan IL 10. Namun, demikian penelitian yang mengkaji pengaruh MSC terhadap ekspresi IL 10 dalam penyembuhan luka eksisi belum dilaporkan (Lee and Kang, 2020).

1.2. Rumusan Masalah

Adakah pengaruh *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) terhadap ekspresi Interleukin 10 (IL 10) dalam progress penyembuhan luka eksisi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) *hypoxic* terhadap peningkatan ekspresi IL 10 dalam penyembuhan luka eksisi.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui ekspresi IL 10 pada penyembuhan luka eksisi dengan tanpa perlakuan (kontrol).

1.3.2.2. Mengetahui ekspresi IL 10 pada penyembuhan luka eksisi dengan menggunakan *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) *hypoxic*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

1.4.1.1. Penelitian ini merupakan media melahirkan ide atau gagasan berlandaskan teori yang didapatkan di berbagai sumber yang telah diperoleh, serta kesempatan secara langsung untuk ide tersebut terbukti dalam sebuah penelitian.

1.4.1.2. Penelitian ini juga dapat menambah pengetahuan dalam bidang kesehatan serta dapat menjadi referensi penelitian-penelitian lebih lanjut melalui perbaikan metode metode yang ada.

1.4.1.3. Sebagai acuan untuk peneliti selanjutnya tentang pengaruh *Mesenchymal Stem Cell (MSC) hypoxic* terhadap jumlah IL 10 pada penyembuhan luka eksisi.

1.4.2. Manfaat Metodologi

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat dan kegunaan *Mesenchymal Stem Cell (MSC) hypoxic* sebagai pilihan terapi alternatif untuk penyembuhan luka eksisi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Luka

2.1.1. Definisi Luka

Luka adalah terganggunya integritas jaringan biologis, meliputi kulit, selaput lendir, dan organ. Hilangnya fungsi dan kerusakan struktur dari berbagai jenis trauma dapat menyebabkan luka (Nourian Dehkordi *et al.*, 2019)

Payne-James *et al* mengelompokan tipe-tipe luka menjadi;

2.1.1.1.Luka memar atau kontusio diakibatkan oleh benturan yang merusak pembuluh darah sehingga menyebabkan jaringan dari pembuluh darah ruptur. Kemudian, darah bermigrasi ke jaringan perivaskular dan terlihat jelas di permukaan kulit sebagai perubahan warna

2.1.1.2.Luka lecet atau abrasi adalah cedera superfisial yang tidak menembus seluruh lapisan epidermis. Abrasi sering kali terjadi karena gesekan permukaan kulit di atas yang permukaan yang kasar

2.1.1.3.Luka robek atau laserasi disebabkan karena trauma benda tumpul yang menyebabkan disintegrasi pada jaringan. Sehingga kulit dan jaringan lunak tampak seperti luka yang terbuka.

2.1.1.4. Luka iris atau insisi disebabkan oleh sayatan alat berujung runcing, seperti pisau atau silet dan biasanya luka insisi terkait dengan prosedur pembedahan. Pada luka insisi yang cukup panjang dan dalam dapat merusak jaringan dan pembuluh-pembuluh darah. Karakteristik luka insisi yaitu cenderung lurus, tepian rata, tidak terdapat memar dan tidak lecet.

2.1.2. Jenis-jenis Luka

Centerfor Disease Control (CDC) telah membagi jenis-jenis luka berdasarkan sumber dan penyebabnya. Klasifikasi luka terdiri dari empat kelas status luka;

2.1.2.1 Luka kelas 1 atau luka bersih atau tanpa adanya infeksi, tidak ada tanda-tanda peradangan dan luka tertutup. Selain itu, luka ini tidak masuk ke saluran pernapasan, saluran pencernaan, alat kelamin, atau saluran kemih.

2.1.2.2 Luka kelas 2 dianggap terkontaminasi bersih. Luka ini tanpa adanya kontaminasi dari patogen atau agen infeksius. Luka kelas dua dapat masuk ke saluran pernapasan, pencernaan, genital, atau saluran kemih. Namun, luka kelas dua dapat dikendalikan penyebarannya.

2.1.2.3 Luka kelas 3 dianggap terkontaminasi yang merupakan luka baru dan terbuka diakibatkan karena operasi atau kebocoran dari saluran pencernaan.

2.1.2.4 Luka kelas 4 dianggap terinfeksi dan kotor. Luka ini biasanya disebabkan oleh luka traumatis yang tidak mendapat penanganan optimal. Luka kelas empat menunjukkan jaringan yang mengalami devitalisasi dan nekrosis akibat mikroorganisme.

2.1.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi

(Giri, 2019) menyebutkan beberapa faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka antara lain

2.1.3.1 Infeksi adalah agen yang menghambat regenerasi luka.

Infeksi berkontribusi memperluas area luka, hasil metabolisme patogen berpotensi merusak integritas kulit dan mempengaruhi proses inflamasi.

2.1.3.2 Status gizi memiliki peran penting pada pemulihan luka karena proses fisiologi penyembuhan luka tergantung pada tersedianya makronutrien dan mikronutrien

2.1.3.3 Glukokortikoid atau steroid memiliki kemampuan dalam menangkal siklus arakidonat yang berkontribusi pada terjadinya radang.

2.1.3.4 Usia dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka.

Semakin bertambahnya usia dapat mempengaruhi kemampuan jaringan untuk beregenerasi, sintesis faktor pembekuan, dan respon inflamasi.

2.1.3.5 Tipe dan luas jejas jaringan mempengaruhi proses penyembuhan luka. Lokasi sifat dan jejas jaringan tempat jejas menentukan presentase penyembuhan luka. Semakin dalam luka akan semakin lama proses penyembukannya. Bahkan, tidak dapat kembali seperti semula.

2.2. Interleukin 10

2.2.1. Definisi IL-10

IL 10 adalah sitokin pleomorfik yang berperan sebagai sitokin anti inflamasi selama terjadinya infeksi. Diketahui, IL10 diproduksi oleh hampir semua spesies sistem imun, termasuk sel B, sel mast, granulosit (misalnya, neutrofil, basofil, eosinofil), makrofag, sel dendritik, dan beberapa sub-set Sel T (Saravia 2020).

Pada tingkat seluler, IL-10 berperan sebagai agen pengatur *post-transcriptional* untuk menekan *messenger* RNA (mRNA) untuk menstabilkan protein HuR (*Human antigen R*), mempromosikan destabilisasi yang spesifik dari sitokin inflamasi mRNA. Selain itu, IL-10 dapat menghambat jalur pensinyalan apoptosis, melalaui jalur p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), melalui *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), sehingga menghambat kematian jaringan dan disfungsi organ setelah cedera (Steen, E. H., *et al.* 2020)

2.2.2. Fungsi Sel IL-10

IL-10 sebagai *anti-inflammatory cytokine* muncul untuk menghambat proses inflamasi dengan cara mencegah produksi beberapa jenis sitokin pro inflamasi dan/atau kemokin, meregulasi ekspresi *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas dua seperti makrofag dan sel dendritik dalam meningkatkan produksi sel T, sehingga bersifat immunosupresan dan melindungi cedera jaringan akibat respons imun yang berlebihan. (Kumar *et al*, 2018).

2.3. *Stem Cell*

2.3.1. Definisi

Menurut (Pavlovic and Radotic, 2017) *Stem Cell* atau sel induk adalah sel khusus atau belum mengalami diferensiasi. Secara fungsional, sel ini memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri melalui pembelahan sel dan dapat berdiferensiasi menjadi garis keturunan sel yang berbeda (*multi-lineage cells*) dan memiliki potensi yang bervariasi dan lebih terbatas.

Stem Cell dapat ditemukan di berbagai jaringan maupun organ tubuh manusia, baik belia ataupun lansia. Sebuah sel dapat dikategorikan sebagai *Stem Cell* apabila memiliki dua ciri yang khas yang membedakan dengan sel yang lain dan hanya dimiliki oleh sel punca, yaitu (1) *Stem Cell* merupakan sel yang belum fungsi khusus namun dapat terus mereformasi bentuk dengan pembelahan sel (2) *Stem Cell* merupakan sel yang dapat diinduksi untuk menjadi seperti sel atau jaringan tertentu. Sehingga, *Stem Cell* dapat memiliki

kemampuan regeneasi yang baik terutama dalam perkembangan terapi regenerasi jaringan (Vasanthan *et al.*, 2021).

2.3.2. Karakteristik

(Zakrzewski *et al.*, 2019) Agar sel dapat dikategorikan dalam definisi sel induk atau sel punca. Sel harus memiliki dua karakteristik yang esensial, antara lain :

2.3.2.1. Daya Memperbanyak Diri Sendiri (*Self Renewal*)

Stem cell harus mempunyai kapabilitas untuk replikasi diri sendiri tanpa batas agar menghasilkan turunan sel-sel yang mempunyai ciri yang persis dengan sel induknya. Kemampuan ini juga dimiliki oleh sel kanker yang dapat berlipat ganda secara tidak terkendali sedangkan pembelahan sel induk sangat diatur.

2.3.2.2. Berdiferensial (*Diffentiated*)

Secara struktural dan fungsional, stem cell merupakan sel yang belum memiliki kemampuan khusus.

Oleh karena itu, syarat terpenting suatu sel dapat disebut sel punca adalah sel harus dapat berkembang menjadi jenis sel yang spesifik. Keistimewaan dalam berkembang menjadi lebih dari satu jenis sel tubuh.

2.3.3. Klasifikasi

(Escacena-acosta *et al.*, 2019) stem cell dapat dikelompokkan berdasarkan potensi berdiferensiasi dan sumbernya. Menurut sumbernya dapat diklasifikasikan sebagai berikut

2.3.3.1. Embryonic : Pada hari pertama pembuahan, sebuah lapisan terluar sel yang menjadi cikal bakal plasenta terpisah dari *Inner Cell Mass* (ICM), yaitu bagian dari *blastocyst* yang nantinya akan menjadi embrio, amnion, dan kantung kuning telur merupakan benih sel punca yang *pluripotent*

2.3.3.2. Placental and Umbilical Cord Stems Cells : Plasenta, *cords blood*, dan *umbilicals cord* merupakan sumber *Hematopoietic Stem Cells* (HSCs) dan MSC, yang memiliki potensi regenerasi paling yang sangat besar. *Stem cell multipoten* ini dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel.

2.3.3.3. Adult Stem Cells atau *Tissue-Specific Stem Cell* : terdapat di berbagai area pada organ atau jaringan yang sudah matur. MSC terdapat pada sumsum tulang manusia. *Mesenchymal stem cells-Bone Marrow* (MSC-BM) memiliki kemampuan memperbarui dalam jangka panjang dan berdiferensiasi dalam bentuk dan fungsi jaringan yang lain.

2.3.3.4. Totipotent : Hanya zigot atau morula yang betul-betul dipertimbangkan dengan kapasitas *Totipotent*, yang mana

sebuah sel membelah dan berkembang menjadi berbagai jenis sel.

2.3.3.5. *Pluripotent* : Sekumpulan sel yang mampu berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dari tiga lapisan germinal, yaitu, ektoderm, mesoderm, dan endoderm dari jaringan manapun. *Embryonic Stem Cells* (ESCs) dan *Induced Pluripotent Stem Cells* (iPSCs) diketahui kemampuan ini.

2.3.3.6. *Multipotent* : *Stem cell* yang mampu berdiferensiasi menjadi banyak jenis sel. Contohnya, HSC yang dapat berkembang menjadi berbagai jenis sel darah tapi tidak ke otak atau sel-sel hati.

2.3.3.7. *Unipotent* : hanya dapat berdiferensiasi menjadi satu jenis sel tertentu seperti hepatoblasts yang membentuk hepatosit.

2.4. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)

MSC merupakan sel multipoten yang mampu bereplikasi menjadi sel yang memiliki daya berdiferensiasi menjadi sel lain. MSC memiliki potensi untuk berdiferensiasi menjadi banyak prekursor jaringan mesenkim seperti osteosit, adiposit, dan kondrosit. Benih dari indukan tersebut dapat digunakan dalam terapi sel (Ullah, Liu and Thakor, 2019).

Dari hasil penelitian dengan menggunakan *flow-cytometry* oleh (Ghaneialvar *et al.*, 2018) ekspresi CD marker pada permukaan antigen. Hasilnya, sel punca mesenkim manusia dan tikus positif mengekspresikan

CD44, CD166, CD105 dan CD90 sedangkan, ekspresi CD34 dan CD45 negatif. Kesimpulannya, meskipun semua sel induk mesenkim menunjukkan splastisitas dan diferensiasi tri-garis keturunan, tidak semua mengekspresikan panel antigen permukaan yang sama seperti yang dijelaskan untuk sel punca mesenkim manusia. Panel penanda CD tambahan diperlukan untuk mengkarakterisasi potensi regeneratif dan kemungkinan penerapan sel induk ini dalam pengobatan regeneratif dan implantologi.

Sel induk mesenkim dapat diisolasi dari spesies dan jaringan yang berbeda. Sel tersebut diambil dari jaringan ikat seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, hati janin dan lainnya, dan dapat berhasil diperluas secara *in vitro* (Chu *et al.*, 2019).

2.5. Mesenchymal Stem Cell (MSC) Hipoksik

2.5.1. Definisi Hipotesis

Hipoksia salah satu indikator penurunan kadar oksigen dalam jaringan yang disebabkan tidak adekuatnya aliran darah karena adanya gangguan. Sehingga, pasokan oksigen menurun. Keadaan ini mengakibatkan tubuh melakukan adaptasi melalui pemulihan pasokan oksigen, metabolisme anaerob, efisiensi energi dan kendali genetik. Jika hipoksia tidak dapat terkompensasi dengan baik dapat mengakibatkan kematian (Kumar *et al.*, 2019)

2.5.2. Patogenesis Hipoksia

(Meng *et al.*, 2018) mengungkapkan bahwa oksigen memegang peranan yang kompleks dalam keberlangsungan hidup sebuah sel. Penurunan kadar oksigen dalam jaringan dapat memicu kaskade kematian sel. mengungkapkan adanya HIF sebagai faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sejumlah gen yang mengatasi kondisi hipoksia. HIF memiliki dua jenis isoform yaitu HIF 1 dan HIF 2. Baik HIF 1 dan 2 ternyata terbentuk atas dua struktur protein yaitu alfa dan beta. Keduanya adalah protein konstitutif yang dibuat setiap saat.

Apabila oksigen adekuat, HIF 1 alfa dan HIF 2 alfa setelah diproduksi akan langsung didegradasi. Berbeda dengan HIF beta yang tetap berada di sitoplasma. Saat terjadi insufisiensi oksigen HIF 1 alfa dan 2 alfa tidak terdegradasi melainkan bergabung dengan HIF beta. Kemudian, kedua faktor tersebut migrasi ke inti sel dan mengaktivasi promotor gen yang berperan dalam menangani kondisi hipoksia. HIF-1 alfa berkontribusi dalam produksi dan regulasi dari

2.5.2.1. Kelompok gen yang memfasilitasi pengikatan dan transportasi oksigen. Diketahui bahwa HIF ini meregulasi eritropoietin, VEGF dan renin.

2.5.2.2. Melakukan adaptasi metabolisme terhadap hipoksia.

Metabolisme akan digeser kearah metabolisme anaerobik

2.5.2.3. Melakukan efisiensi dalam mengatasi hipoksa yang berkepanjangan, maka dilakukan apoptosis, contohnya protein p53.

Hipoksia diketahui menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas salah satunya terbentuk karena kebocoran oksigen pada transport elektron di membran dalam mitokondria. Mitokondria dalam kondisi hipoksia menjadi tidak stabil, sehingga semakin banyak H₂O₂ yang terbentuk.

2.6. Efek Kultur Stem Cell Hipoksik

Saat ini, penatalaksanaan perawatan penyembuhan luka masih terbatas. Namun, beberapa penelitian mengenai terapi stem cell yang diinduksi dalam kondisi hipokisa sudah berkembang dan menasar pada penggunaan stem cell pada spektrum yang lebih luas. (Haque et al,2013), (Chen et al, 2014), (Widowati, *et al* 2017) dan (Peruzzaro *et al*, 2019).

Menurut Etjtheadifar *et al* (2015) MSC merupakan sel punca multipotent yang memiliki kemampuan dalam regenerasi jaringan. Kemampuan immunosuppresan sehingga dapat menjadi solusi pada kasus-kasus rejeksi transplantasi yang dimediasi imun host. Sama halnya dengan sel-sel lain yang terdapat di dalam tubuh kita, keadaan hypoxia dapat menginduksi MSCs melalui aktivasi HIF- 1 yang dapat mengubah pertumbuhan, multipikasi, diferensiasi, dan ekspresi gen MSC.

Dari hasil berbagai macam studi *in vitro* yang dilakukan di Indonesia oleh (Widowati *et al.*, 2017) menunjukkan perbandingan lingkungan antara sel punca yang dikultur pada kondisi normal (MSCnor) dan induksi hipoksia (MSChypo). Sel induk biasanya dikultur pada konsentrasi oksigen yang lebih rendah dibanding sekitarnya tanpa memperhatikan lingkungan metabolik dari niche mana mereka biasanya tumbuh. Konsentrasi oksigen yang tinggi justru menciptakan stress yang berlebih pada mikro environment sel punca.

Konsentrasi oksigen pada *niche* sel punca (biasanya 2-9% oksigen) dianggap sebagai memadai untuk mendorong sel dalam melakukan fungsinya. Keadaan hipoksia berperan penting dalam homeostasis di tubuh sejak fase embrio. Keadaan ini penting untuk mempertahankan pluriipotensi sel induk, menginduksi diferensiasi, dan mengatur sinyal kaskade, termasuk angiogenesis. Dalam kondisi hipoksia, fungsi-fungsi ini diatur oleh beberapa faktor transkripsi seperti (HIF), *Activator Protein 1* (AP-1), *Factor Inhibiting HIF-1* (FIH-1), *Prolyl Hydroxylase* (PHD), , *Nuclear Factor Kappa B* (NF-Kb), p53, dan c-Myc. Meskipun interaksi diantara semua faktor transkripsi diperlukan untuk respons seluler, HIF (terutama HIF-1) memiliki peran kunci dalam respons seluler terhadap hipoksia. Penemuan HIF-1a oleh Greg Semenza memberikan wawasan mendalam tentang mekanisme seluler yang mengontrol adaptasi pada kondisi hipoksia.

Umumnya, dalam kondisi hipoksia, pada kadar oksigen yang rendah menekan hidroksilasi prolyl yang meningkatkan laju akumulasi HIF-1 α dan translokasi inti. Setelah translokasi inti, hidroksilasi prolyl berikatan dengan HIF-1 β untuk membentuk heterodimer. Kemudian, heterodimer HIF-1 mengikat *Hypoxia-Response Elements* (HRE) pada gen target, berasosiasi dengan koaktivator seperti CBP / p300, dan mengatur transkripsi yang melibatkan 70 gen dalam metabolisme, angiogenesis, invasi / metastasis, dan kematian sel.

2.7. Perkembangan Kultur Mesenchymal Stem Cell hypoxic pada penelitian terdahulu

Dari penelitian kultur MSC yang dilakukan oleh (Widowati *et al.*, 2017) diketahui strategi penggunaan kultur MSC pada keadaan hipoksik sudah diterapkan pada beberapa penelitian sebelumnya. MSC yang dikondisikan dalam keadaan hipoksik menunjukkan hasil yang bermakna karena mengoptimalkan ketahanan hidup sel, meningkatkan aktivitas sinyal parakrin untuk menciptakan *niche* stem cell yang baik, meningkatkan kemampuan proliferasi sel, serta membuat jalur *multi lineage* lebih terarah karena silsilah diferensiasi sel memiliki potensi yang lebih baik.

Pada penelitian ini, induksi hipoksia berasal dari kultur BMSCs. Selama beberapa tahun, BMSCs diketahui sebagai sumber primer dalam aplikasi terapi sel punca dalam regenerasi dan neoangiogenesis pada miocard. (Riis *et al.*, 2017)

Metode penelitian dimulai dengan mempersiapkan tikus jantan (Wistar Rat) sebagai objek penelitian yang kemudian diambil sumsum tulang belakangnya melalui prosedur aspirasi sumsum tulang yang kemudian dikultur, perlakuan keadaan hipoksik baru diberikan setelah sampai pada pasase tiga. BMSC tersebut dilipat gandakan secara in vitro menjadi 16 unit, setelah itu diacak dan dibagi ke dalam 2 kelompok perlakuan yaitu : 1) kelompok kontrol (P0) yang diberi perlakuan normoksia Oksigen 21%; dan 2) kelompok perlakuan (P1) yang diberikan paparan hipoksia Oksigen 1%, masing-masing selama 48 jam.

Hasil dalam eksperimen tidak didapatkan marker positif CD31. Namun, dari penambahan waktu kultur membuktikan bahwa adanya ekspresi seperti CD31 dan CD34. Stimulasi keadaan hipoksik membentuk HIF kompleks yang sejalan dengan peningkatan regulasi *Growth Factor* (IGF, bFGF, VEGF). Didapatkan konsentrasi VEGF lebih tinggi pada BMSCs hipoksia dibandingkan normoksia. Hal ini membuktikan induksi hipoksia menstimulasi pelepasan VEGF yang memiliki potensi dalam proses angiogenesis lebih besar.

Kondisi hipoksia juga salah satu faktor penting yang menstimulasi neoangiogenesis dan neovascularization, dimana HIF-1 α mengakselerasi regulasi kemokin-kemokin seperti aktifitas parakrin SDF-1, IL- 8, MCP-1, and MCP-3. Diharapkan HPC-BMSCs menjadi pioner dalam proses angiogenesis khususnya migrasi dan engraftment sel (Widowati *et al.*, 2017) dan (Xu *et al.*, 2019).

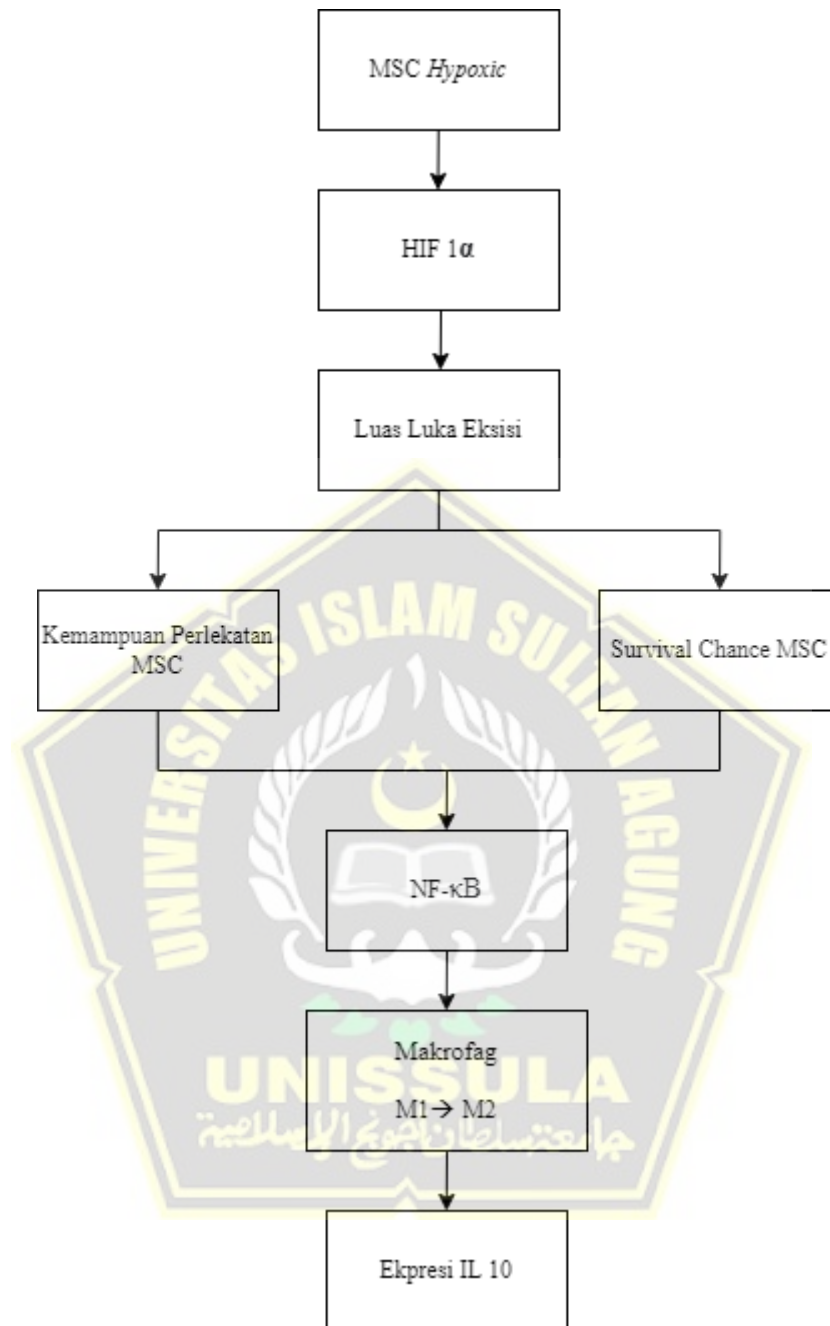
2.8. Pengaruh Mesenchymal Stem Cell terhadap ekspresi IL 10 pada Tikus Luka Eksisi

MSC adalah adalah sel progenitor yang berasal dari mesodermal. MSC diisolasi karena kemampuannya untuk melekat pada permukaan kultur jaringan seperti plastik. Sel-sel tersebut memiliki bentuk yang khas seperti gelendong, kapasitas untuk *Colony Forming Units-Fibroblastic* (CFUs-F) serta kemampuannya untuk berdiferensiasi menjadi adiposit, kondrosit, osteosit, dan jaringan fibrosa in vitro dan in vivo (O'Connor, 2020).

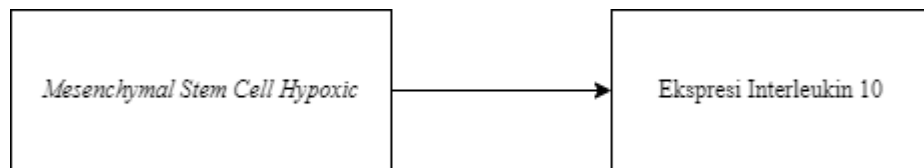
Untuk terapi berbasis sel punca, MSC memiliki banyak sifat yang menarik : (i) MSC tidak mengekspresikan MHC kelas II atau molekul kostimulatori (CD80, CD40, dan CD86) dan, dengan demikian, kekurangan zat imunogenik (ii) sel punca mengatur peradangan jaringan yang terluka atau sakit menuju regenerasi jaringan (iii) menghasilkan berbagai faktor bioaktif untuk mendukung fungsi normal sel residen di lingkungan mikro yang tidak bersahabat (Shammaa *et al.*, 2020).

MSC juga terbukti dapat meningkatkan ekspresi senyawa bioaktif seperti IL 10 melalui efek parakrin. IL 1- mampu mengurangi aktivasi makrofag M1 dan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi seperti IFN- γ tumor necrosis, TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 pada jaringan yang meradang

2.9. Kerangka Teori



2.10. Kerangka Konsep



Gambar 2. 1 Kerangka Konsep

2.11. Hipotesis

Terdapat pengaruh MSC *hypoxic* terhadap peningkatan ekspresi IL-10 pada penyembuhan luka eksisi.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Only Control Group Design*”.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah *Mesenchymal Stem Cell Hypoxic*.

3.2.1.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah untuk mengamati Ekspresi IL 10

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. *Mesenchymal Stem Cell Hypoxic*

Mesenchymal Stem Cell adalah sel multipotent yang mampu berdeferiasi menjadi sel-sel yang matur. MSC ini diperoleh dari isolasi *umbilical cord* pada tikus galur *Wistar*, berusia 19hari dan yang tengah mengandung. MSC dikultur dalam medium basal *Dulbecco's Modified Eagle*

Medium (DMEM). Sebagai suplementasi ditambahkan *Fetal Bovine Serum* (FBS), antijamur dan antibiotik. Kemudian, diinkubasi ke dalam *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. MSC yang akan diinjeksi kan diberi marker terlebih dahulu menggunakan *flow cytometry*, yang masing-masing didiferensiasikan sebagai CD73, CD90 dan CD105. Setelah identifikasi MSC selesai. MSC diberikan secara injeksi subkutan di sekitar luka sebanyak 3×10^6 sel. Skala : Rasio dengan satuan sel.

3.2.2.2. Ekspresi IL 10

Ekspresi IL 10 adalah sitokin anti-inflamasi selama terjadinya infeksi. Sekresi IL 10 penting untuk melimitasi respon imun yang berlebihan untuk mempercepat proses penyembuhan luka serta meminimalisir timbulnya jaringan parut. IL 10 didapat jaringan luka insisi pada tikus galur Wistar pasca perlakuan pada hari ke 3, 6 dan 9. Pengamatan ekspresi IL 10 menggunakan metode *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)* menggunakan alat *Eco Real-Time PCR* Illumina dan dinyatakan dengan kelipatan (*fold*). Skala : Rasio dengan satuan satuan *fold*.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Wistar* yang diperoleh dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran UNISSULA target adalah *Mesenchymal Stem Cell hypoxic* (MSC) yang dikultur di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research Semarang*.

3.3.2. Sampel

3.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih jantan galur *Wistar* dalam keadaan sehat, lincah.
2. Tikus putih jantan galur *Wistar* berusia 60 hari.
3. Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria berat badan 200-250 gram

3.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus putih jantan galur *Wistar* yang memiliki kelainan fisiologis dan anatomis.
2. Tikus putih jantan galur *Wistar* yang sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

3.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

1. Tikus mati selama penelitian.
2. Tikus terjangkit infeksi.

3.3.3. Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan secara *randomized sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Shamm (tikus sehat tanpa luka eksisi), kontrol (tikus luka eksisi), P1 (tikus luka eksisi diberi MSC normoksik dosis 3×10^6) dan P2 (tikus luka eksisi diberi MSC hypoxic dosis 3×10^6).

3.3.4. Besar Sampel

Sampel menggunakan kriteria *World Health Organization* (WHO) sebanyak 5 ekor sampel per kelompok per jumlah hari pengambilan sampel. Total sampel pada penelitian ini berjumlah 60 ekor tikus yang masing-masing perlakuan berjumlah 15 ekor. Pada penelitian ini digunakan tikus putih jantan galur *Wistar*.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen

1. Biosafety
2. Inverted microscope
3. Conical tube (15 ml, 50 ml)
4. Pipette filler
5. Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip)
6. Cryotube 1 ml
7. Flask

8. Dish
9. CO₂ cylinder
10. Scissor
11. Pinset
12. Sentrifuge
13. Beaker glass
14. CO₂ Incubator
15. Cell counter
16. Disposable pipet
17. Spuit 1 cc
18. Mikroskop cahaya
19. Alat cukur
20. Set alat bedah
21. Mikropipet
22. Masker
23. Handscoon
24. Kandang hewan coba

3.4.2. Bahan Penelitian

1. NaCl 0.9%
2. FBS
3. Medium □MEM
4. Alkohol 70%
5. Fungizon 0.5%

6. Streptomisin-penicilin 1% (penstrep)
7. PBS
8. Povidon iodine
9. Kasa kering
10. Kapas pembersih
11. Tikus putih jantan galur wistar
12. Pakan standart tikus
13. Aquades.

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

1. Seluruh rangkaian proses harus dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.
2. *Umbilical cord* diambil dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%.
3. *Umbilical Cord* diambil menggunakan pinset diletakkan ke dalam cawan petri kemudian *umbilical cord* dibersihkan menggunakan PBS.

4. Iris *Umbilical cord* menggunakan pisau steril menjadi 3-5 segmen.
5. Lepaskan *Umbilical cord* dengan pembuluh darah.
6. Setiap bagian *umbilical cord* yang telah terpisah dari pembuluh darah digunting dengan panjang masing-masing 1 mm.
7. Rajangan *umbilical cord* diletakkan pada flask 25T secara menjaral agar merata.
8. Bersihkan *complete medium* (α MEM yang ditambahkan dengan fungizon, penstrep, dan FBS) sebanyak 2-3 ml.
9. Tempatkan dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kadar CO₂ 5%.
10. Amati potongan jaringan dalam inkubator setiap 24 jam serta catat apabila ada sel yang keluar dari spot penanaman.
11. Pada hari ke 14 muncul sel dari titik penanaman eksplan.
12. Pindahkan ke medium yang berbeda setiap 2-3 hari sekali menggunakan *micropipette* untuk menyingkirkan separuh medium kemudian diganti dengan *complete fresh medium* disetarakan dengan jumlah yang dibuang.
13. Setelah terdapat sel pada titik eksplan, tingkatkan level *medium complete* menjadi 5ml.
14. Pasease selanjutnya dilakukan pemeliharaan sel hingga konfulensi mencapai 80%.

15. Seluruh rangkaian proses harus dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.
16. *Umbilical cord* diambil dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%.
17. *Umbilical Cord* diambil menggunakan pinset diletakkan ke dalam cawan petri kemudian *umbilical cord* dibersihkan menggunakan PBS.
18. Iris *Umbilical cord* menggunakan pisau steril menjadi 3-5 segmen.
19. Lepaskan *Umbilical cord* dengan pembuluh darah.
20. Setiap bagian *umbilical cord* yang telah terpisah dari pembuluh darah digunting dengan panjang masing-masing 1 mm.
21. Rajangan *umbilical cord* diletakkan pada flask 25T secara menjalar agar merata.
22. Bersihkan *complete medium* (α MEM yang ditambahkan dengan fungizon, penstrep, dan FBS) sebanyak 2-3 ml.
23. Tempatkan dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kadar CO₂ 5%.
24. Amati potongan jaringan dalam inkubator setiap 24 jam serta catat apabila ada sel yang keluar dari spot penanaman.
25. Pada hari ke 14 muncul sel dari titik penanaman eksplan.

26. Pindahkan ke medium yang berbeda setiap 2-3 hari sekali menggunakan *micropipette* untuk menyingkirkan separuh medium kemudian diganti dengan *complete fresh medium* disetarakan dengan jumlah yang dibuang.
27. Setelah terdapat sel pada titik eksplan, tingkatkan level *medium complete* menjadi 5ml.
28. Pasase selanjutnya dilakukan pemeliharaan sel hingga konfluensi mencapai 80%.

3.5.3. Proses Pemanenan Sel

1. Kultur sel yang dapat dijadikan perlakuan adalah sel pada pasase ke 6.
2. Cuci flask yang menggunakan PBS sebanyak 3 kali pencucian untuk menghilangkan medium sel dari dalam flask.
3. Setelah flask telah bersih, tambahkan *Trypsin* 2 mL sebagai clearing untuk memastikan sel telah terlepas dan flask bersih dari sel.
4. Masukkan ke dalam inkubator sekitar dengan suhu 37°C selama 3 menit.
5. Gunakan *complete medium* untuk menghambat dan menghilangkan kerja enzim *Trypsin*.
6. Masukkan sel yang telah terlepas ke dalam larutan medium.
7. Lakukan proses sentrifugasi menggunakan alat sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan tinggi 3000 rpm.

8. Cermati perubahan apabila larutan terpisah menjadi supernatant dan endapan.
9. Buanglah supernatan dengan hati-hati menggunakan pipet tetes.
10. Larutkan dengan menggunakan PBS sebanyak 1 mL.
11. Hitung jumlah sel dengan menggunakan protocol penghitungan.

3.5.4. Proses Penghitungan Sel

1. Siapkan 10 μ L sel letakan ke dalam botol atau vial tube.
2. Tambahkan triphan blue 90 μ L ke dalam vial tube.
3. Gunakan micropipet untuk mengambil 10 μ L sel kemudian pindahkan ke dalam bilik hitung.
4. Bilik hitung yang sudah diisi dibiarkan selama 1 menit kemudian ditutup dengan cover glass.
5. Letakan bilik hitung dengan hati-hati di bawah mikroskop inverted dalam keadaan tanpa gelembung udara.
6. Carilah 4 bilik hitung dan amati.
7. Cara penghitungan :
 - Hitung sel hidup yang terdapat dalam bilik hitung dengan cara mengidentifikasi warna terang pada 4 bilik hemositometer.

Perhitungan jumlah sel dengan menggunakan rumus berikut :

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

3.5.5. Permbacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan *Flow Cytometry*

1. Siapkan 10 μ L sel letakan ke dalam botol atau vial tube.
2. Tambahkan triphan blue 90 μ L ke dalam vial tube.

3. Gunakan micropipet untuk mengambil 10 μ L sel kemudian pindahkan ke dalam bilik hitung.
4. Bilik hitung yang sudah diisi dibiarkan selama 1 menit. Kemudian ditutup dengan cover glass.
5. Letakan bilik hitung dengan hati-hati di bawah mikroskop inverted dalam keadaan tanpa gelembung udara.
6. Carilah 4 bilik hitung dan amati.
7. Cara penghitungan:
 - Hitung sel hidup yang terdapat dalam bilik hitung dengan cara mengidentifikasi warna terang pada 4 bilik hemositometer.
 - Perhitungan jumlah sel dengan menggunakan rumus berikut :

$$\frac{\sum n_1 + \sum n_2 + \sum n_3 + \sum n_4}{4} \times 10^4 \times \text{pengenceran}$$

Tabel 3. 1 Reagen yang digunakan dalam flow cytometry

Tabung	Reagen	Volume
--------	--------	--------

1	FITC mouse anti-human CD90	5µl
2	PE mouse anti-human CD44	5µl
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD105	5µl
4	APC Mouse anti-human CD73	5µl
5	Kosong	-
6	hMSC positive isotype control cocktail	20µl
7	hMSC negative isotype control cocktail	20µl
8	hMSC positive cocktail	20µl
9	PE hMSC negative cocktail	20µl

3.5.6. Prosedur Hipoksia

1. Preparasi *hypoxic chamber*
2. Letakan MSC pada flask ke dalam *hypoxic chamber*
3. Masukkan *oxygen meter* di dalam *hypoxic chamber*
4. Tutup rapat *hypoxic chamber*
5. Berikan pasokan CO₂ ke dalam *hypoxic chamber* melalui selang
6. Amati perubahan sampai kadar O₂ 5% pada *oxygen meter*
7. Inkubasi MSC dalam kurun waktu 24 jam kemudian periksa kembali. Pastikan kadar stagnan pada O₂ 5%.

3.5.7. Pembuatan Hewan Coba Model Luka Kesihi

Pembuatan model hewan coba luka eksisi diawali dengan pembiusan tikus menggunakan ketamin xylasine dengan

perbandingan 3:1 dengan dosis 0,1 ml/100 g bobot badan. Tikus yang telah tidak sadarkan diri rambut pada bagian punggung dipotong menggunakan pisau cukur otomatis dengan ukuran 5x5 hingga bersih. Permukaan kulit yang telah bersih menggunakan bovidon iodine untuk menghindari infeksi selama pembuatan luka. Pembuatan luka dilakukan dengan menggunakan biopsi punch ukuran 0.6 mm hingga bagian dermis.

3.5.8. Perlakuan pada Luka Hewan Coba

Setelah pembuatan luka insisi tikus diberikan MSC pada Kelompok Kontrol Positif. Sedangkan, Kelompok Perlakuan diberikan 0,5 cc larutan NaCl fisiologis. MSC diberikan dengan injeksi sub kutan di lima tempat penyuntikan yang masing-masing berjarak 0,5 cm dari tepi luka.

3.5.9. Pengambilan Sampel Serum

Pada hari ke 3, 6 dan 9 setelah perlakuan luka dilakukan pengamatan dan pengambilan sampel serum. Pengambilan sampel darah dilakukan tanpa adanya anestesi, pada vena orbital tikus sampel darah dikumpulkan sebanyak 3 cc untuk diletakkan pada alat sentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Selama analisis serum sudah terbentuk disimpan dalam wadah vial 1 cc dan pada suhu -80 derajat celsius.

3.5.10. Pengambilan Sampel Jaringan

Sampel jaringan diambil pada hari ke 3, 6 dan 9 pasca pemberian luka insisi. Tikus dipilih secara acak. Untuk dapat membedakannya mendislokasi pada area leher. Agar diperoleh irisan jaringan yang rapi, potong melintang dengan gunting disekitar area dada hingga kaki kemudian potong dengan ukuran 2x2. Fiksasi sampel jaringan dengan merendam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam dan disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70%.

3.5.11. Perhitungan Ekspresi IL 10

3.5.11.1 Isolasi *Reoxyribo Nucleid Acid* (RNA)

3.5.11.1.1 Homogenkan sampel jaringan. Kemudian diisolasi, setelah itu masukan ke dalam tabung sentrifuge, pusingkan $12.000 \times g$ selama 10 menit. Amati endapan, *supernatant* yang terbentuk dapat dibuang, ambil perlahan dengan pipet 1 mL TRI Reagent ke dalam pelet.

3.5.11.1.2 Inkubasi dalam suhu 37° Celcius selama 5 menit.

Perlahan-lahan berikan 0,2 ml kloroform.

Kemudian, tutup sampel, jatuhkan ke bawah mengikuti gaya gravitasi, pastikan tidak bocor dan kedap. Kemudian, kocok selama 30 detik, dan diamkan selama 2–15 menit. Masukan ke dalam alat *sentrifuge* $12.000 \times g$ pusingkan campuran selama 15 menit pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.

Pada proses sentrifugasi ini campuran terpisah menjadi 3 ; *red phase* (mengandung protein), *interphase* (mengandung DNA), dan *watery phase* atau tidak berwarna (mengandung RNA).

3.5.11.1.3 Pindahkan campuran yang hanya mengandung RNA ke dalam tabung dan berikan 0,5 ml 2-propanol/etanol, campur menggunakan *invert*. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 37° Celcius *Sentrifuge* pada 12.000 × g selama 10 menit pada suhu 2-8 °C. Endapan RNA akan membentuk pelet di bagian samping dan bawah tabung.

3.5.11.1.4 Buang supernatan dan cuci pelet RNA dengan menambahkan 1 ml etanol 75%. *Vortex* sampel dan kemudian *sentrifuge* pada 12.000 × g selama 10 menit pada suhu 2-8 °C.

3.5.11.2 Konversi total RNA menjadi cDNA

3.5.11.2.1 Tambahkan reagen berikut ke tabung *microcentrifuge* PCR 200 µl *thin-walled* pada es:

Tabel 3. 2 Konversi total RNA menjadi cDNA

Volume	Reagen	Konsentrasi akhir
1-2 µl	<i>Template</i>	/ Secara umum 0,0050.25 µg / µl
	Sampel RNA	RNA total atau jumlah poli (A) + RNA yang diinginkan

1 μl	Campuran <i>Deoxynucleotid</i> <i>e</i> (dTNP)	500 μ M setiap dNTP
1 μl	Random 3' <i>Antisense</i> <i>specific primer</i> atau Oligo (dT) 23 primer	2 μ M (Secara umum, gunakan nonamers atau- antara 1-4 μ M) 1 μ M (Secara umum, gunakan antara 0,5-1 μ M) 3,5 μ M (Secara umum, gunakan antara 1-3,5 μ M)
--- μl	<i>Water reagent</i> <i>Nuclease Free</i> <i>Water/ sterile</i> ddH ₂ O	PCR Hingga 10 μ l / <i>Free</i> <i>sterile</i>

Total : 10 μ l

3.5.11.2.2 Tambahkan invert untuk mencampur semua komponen.

3.5.11.2.3 Letakkan tabung di *thermal cycler* pada suhu 70 °C selama 10 menit

3.5.11.2.4 Tabung diletakkan di atas es, invert dan berikan sedikit demi sedikit, secara berurutan komponen berikut ke dalam tabung.

Tabel 3. 3 Konversi total RNA menjadi cDNA

Volume	Reagen	Konsentrasi akhir
2 μ l	10X <i>buffer</i> for eAMV-RT	1X
1 μ l	<i>Enhanced avian RT</i>	1 unit/ μ L
1 μ l	<i>RNase inhibitor</i>	1 unit/ μ L
6 μ l	<i>Water PCR reagent / Nuclease Free Water/ sterile ddH₂O</i>	
Total : 20 μl		

3.5.11.2.5 Tabung reaksi yang telah terisi reagen diinkubasi pada suhu antara 45-50 °C selama 30 menit menggunakan mesin *PCR*.

3.5.11.2.6 Tabung dikeluarkan dari inkubator. Simpan sample yang sudah terkonversi cDNA pada suhu -20 °C.

3.5.11.3 Amplifikasi dan Kuantifikasi gen oleh qPCR

Pada qPCR dilakukan pengulangan PCR sebanyak 3 kali dari cDNA template yang sama.

3.5.11.3.1 Persiapan Master Mix

Persiapkan komponen reaksi. Cairkan dan campur semua komponen. Preparasi *Master Mix* dengan semua komponen reaksi yang umum untuk semua atau sebagian dari reaksi yang harus dilakukan. Sertakan *No Template Control* (NTC) untuk deteksi apabila adanya dekontaminasi reaksi komponen. Hitung volume yang diperlukan dari masing-masing komponen berdasarkan tabel berikut : Untuk *Master Mix qPCR Universal* (20 μ L rxn1).



Tabel 3. 4 Hitung volume yang diperlukan dari masing masing komponen

Volume	Reagen	Konsentrasi akhir
--------	--------	-------------------

-- μl	Water PCR reagent / Nuclease Free Water/ sterile ddH ₂ O	Hingga 20 μl
10 μl	KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	1X
0,4 μl	10 μM Forward Primer TGF- β (5'- CTGAACCAAGGAG ACGGAAT-3')	200 nM
0,4 μl	10 μM Reverse Primer TGF- β (5'- GGTTCATGTCATGG ATGGTG-3')	200 nM
1-5 μl (Sesuai kebutuhan)	cDNA <i>Template</i>	<20 ng
Total : 20 μl		

Transfer volume Master Mix qPCR, *template*, dan primer yang sesuai ke masing-masing sumur

plate/tabung PCR. Tutup *plate*/tabung reaksi dan *centrifuge* sebentar.

3.5.11.3.2 Prosedur RT-qPCR

Sesuaikan antara protokol qPCR yang akan digunakan dengan parameter berikut:

Tabel 3. 5 Prosedur RT-qPCR

Langkah	Temperatur	Durasi	Siklus
<i>Enzyme activation</i>	95 °C	10 menit	
<i>or (Pre Denaturati on)</i>			
<i>Denaturat ion</i>	95°C	15 detik	50
<i>Annealing</i>	57°C	1 menit	
<i>/Extensio n</i>	(tergantung pada Primer Tm)		

3.5.11.4 Penghitungan dan Analisa Data RT-qPCR

Penghitungan dan analisa data PCR dilakukan menggunakan metode ‘delta-delta Cq’ ($\Delta\Delta C_q$) dengan rumus :

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

Keterangan :

R : Rasio

$\Delta\Delta C_q$: ΔC_q Perlakuan - ΔC_q control

ΔC_q : Cq Referensi - Cq Target

Cq Referensi : *quantification cycle* gen *House Keeping*.

Cq Target : *quantification cycle* gen TGF- β .

Cq Jumlah siklus yang diperlukan agar sinyal fluoresens dapat melewati garis *threshold* (garis yang memotong *exponential phase* pada *amplification curve*)

3.6. Tempat dan Waktu Penelitian

3.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

3.6.2. Waktu Penelitian

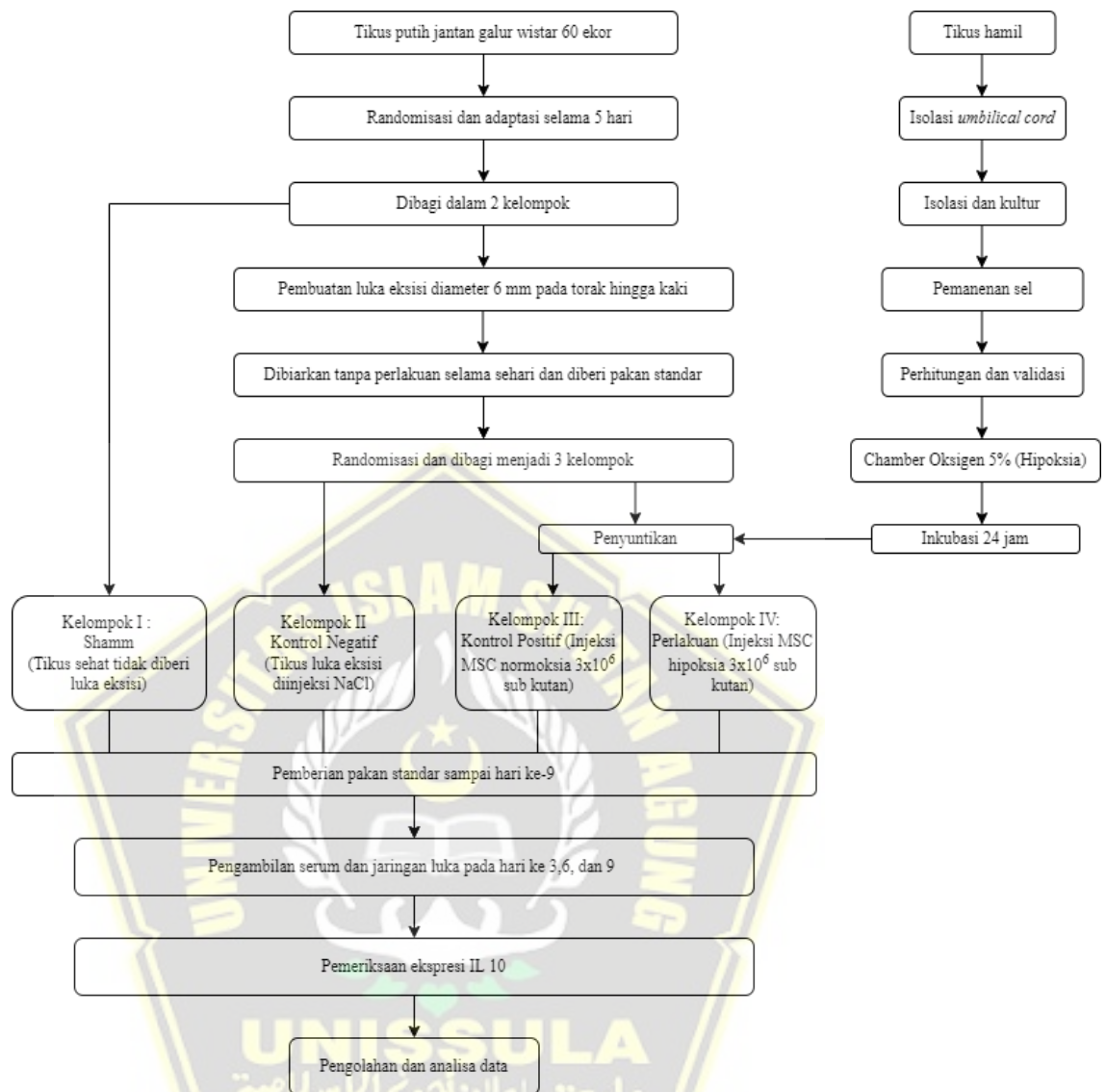
Penelitian dilakukan pada 18 Desember 2021- 14 Januari 2022.

3.7. Analisis Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene*. Dari hasil penelitian didapatkan sebaran data normal dan varian data sama, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.



3.8. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

BAB IV

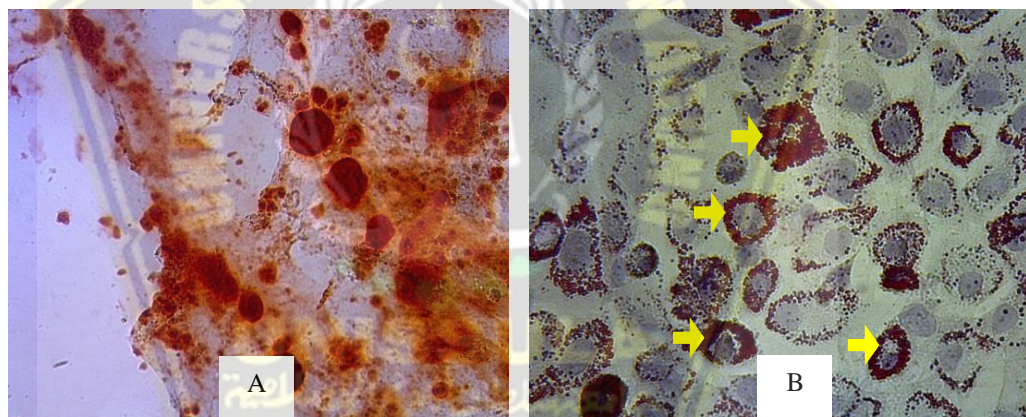
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Tujuan dari penelitian adalah mengkaji pengaruh *Mesenchymal Stem Cell hypoxic* terhadap ekspresi IL 10 pada penyembuhan luka eksisi. Studi dilakukan di Laboratorium *Stem Cell & Cancer Research (SCCR)* FK Unissula Semarang selama 30 hari. Dimulai dengan kultur sel yang diisolasi dari *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord* tikus bunting berumur 19 hari. Proses eksplorasi MSC dilakukan dengan menganalisis kemampuan diferensiasi osteogenik serta identifikasi fenotip sel menggunakan *flowcytometer*. MSC yang telah melewati proses validasi menggunakan marker CD73, CD90 dan CD105. Setelah diberi marker, selanjutnya dilakukan prosedur hipoksia dimana MSC kemudian diinkubasi ke dalam *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Pensepsi akhir yaitu melakukan pemeliharaan sel hingga MSC konfluensi mencapai 80% untuk mendapatkan MSC *hypoxic*. Pembuatan luka eksisi menggunakan 60 ekor tikus putih jantan galur wistar dengan kriteria sehat, berusia 60 hari, dan bobot 200 gram. Tikus jantan galur wistar yang sesuai kriteria ini kemudian dianestesi dan pada bagian dorsal kulit diberi perlakuan menggunakan biopsi *punch* dengan diameter 0,6 mm. Tikus yang telah diberi luka kemudian dilakukan randomisasi secara acak yang kemudian dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan: Kontrol, *Hypoxic*, dan *Normoxic* serta satu kelompok tanpa perlakuan. Kemudian, MSC diberikan melalui injeksi sub

kutan di lima tempat penyuntikan yang masing-masing berjarak 0,5 cm dari tepi luka.

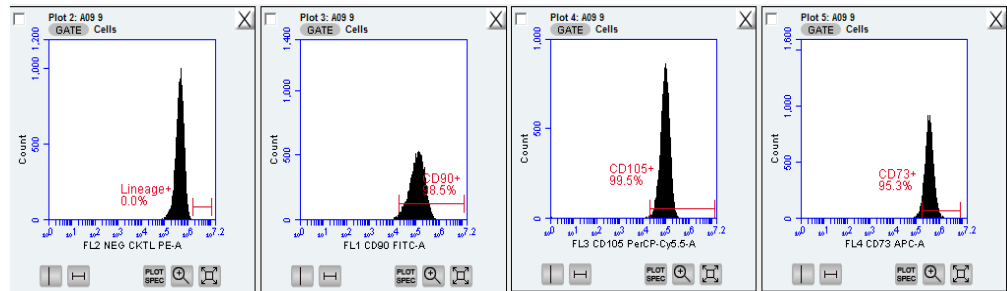
Sel yang telah tervalidasi sebagai MSC dapat menunjukkan kemampuannya diferensiasinya. Hal ini dibuktikan, dari hasil pewarnaan menggunakan Alizarin Red (Gambar 4.1) menunjukkan sel hasil isolasi mampu berdiferensiasi menjadi sel osteosit yang ditandai dengan warna merah. Kemudian, sel ini juga memenuhi kriteria dari sel punca sebab sel mampu berdiferensiasi menjadi sel adiposit (Gambar 4.1). Dari hasil pengamatan ini sel hasil isolasi diidentifikasi sebagai MSC karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca yaitu dapat diferensiasi menjadi *lineage* yang baru serta memiliki kemampuan multipotensi.



Gambar 4. 1 Kemampuan diferensiasi sel kultur (A) Sel isolasi yang telah terverifikasi sebagai MSC mampu berdiferensiasi menjadi sel osteosit dari hasil pewarnaan menggunakan Alizarin Red, (B) kemampuan multipotensi ditemukan karena sel kemudian dapat berdiferensi

Selanjutnya, validasi isolasi sel sebagai MSC yang mengekspresikan marker CD 105, CD90, dan CD73 dibuktikan lewat analisis fenotipe sel menggunakan alat *flowcytometer* (Gambar 4.2). Merujuk pada *International*

Society for Cellular Therapy (ISCT), hasil ini sesuai dengan karakteristik MSC. Berdasarkan hasil pengamatan dan analisa, sel hasil isolasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah MSC.

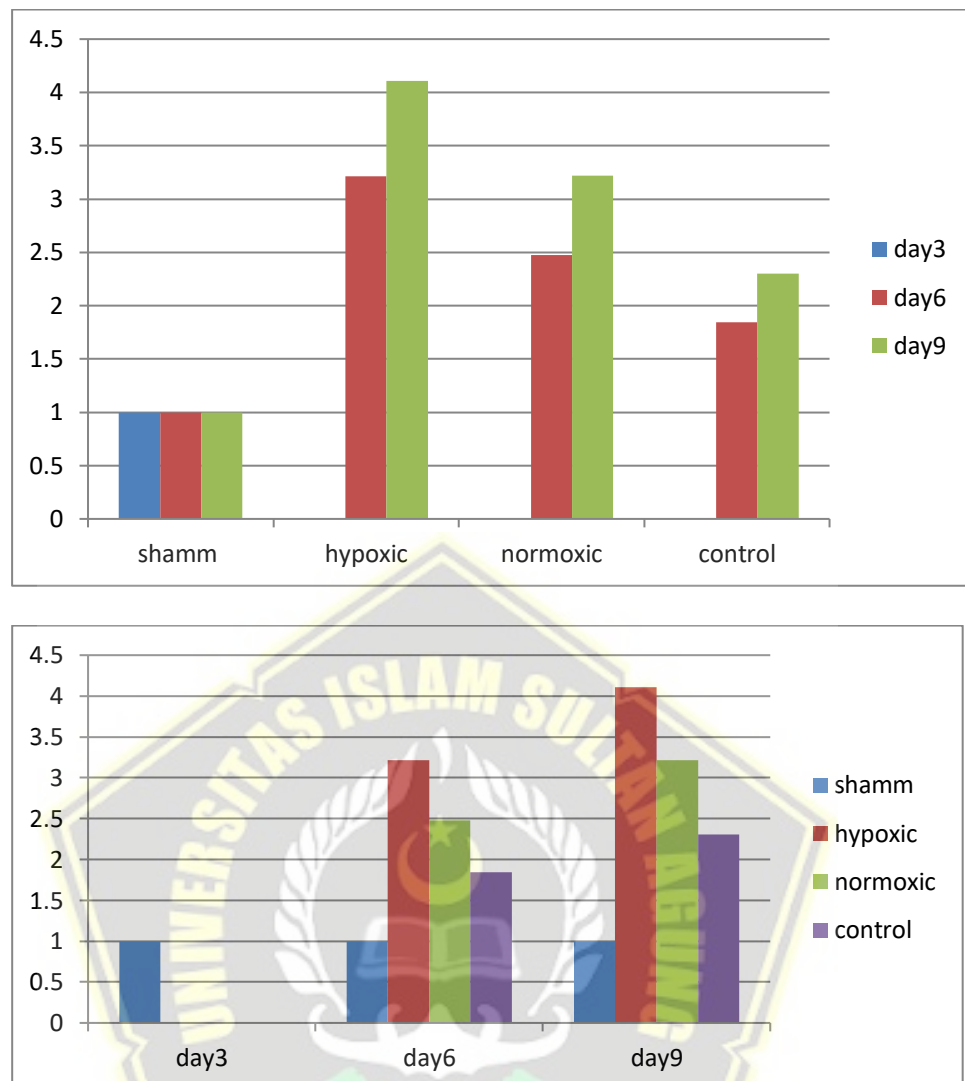


Gambar 4.1. Analisis flowcytometri ekspresi Lineage, CD73, CD90, dan CD105

Hasil analisis ekspresi IL 10 pada hari ke-3, 6, dan 9 melalui metode *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)* menggunakan alat *Eco Real-Time PCR Illumina* didapatkan data pada (Tabel 4.1)

Tabel 4. 1 Hasil Analisis RT-qPCR pada hari ke-3, 6, dan 9

No	Kelompok	Perlakuan		
		Hari ke-3	Hari ke-6	Hari ke-9
1.	Sham	1	1	1
2.	Sham	1	1	1
3.	Sham	1	1	1
4.	Hypoxic	0.00129	3.32	4.14
5.	Hypoxic	0.0012	3.2	4.04
6.	Hypoxic	0.00139	3.12	4.15
7.	Normoxic	0.00045	1.11	1.46
8.	Normoxic	0.00041	1.3	1.3
9.	Normoxic	0.00032	1.01	1.13
10.	Kontrol	0.003	1.31	1.42
11.	Kontrol	0.00312	1.21	1.3
12.	Kontrol	0.00311	1.1	1.29



Gambar 4. 3. Ekspresi IL10 Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Pada Gambar 4.3. Menunjukkan adanya ekspresi IL10 pada hari ke 3 kelompok Shamm (tanpa perlakuan). Sedangkan, pada kelompok perlakuan belum adanya ekspresi IL10. Pada hari ke 6 dan 9 didapatkan peningkatan signifikan terhadap ekspresi IL10 disemua kelompok perlakuan. Sedangkan, kelompok Shamm tidak menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL10 yang signifikan. Peningkatan ekspresi IL10 pada kelompok perlakuan hypoxic merupakan yang tertinggi diantara semua kelompok. Data yang didapat

kemudian dilakukan analisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan kelompok perlakuan dengan kelompok sham. Data yang didapat dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk*, selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian data menggunakan *Levene Test*.

Tabel 4. 2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Ekspresi IL10

	Perlakuan	Nilai P	
		Uji Shapiro Wilk	Uji Levene
IL10Day3	control	.144	.154
	hypoxic	.942	
	normoxic	.583	
IL10Day6	control	.948	.159
	hypoxic	.780	
	normoxic	.661	
IL10Day9	control	.132	.128
	hypoxic	.157	
	normoxic	.967	

Keterangan : signifikansi ($P > 0,05$)

Dari data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan SPSS 22.0 *for Windows* untuk diuji normalitasnya menggunakan uji *Shaphiro Wilk*. Berdasarkan uji tersebut, data yang digunakan dalam penelitian terdistribusi normal ($P > 0,05$) pada hari ke-3, 6, dan 9. Kemudian, setelah uji normalitas dilanjutkan uji homogenitas varian menggunakan uji Levene. Hasil uji Levene pada penelitian menunjukkan data homogen ($P > 0,05$) pada hari ke-3, 6, dan 9. Data hasil perhitungan yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya dianalisis menggunakan uji beda parametrik *one way ANOVA*. Berdasarkan analisis statistik didapatkan bahwa ekspresi IL10 menunjukkan ada beda signifikan pada hari ke-3, 6, dan 9 ($P \leq 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dilakukan uji *Post Hoc LSD*. Dari hasil pengujian,

terdapat beda signifikan pada masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke 3. Sedangkan, pada hari ke-6 kelompok perlakuan normoxic dan control maupun kelompok control dan normoxic tidak terdapat perbedaan ($P \geq 0,05$) dan pada hari ke-9 kelompok control dan normoxic maupun sebaliknya tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Tabel 4.3 Hasil uji perbedaan ekspresi IL10 dengan uji Post Hoc LSD

	Perlakuan	shamm	hypoxic	normoxic	control
IL10Day3	shamm		0,000	0,000	0,000
	hypoxic	0,000		0,000	0,000
	normoxic	0,000	0,000		0,000
	control	0,000	0,000	0,000	
IL10Day6	shamm		0,000	0,136	0,040
	hypoxic	0,000		0,000	0,000
	normoxic	0,136	0,000		0,453
	control	0,040	0,000	0,453	
IL10Day9	shamm		0,000	0,005	0,002
	hypoxic	0,000		0,000	0,000
	normoxic	0,005	0,000		0,062
	control	0,002	0,000	0,062	

Keterangan : terdapat perbedaan ($P \leq 0,05$)

4.2. Pembahasan

Saat terjadinya luka, fase awal selalu berupa homeostasis yang melibatkan drainase sistem limfatik dan darah untuk menghentikan kehilangan darah. Kemudian kaskade penyembuhan luka yang sangat terintegrasi dimulai dari perekrutan sitokin-sitokin pro inflamasi yang menyebabkan peradangan dan memulai fase inflamasi, fase inflamasi (1-3 hari), proliferasi (4–14 hari) dan remodeling (14 hari – 1 tahun) (Putra *et al.*, 2020). Transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi merupakan langkah kunci selama penyembuhan luka. Fase inflamasi sangat penting untuk

mengarah ke hemostasis dan perekrutan sistem kekebalan bawaan, yang melindungi tubuh dari serangan patogen dan membantu mengangkat jaringan mati. Peradangan yang berkepanjangan dapat menghambat tahap normal penyembuhan luka dan juga dikaitkan dengan jaringan parut yang berlebihan (Gushiken *et al.*, 2021).

Transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi merupakan langkah yang paling krusial selama proses penyembuhan luka (Xiao *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini *Mesenchymal stem cell* dikondisikan dalam kondisi hipoksik kemudian dilakukan injeksi *hypoxic MSC* di sekitar area luka untuk dapat mempercepat penyembuhan luka dengan mempersingkat masa peralihan dari fase inflamasi menuju ke fase proliferasi. *Mesenchymal stem cell* yang disuntikkan akan melakukan migrasi ke area luka (Putra *et al.*, 2019).

Menurut penelitian sebelumnya (Chen *et al.*, 2014), (Widowati, *et al.* 2017), (Peruzzaro *et al.*, 2019) dan (Putra *et al.*, 2019). Prekondisi MSC pada lingkungan hipoksia memiliki *survival chance* yang lebih tinggi pada area luka dibandingkan dengan MSC yang dikultur pada kondisi normoksia yang bersifat hipoksia. Hal ini dikarena lingkungan serta *microenvironment* jejas yang hipoksik. Pada saat kondisi hipoksia, dimana konsentrasi oksigen pada *niche* sel punca 2-9% dapat mendorong *Hypoxia-Inducible Factor 1- α* (HIF-1 α) meningkat sehingga menurunkan tingkat *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam mitokondria MSC, mengaktifkan *Nuclear Factor Kappa B* (NF κ B). HIF-1 α juga merangsang sintesis *Prion Protein Celuler Normal* (PrPC). NF κ B

dan PrPC mempromosikan ekspresi protein anti-apoptosis, memperbaiki faktor pertumbuhan, dan enzim antioksidan.

Peningkatan kemampuan MSC dalam memicu polarisasi tersebut dapat disebabkan oleh adanya lebih banyak sekresi IL10 oleh MSC akibat inkubasi pada kondisi hipoksia. Kondisi hipoksia diketahui mampu mendorong MSC untuk mensekresikan lebih banyak sitokin, termasuk IL10 (Singampalli *et al.*, 2020).

Kekurangan dari penelitian ini adalah tidak adanya data terkait IL10 yang dapat menjelaskan proses pergantian fase inflamasi menjadi fase proliferasi.



BAB V

KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian didapatkan kesimpulan bahwa

- 5.1.1.** Terdapat pengaruh Mesenchymal Stem Cell Hypoxic terhadap peningkatan ekspresi IL 10 dalam penyembuhan luka eksisi
- 5.1.2.** Adanya perbedaan ekspresi IL 10 pada kelompok tanpa perlakuan (kontrol) dengan kelompok perlakuan (injeksi MSC hypoxic). Pada kelompok perlakuan ekspresi IL 10 lebih tinggi dari kelompok kontrol.
- 5.1.3.** Pada kelompok perlakuan ditemukan adanya peningkatan ekspresi IL 10 yang signifikan. Peningkatan ekspresi IL 10 ditunjukkan pada hari ke 6 dan hari ke 9 pasca proses inflamasi, yang mengindikasikan proses inflamasi berakhir lebih cepat dari pada kelompok kontrol.

5.2. Saran

Saran yang dapat disampaikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah Penelitian selanjutnya diharapkan dapat menganalisis proses polarisasi M1 menjadi M2 pada tikus model luka eksisi agar dapat menjelaskan proses transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Chu, D. T. *et al.* (2019) 'Adipose tissue stem cells for therapy: An update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application', *Journal of Clinical Medicine*, 8(7). doi: 10.3390/jcm8070917.
- Escacena-acosta, N. *et al.* (2019) 'Stem Cells: Concept, Properties, and Characterization'. doi: 10.1007/978-3-030-01304-2.
- Ghaneialvar, H. *et al.* (2018) 'Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes', *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(1), pp. 46–52. doi: 10.1007/s12291-017-0641-x.
- Giri, J. K. (2019) 'Factors Affecting Wound Healing Dr . Jeevan Kumar Giri', (March 2018). doi: 10.13140/RG.2.2.32275.32804.
- Grubbs H, Manna B. Wound Physiology. [Updated 2021 Jun 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518964/>
- Gushiken, L. F. S. *et al.* (2021) 'Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies', *Life*, 11(7), pp. 1–15. doi: 10.3390/life11070665.
- Hamm, R. L. (2019). *Text and Atlas of Wound Diagnosis and Treatment* (2nd ed.). New York, N.Y.: McGraw-Hill Education LLC..
- Haque, N. *et al.* (2013) 'Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy', *The Scientific World Journal*, 2013. doi: 10.1155/2013/632972.
- Jeschke, M. G. *et al.* (2019) 'Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of severe burn injury', *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), pp. 1–6. doi: 10.1186/s13287-019-1465-9.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2019) 12892_Robbins_s_Basic_Pathology_9th_Ed.pdf.
- Lee, B. C. and Kang, K. S. (2020) 'Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application', *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13287-020-01920-3.
- Meng, X. *et al.* (2018) 'Hypoxia-inducible factor-1 α is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease', *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-017-02683-x.
- Nourian Dehkordi, A. *et al.* (2019) 'Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies', *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), pp. 1–20. doi: 10.1186/s13287-019-1212-2.
- O'Connor, K. (2020) 'A cautionary tale about the use of colony-forming efficiency as a proxy for the survival of mesenchymal stem cells', *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), pp. 10–12. doi: 10.1186/s13287-020-01805-5.
- Pavlovic, M. and Radotic, K. (2017) 'Animal and Plant Stem Cells: Concepts,

- Propagation and Engineering', *Animal and Plant Stem Cells: Concepts, Propagation and Engineering*, pp. 1–234. doi: 10.1007/978-3-319-47763-3.
- Putra, A. *et al.* (2019) 'Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0)', *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(3), pp. 305–310. Available at: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.049>.
- Putra, A. *et al.* (2020) 'MSC-released TGF- β regulate α -SMA expression of.pdf', 16(2), pp. 73–79.
- Riis, S. *et al.* (2017) 'Hypoxia enhances the wound-healing potential of adipose-derived stem cells in a novel human primarykeratinocyte-based scratch assay', *International Journal of Molecular Medicine*, 39(3), pp. 587–594. doi: 10.3892/ijmm.2017.2886.
- Shammaa, R. *et al.* (2020) 'Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(February), pp. 1–17. doi: 10.3389/fcell.2020.00072.
- Singampalli, K. L. *et al.* (2020) 'The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(July), pp. 1–15. doi: 10.3389/fcell.2020.00636.
- Sylakowski, K., Bradshaw, A. and Wells, A. (2020) 'Mesenchymal Stem Cell/Multipotent Stromal Cell Augmentation of Wound Healing: Lessons from the Physiology of Matrix and Hypoxia Support', *American Journal of Pathology*, 190(7), pp. 1370–1381. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.03.017.
- Tottoli, E. M. *et al.* (2020) 'Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration', *Pharmaceutics*, 12(8), pp. 1–30. doi: 10.3390/pharmaceutics12080735.
- Ullah, M., Liu, D. D. and Thakor, A. S. (2019) 'Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement', *iScience*, 15, pp. 421–438. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.004.
- Vasanthan, J. *et al.* (2021) 'Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy', *Cells*, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.3390/cells10010054.
- Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Wound Healing Phases. [Updated 2021 Nov 15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>
- Widowati, W. *et al.* (2017) 'Hypoxia in Mesenchymal Stem Cell', *Hypoxia and Human Diseases*. doi: 10.5772/65510.
- Xiao, S. *et al.* (2019) 'IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects', *Stem Cells International*, 2019. doi: 10.1155/2019/9158016.
- Xu, W. *et al.* (2019) 'Hypoxia changes chemotaxis behaviour of mesenchymal stem cells via HIF-1 α signalling', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(3), pp. 1899–1907. doi: 10.1111/jcmm.14091.

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019) 'Fuel Cells: Past, Present and Future', *IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials*, 128(5), pp. 329–332. doi: 10.1541/ieejfms.128.329.

