

**PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP
EKSPRESI GEN IL-10 DAN STAT3**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Betina Galur *Wistar* Model
Polycystic Ovary Syndrome)**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S2



Magister Ilmu Biomedik

**Lusiana
MBK 22.19.01.0285**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2023**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN STAT3**

**(Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Betina Galur Wistar Model
Polycystic Ovary Syndrome)**

Disusun oleh

Lusiana

MBK 22.19.01.0285

Akan dipertahankan di depan Tim Penguji

Pada tanggal 9 September 2023

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I



Dr. dr. Dewi Masyithah Darlan, DAP&E, Sp. Park
NIP. 197407302001122003

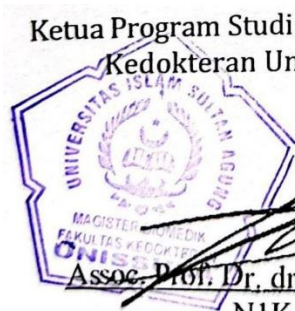
Pembimbing II



Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KF
NIK. 210199049

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas
Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



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

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Lusiana

Tempat/tanggal lahir : Tangerang, 10 Agustus 1982

Agama : Katholik

Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Cikupa IV, Tangerang : Lulus tahun 1993
2. SMPN 1 Cikupa, Tangerang : Lulus tahun 1996
3. SMA BKKK, Tangerang : Lulus tahun 1999
4. S1 FK Tarumanagara, Jakarta : Lulus tahun 2004
5. Profesi Dokter FK Tarumanagara, Jakarta : Lulus tahun 2007
6. Magister Biomedik FK Unissula : 2022 - sekarang

C. Riwayat Keluarga

Nama Suami : Tonni Wijaya, SE

Nama Anak : Evangeline Lunita

Maximilian Marvel Chang

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 11 September 2023



Lusiana

KATA PENGANTAR

Puji syukur keadilat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan proposal tesis dengan judul **PENGARUH PEMBERIAN SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN STAT3 (Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Betina Galur Wistar Model *Polycystic Ovary Syndrome*)**

Pada penyusunan proposal tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pada yang terhormat :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Associate Prof. DR. dr. H. Agung Putra., M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu yang telah berkenan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan proposal tesis ini.

4. Dr. dr. Dewi Masyithah Darlan, DAP&E, Sp. Park selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KF selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
6. Associate Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M,Si. Med selaku penguji yang telah berkenan menguji dan selalu memberikan saran kritik membangun dalam penyusunan proposal tesis ini.
7. Prof. Dr. dr. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku penguji yang telah berkenan menguji dan selalu memberikan saran kritik membangun dalam penyusunan proposal tesis ini.
8. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M. Kes selaku penguji yang telah berkenan menguji dan selalu memberikan saran kritik membangun dalam penyusunan proposal tesis ini.
9. Pada dosen pengajar dan rekan – rekan staf Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu – satu yang telah memberikan doa dan dorongan kepada penyusun.
10. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga proposal tesis ini dapat terselesaikan.

11. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan proposal tesis yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Manusia tidak luput dari kesalahan karena tidak ada manusia yang sempurna, untuk itu penyusun berharap dengan semua kekurangan dalam penulisan proposal tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta bagi pihak – pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua, amin



Semarang, Maret 2023

(Lusiana)

ABSTRAK

Latar Belakang: *Polycystic ovary syndrome* (PCOS) adalah suatu kondisi anovulasi kronis, inflamasi dan hiperandrogenisme yang menyebabkan infertilitas. SH-MSCs dapat menghambat respon inflamasi melalui peningkatan ekspresi IL-10 dan menghambat sekresi androgen pada tikus model PCOS. **Tujuan:** Membuktikan pengaruh pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus model PCOS.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* dengan desain penelitian *Post test Only Control Group Design*. Jumlah sampel 24 ekor tikus betina wistar, dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok K1 (tikus sehat), kelompok K2 (tikus PCOS diinjeksi NaCL 0,9%), kelompok K3 (tikus PCOS diberikan Sekretom dosis 200 µl) dan kelompok K4 (tikus PCOS diberikan Sekretom dosis 400 µl) yang diberikan perlakuan selama 33 hari. Ekspresi gen IL-10 dan STAT3 diuji menggunakan uji *Post Hoc LSD dan Post Hoc Tamhane*.

Hasil: Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen IL-10 dan STAT3 terdapat perbedaan pada kelompok K4 dibanding K2 sig. ($p = 0,001$) dan ada beda ekspresi gen IL-10 pada kelompok K4 dibanding K2 sig. ($p = 0,014$), serta terdapat perbedaan pada ekspresi gen STAT3 kelompok K4 dibanding K2 sig. ($p = 0,007$) setelah diberikan perlakuan.

Kesimpulan: Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus model PCOS.

Kata Kunci: Sel Punca Mesenkimal, Hipoksia, Ekspresi gen IL-10, Ekspresi gen STAT3

ABSTRACT

Background: *Polycystic ovary syndrome* (PCOS) is a condition of chronic anovulation, inflammation and hyperandrogenism which causes infertility. SH-MSCs can inhibit the inflammatory response by increasing IL-10 expression and inhibiting androgen secretion in PCOS model mice. **Objective:** To prove the effect of administration of Hypoxic Mesenchymal Stem Cell Secretome on IL-10 and STAT3 gene expression in PCOS model mice.

Method: In vivo experimental research with a post test only control group design. The total sample was 24 wistar female rats, divided into four groups. K1 group (healthy rats), K2 group (PCOS rats were injected with 0.9% NaCL), K3 group (PCOS rats were given Secretome at a dose of 200 µl) and K4 group (PCOS rats were given Secretome at 400 µl) and treated for 33 days. IL-10 and STAT3 gene expression was tested using Post Hoc LSD and Post Hoc Tamhane.

Results: This study showed that the expression of the IL-10 and STAT3 genes was different in the K4 group compared to the K2 sig. ($p = 0.001$) and there was a difference in IL-10 gene expression in K4 group compared to K2 sig. ($p = 0.014$), and there were differences in the expression of the STAT3 gene in the K4 group compared to K2 sig. ($p = 0.007$) after being given treatment.

Conclusion: Administration of Hypoxic Mesenchymal Stem Cell Secretomes had an effect on increasing IL-10 and STAT3 gene expression in PCOS rat models.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Hypoxia, IL-10 gene expression, STAT3 gene expression.

DAFTAR ISI

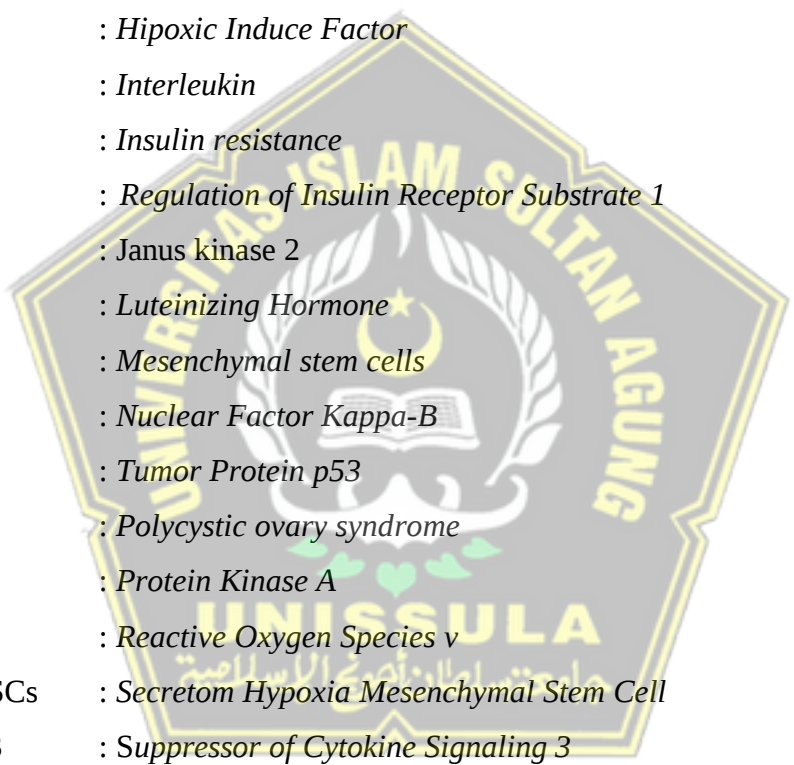
TESIS	i
RIWAYAT HIDUP	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Penelitian.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.2.1 Umum.....	4
1.2.2 Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Teoritis	4
1.4.2 Praktis.....	4
1.5 Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Ekspresi Gen IL-10.....	8

2.2 Ekspresi Gen STAT3.....	9
2.3 Sel Punca Mesenkimal (<i>Mesenchymal Stem Cell</i>)	11
2.4 Hipoksia	14
2.5 Sekretom <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	14
2.6 <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>	15
2.7 Pengaruh SH-MSCs Terhadap Ekspresi Gen IL-10 dan STAT3 pada Tikus Model PCOS	18
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	21
3.1. Kerangka Teori.....	21
3.2 Kerangka Konsep	23
3.3 Hipotesis	24
BAB IV METODE PENELITIAN.....	25
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	25
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	26
4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	28
4.3.1 Subyek Penelitian	28
4.3.2 Sampel Penelitian	28
4.4 Teknik Pengambilan Sampel	29
4.4.1 Besar Sampel.....	29
4.5 Alat dan Bahan.....	30
4.6 Cara Penelitian	31
4.7 Tempat dan Waktu Peneltian	40
4.8 Analisa Data.....	41
4.9 Alur Penelitian	43
BAB V	44
HASIL DAN PEMBAHASAN	44

5.1 HASIL PENELITIAN	45
5.1.1 Isolasi Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells.....	45
5.1.2 Validasi Hewan Coba PCOS secara Makroskopik	48
5.1.3 Validasi Hewan Coba PCOS dengan Hematoksilin Eosin.....	49
5.1.4 Validasi Hewan Coba dengan Siklus Estrus	49
5.1.5 Validasi Hewan Coba dengan testosterone	51
5.1.6 Efek pemberian sekretom SPM hipoksia dosis 200 μ dan III pada kadar IL-10 dan STAT3.....	52
5.2 Pembahasan Hasil Penelitian	57
BAB VI.....	61
KESIMPULAN DAN SARAN	61
6.1 Kesimpulan	61
6.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	71



DAFTAR SINGKATAN



AMH	: <i>Anti Mullerian Hormone</i>
CREB	: <i>cAMP Respons Binding Protein</i>
DHEA	: <i>Dehydroepiandrosterone</i>
FSH	: <i>Follicle stimulating hormone</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IR	: <i>Insulin resistance</i>
IRS1	: <i>Regulation of Insulin Receptor Substrate 1</i>
JAK-2	: <i>Janus kinase 2</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal stem cells</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
P53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PCOS	: <i>Polycystic ovary syndrome</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
SH-MSCs	: <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
SOCS3	: <i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
T	: <i>Testosteron</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TH	: <i>Sel T-helper</i>

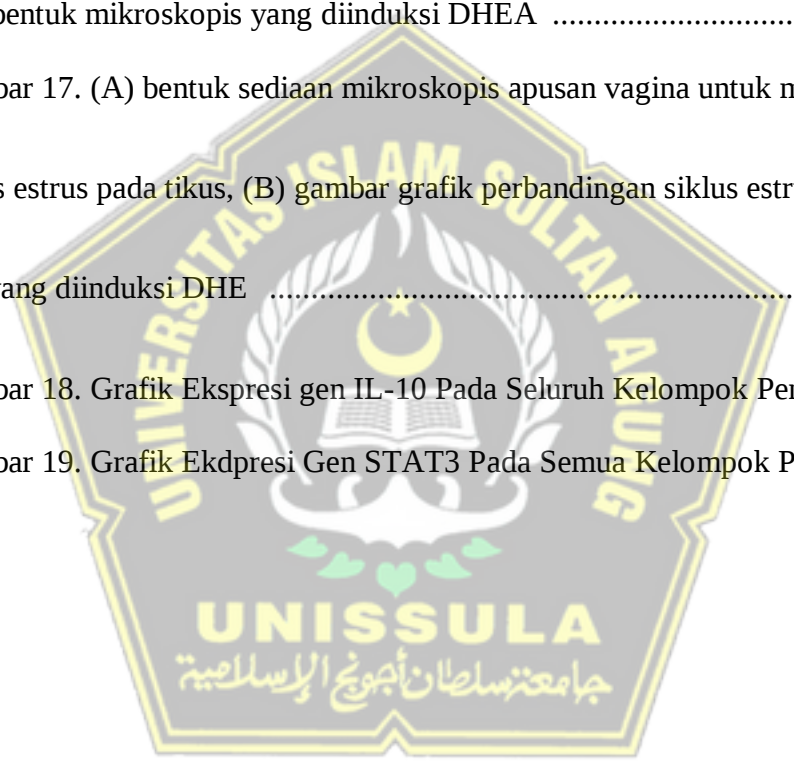
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
 α SMA : *Alpha Smooth Muscle Actin*



DAFTAR GAMBAR

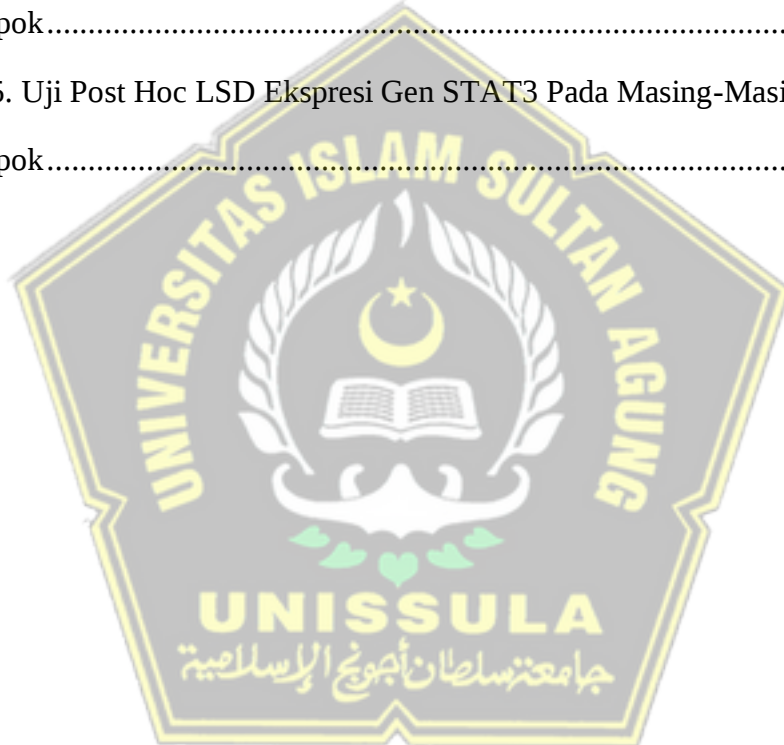
Gambar 1. Mekanisme interaksi antara PCOS dengan sitokin proinflamasi	9
Gambar 2. Mekanisme molekul STAT3 dalam PCOS	11
Gambar 3. Sumber mesenchymal stem cell(MSCs)	12
Gambar 4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs.....	13
Gambar 5. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs	14
Gambar 6. Model hubungan kompleks antara factor genetik dan lingkungan terhadap kejadian PCOS	16
Gambar 7. Patofisiologi PCOS	17
Gambar 8. Kerangka Teori	23
Gambar 9. Kerangka Konsep	23
Gambar 10. Skema Rancangan Penelitian.....	25
Gambar 11. Isolasi SH-MSCs dengan sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.....	63
Gambar 12. Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31	64
Gambar 13. (A) SH-MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan <i>alizarin red</i> dan <i>oil red</i> pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam)	65

Gambar 14. (A) morfologi MSCs sebelum dikultur pada kondisi hipoksia,	
(B) morfologi MSCs setelah dikultur pada kondisi hipoksia	66
Gambar 15. (A) bentuk makroskopis ovarium yang tidak diberi induksi	
DHEA, (B) bentuk makroskopis yang diinduksi DHEA	68
Gambar 16. A) bentuk mikropkopis ovarium yang tidak diberi induksi DHEA,	
(B) bentuk mikroskopis yang diinduksi DHEA	68
Gambar 17. (A) bentuk sediaan mikroskopis apusan vagina untuk menilai	
siklus estrus pada tikus, (B) gambar grafik perbandingan siklus estrus sehat	
dan yang diinduksi DHE	69
Gambar 18. Grafik Ekspresi gen IL-10 Pada Seluruh Kelompok Penelitian.....	69
Gambar 19. Grafik Ekdpresi Gen STAT3 Pada Semua Kelompok Penelitian ..	70



DAFTAR TABEL

Tabel 1 Konsentrasi sitokin dan factor pertumbuhan pada SH-MSCs	67
Tabel 2. Konsentrasi Testosteron Tikus Validasi.....	70
Tabel 3. Data Hasil Penelitian Ekspresi gen IL-10 dan STAT3	70
Tabel 4. Uji Post Hoc Tamhane Ekspresi Gen IL-10 Pada Masing-Masing Kelompok.....	73
Tabel 5. Uji Post Hoc LSD Ekspresi Gen STAT3 Pada Masing-Masing Kelompok.....	75



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Kegiatan Penelitian	71
Lampiran 2. Ethical Clearance	72
Lampiran 3. Lembar persetujuan revisi tesis	73
Lampiran 4. Surat Keterangan penelitian	74



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Polycystic ovary syndrome (PCOS) adalah suatu kondisi anovulasi kronis dan hiperandrogenisme yang umumnya menyebabkan infertilitas.¹ PCOS dikaitkan erat dengan inflamasi kronis yang dipicu oleh glukosa dan lemak jenuh sehingga menyebabkan hiperandrogenisme.² Kondisi inflamasi memicu peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) yang mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor kappa beta* (NF-KB) sehingga terjadi penekanan ekspresi molekul anti-inflamasi seperti interleukin-10 (IL-10).³ Penurunan ekspresi IL-10 menghambat fosforilasi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) sehingga mencegah ekspresi *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) yang akhirnya menginduksi pelepasan sitokin pro-inflamasi.⁴ Kondisi hiperinflamasi ini meningkatkan keparahan hiperandrogenisme pada PCOS.⁵ Hingga saat ini lini pertama penanganan PCOS masih mengandalkan terapi hormon, yang tidak efektif.⁶ Oleh karena itu, pendekatan terapi yang aman dan efektif diperlukan untuk penanganan PCOS,

salah satunya menggunakan *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).

PCOS terbukti mempengaruhi kualitas hidup pasien dan salah satu penyebab infertilitas akibat faktor ovarium.⁶ Prevalensi PCOS sekitar 4-15% pada wanita usia reproduksi.⁷ Lebih dari 80% wanita PCOS memiliki ketidakseimbangan endokrin yang ditandai dengan hiperandrogenisme yang menyebabkan infertilitas.⁸ Pada tahun 2015, angka infertilitas akibat PCOS meningkat hingga 72%.⁹ PCOS dianggap terkait dengan kondisi inflamasi kronis yang menyebabkan gangguan fungsi ovarium normal.² Berbagai penelitian tersebut menunjukkan dibutuhkan terapi alternatif untuk penanganan PCOS.

Studi preklinis menunjukkan bahwa SH-MSCs mengandung berbagai sitokin anti-inflamasi, seperti *interleukin-10* (IL-10), *transforming growth factor* (TGF- β), dan VEGF¹⁰ yang dapat memicu efek anti-inflamasi dan immunosupresive.¹¹ SH-MSCs berasal dari prekondisi hipoksia pada medium kultur MSCs dan telah melalui proses filtrasi menggunakan teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF)¹⁰. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *human bone marrow mesenchymal stem cells* menurunkan inflamasi dan mendown regulasi *steroidogenic* pada PCOS dengan meningkatkan kadar IL-10.¹² Pada model tikus PCOS mengalami penurunan androgenisme dengan menginduksi STAT3 melalui jalur IL-10/IL-10R.^{4,13} Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa MSCs menurunkan ekspresi marker inflamasi pada PCOS.¹⁴ Secretom MSCs menghambat peradangan dan apoptosis, mengatur steroidogenesis, dan

menghambat produksi androgen secara *in vitro* dan *in vivo* pada ovarium model PCOS.¹⁵

IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang berperan dalam meningkatkan aktivitas fosforilasi pensinyalan STAT3 dalam mencegah pembentukan sitokin pro-inflamasi.^{16,17} STAT-3 memiliki peran penting dalam respons anti inflamasi yang dimediasi IL-10 melalui SOCS3.¹⁸ Adanya peningkatan ROS pada PCOS ditandai dengan stimulasi interleukin-6 (IL-6), yang mencegah aktivasi STAT3 sehingga menjadi inflamasi kronis.¹⁹ Pada tahap awal PCOS, STAT3 berperan pada regulasi dari aktivasi sel imun, peningkatan ekspresi mediator inflamasi dan meningkatkan stres oksidatif yang mengakibatkan kerusakan sel ovarium.^{13,20}

Berbagai penelitian melaporkan bahwa secretome MSCs mampu menekan sekresi sitokin pro-inflamasi dan *growth factor*.²¹ Pemberian secretome MSCs dapat menghambat respon inflamasi melalui peningkatan ekspresi IL-10 pada tikus model PCOS.^{12,22} Pemberian secretom MSCs menghambat sekresi androgen pada model sel PCOS.²³ Namun, pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus model PCOS masih sedikit diteliti. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus galur wistar model PCOS.

1.2 Rumusan Penelitian

Apakah terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-

10 dan STAT3 pada tikus galur *Wistar* model PCOS?

1.3 Tujuan Penelitian

1.2.1 Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus galur *Wistar* model PCOS.

1.2.2 Khusus

1. Untuk membuktikan dan menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi IL-10 pada tikus model PCOS yang diberi SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan 400 μ L pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.
2. Untuk membuktikan dan menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi STAT3 pada tikus model PCOS yang diberi SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan 400 μ L pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada perbaikan kondisi PCOS.

1.4.2 Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan SH-MSCs dalam penanganan kasus infertilitas terutama PCOS.

1.5 Originalitas Penelitian

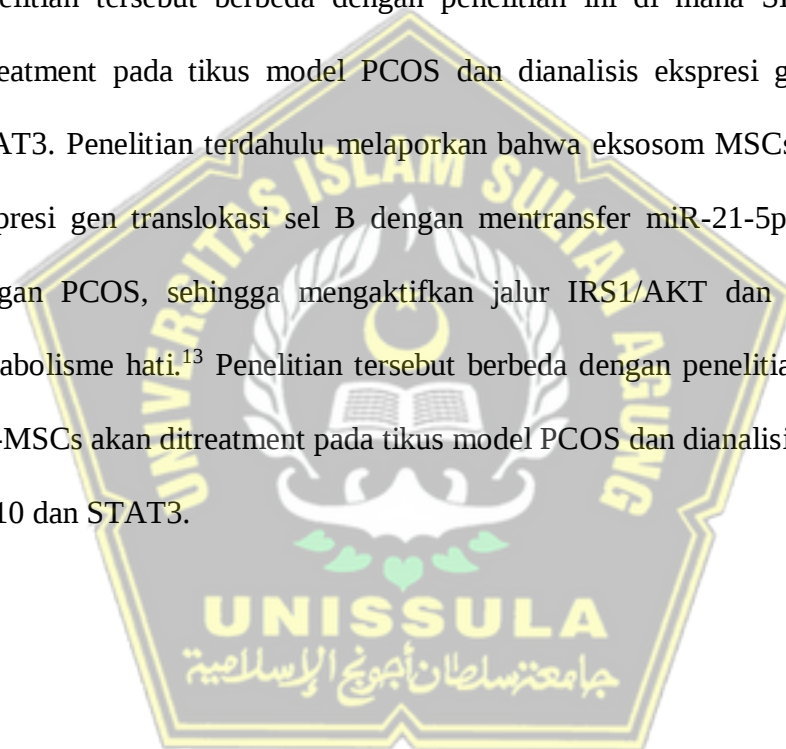
Tabel 1. Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy ²⁴	<i>Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility</i>	Eksperimental case report	Pemberian MSCs dapat meregulasi miRNA untuk meningkatkan gen reproduksi wanita
Chugh RM, Park HS, Esfandyari S, Elsharoud A, Ulin M, Al-Hendy A ²³	<i>Mesenchymal stem cell-conditioned media regulate steroidogenesis and inhibit androgen secretion in a PCOS cell model via BMP-2.</i>	Eksperimental in vitro	Pemberian secretom MSCs menghambat sekresi androgen pada sel model PCOS melalui BMP-2.
Chugh RM, Park HS, El Andaloussi A, Elsharoud A, Esfandyari S, Ulin M, Bakir L, Aboalsoud A, Ali M, Ashour D, Igboeli P ¹²	<i>Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10.</i>	Eksperimental in vivo	MSCs secara signifikan menurunkan ekspresi gen steroidogenik, menghambat peradangan, dan memulihkan kesuburan pada hewan PCOS. Efek antiinflamasi IL-10 memainkan peran utama dalam memediasi efek MSC dalam model PCOS.
Li Y, Guo J, Deng S, Gao Z, Liu Y, Gu Q ²⁵	<i>Fibrin Facilitates Mesenchymal Stem Cells to Ameliorate Rats with Polycystic</i>	Eksperimental in vivo	MSCs meregulasi estradiol dan progesteron, berkurangnya kadar gonadotropin (LH/FSH), testosteron (T), dan TGF- β 1, siklus estrus yang

	<i>Ovary Syndrome</i>		teratur, peningkatan jumlah sel granulosa, dan berkurangnya jumlah folikel kistik yang belum matang.
Cao M, Zhao Y, Chen T, Zhao Z, Zhang B, Yuan C, Wang X, Chen L, Wang N, Li C, Zhou X ¹³	<i>Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs ameliorate polycystic ovary syndrome by protecting against metabolic disturbances.</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Eksosom MSCs menghambat ekspresi gen translokasi sel B dengan mentransfer miR-21-5p ke hati tikus dengan PCOS, sehingga mengaktifkan jalur IRS1/AKT dan meningkatkan metabolisme hati.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian MSCs dapat meregulasi miRNA untuk meningkatkan gen reproduksi wanita.²⁴ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus model PCOS dan dianalisis ekspresi gen IL-10 dan STAT3. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian secretom MSCs menghambat sekresi androgen pada sel model PCOS melalui BMP-2.²³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus model PCOS dan dianalisis ekspresi gen IL-10 dan STAT3. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa MSCs secara signifikan menurunkan ekspresi gen steroidogenik, menghambat peradangan, dan memulihkan kesuburan pada hewan PCOS. Efek antiinflamasi IL-10 memainkan peran utama dalam memediasi efek MSC dalam model PCOS.¹² Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana SH-

MSCs akan ditreatment pada tikus model PCOS dan dianalisis ekspresi gen IL-10 dan STAT3. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa MSCs meregulasi estradiol dan progesteron, berkurangnya kadar gonadotropin (LH/FSH), testosteron (T), dan TGF- β 1, siklus estrus yang teratur, peningkatan jumlah sel granulosa, dan berkurangnya jumlah folikel kistik yang belum matang.²⁵ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus model PCOS dan dianalisis ekspresi gen IL-10 dan STAT3. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa eksosom MSCs menghambat ekspresi gen translokasi sel B dengan mentransfer miR-21-5p ke hati tikus dengan PCOS, sehingga mengaktifkan jalur IRS1/AKT dan meningkatkan metabolisme hati.¹³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini di mana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus model PCOS dan dianalisis ekspresi gen IL-10 dan STAT3.



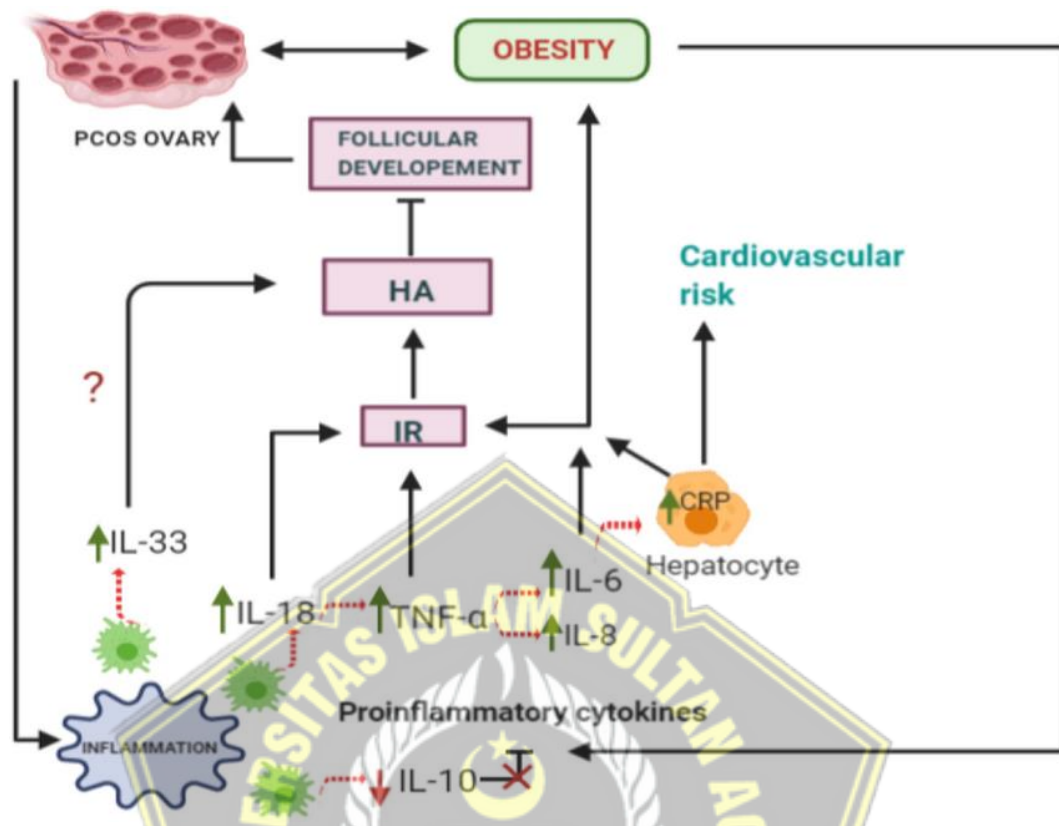
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ekspresi Gen IL-10

Interleukin-10 (IL-10) adalah sitokin anti-inflamasi yang memainkan peran penting dalam pengaturan kekebalan dan peradangan. Gen IL-10 manusia terletak pada kromosom 1 dan terletak pada persimpangan antara 1q31 dan 1q32. IL-10 adalah sitokin antiinflamasi utama yang telah dikaitkan dengan obesitas dan diabetes melitus tipe 2 sebagai sindrom resistensi insulin.²⁶ Pasien PCOS sering kali resisten terhadap insulin dan oleh karena itu mengalami hiperinsulinemia, yang tampaknya memainkan peran patogenik pada penyakit ini.²⁷ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa penurunan kadar IL-10 berkontribusi terhadap inflamasi ringan kronis yang terjadi pada PCOS.²⁸ Penulis lain juga menyatakan bahwa pengaturan jalur sinyal IL-10 dapat menjadi potensi terapeutik dalam mengelola inflamasi yang terkait dengan PCOS.²⁷

IL-10 pertama kali diidentifikasi sebagai anggota sel TH2 dan memblokir aktivitas anggota sel TH1.²⁹ IL-10 terbukti dapat mengurangi aktivitas sel TH1 sehingga dapat mempertahankan kehamilan akibat mensintesis progesteron dan pematangan korpus luteum.³⁰ Konsentrasi IL-10 yang rendah terkait dengan sindrom metabolik dan obesitas. Pengurangan IL-10 plasma terlihat pada pasien PCOS. Peningkatan IL-10 mengurangi aktivitas sel dendritik dan mengganggu folikulogenesis sehingga tidak terjadi PCOS (Gambar 1).³¹



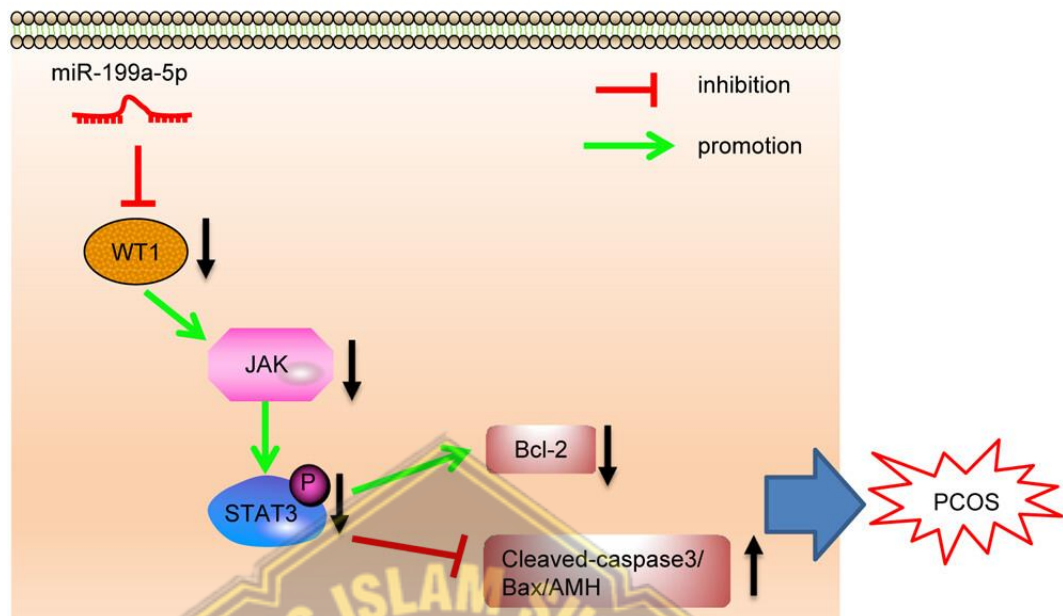
Gambar 1. Mekanisme interaksi antara PCOS dengan sitokin proinflamasi³¹

2.2 Ekspresi Gen STAT3

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) adalah jalur penting dalam pengaturan transportasi nutrisi plasenta dan pertumbuhan janin. STAT3 diaktifkan oleh berbagai faktor, termasuk leptin dan sitokin.³² Fosforilasi janus kinase 2 (JAK-2) dan STAT-3 menyebabkan dimerisasi STAT3 dan translokasi nuklir, yang menghasilkan transkripsi yang dimediasi oleh STAT3 dari gen target. JAK2 dan STAT3 memiliki banyak efek biologis.^{33,34} Jalur pensinyalan p-JAK2 / p-STAT3 diaktifkan oleh STAT3 dan dinonaktifkan oleh *suppressors of cytokine signaling* (SOCS). Aktivasi yang menyimpang dari jalur pensinyalan JAK2 / STAT3 telah terlibat dalam pengembangan berbagai penyakit, seperti

iskemia miokard, obesitas, diabetes, dan tumor.³⁵ Bukti terbaru menunjukkan bahwa jalur JAK/STAT intraovarian mungkin terlibat dalam perkembangan folikel.³⁶

Selama timbulnya PCOS, penghambatan miR-199a-5p memicu aktivasi jalur JAK/STAT3 dengan menargetkan WT1, sehingga menghambat apoptosis GC ovarium (Gambar 2.2). Menargetkan pada jalur tersebut berpotensi menjadi target terapi yang menjanjikan untuk PCOS. DHEA, salah satu androgen yang paling banyak beredar di PCOS, banyak digunakan dalam pengembangan model hewan pengerat yang menampilkan fitur-fitur signifikan yang biasa diamati pada pasien PCOS. Namun, model hewan yang lebih baik dari PCOS harus dipertimbangkan karena model PCOS yang diinduksi DHEA tidak cukup untuk eksplorasi kelainan metabolisme seperti resistensi insulin.³⁷ Lingkungan mikro yang kompleks, mungkin ada molekul lain yang tunduk pada regulasi langsung oleh miR-199a-5p, yang memerlukan penyelidikan lebih lanjut. Penelitian tambahan juga diperlukan untuk model hewan lain untuk memvalidasi temuan tersebut dan uji klinis diperlukan untuk menguji potensi aplikasi klinis terapi yang ditargetkan miR-199a-5p pada PCOS manusia.³⁸



Gambar 2. Mekanisme molekul STAT3 dalam PCOS³⁸

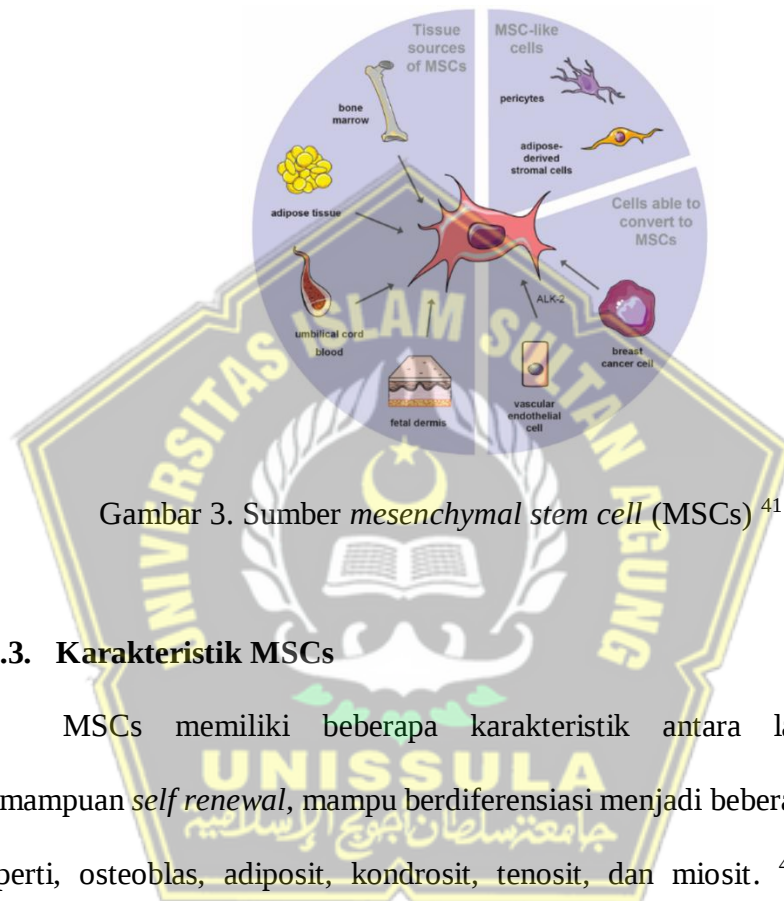
2.3 Sel Punca Mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cell*)

2.3.1. Definisi

Mesenchymal stem cells (MSCs) memiliki sifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit. *Mesenchymal stem cells* dapat diisolasi dari beberapa jaringan, seperti jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat.³⁹ MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotip, MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCS tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenic.⁴⁰

2.3.2. Sumber MSCs

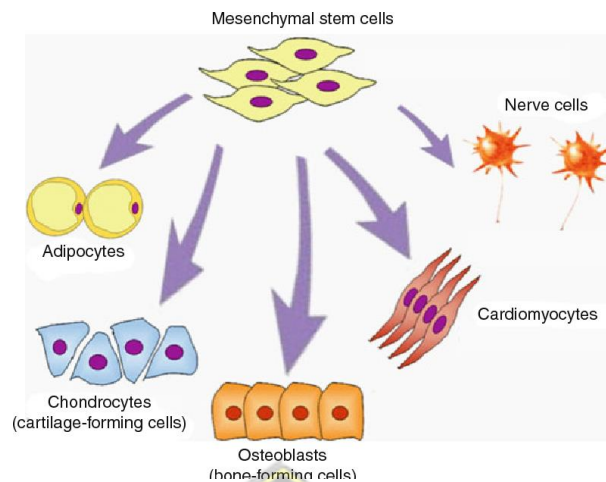
MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthon jelly* dari tali pusat, dan plasenta ³⁹.



Gambar 3. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs) ⁴¹

2.3.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit. ⁴² MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator sehingga mampu mengeksresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit. ⁴³



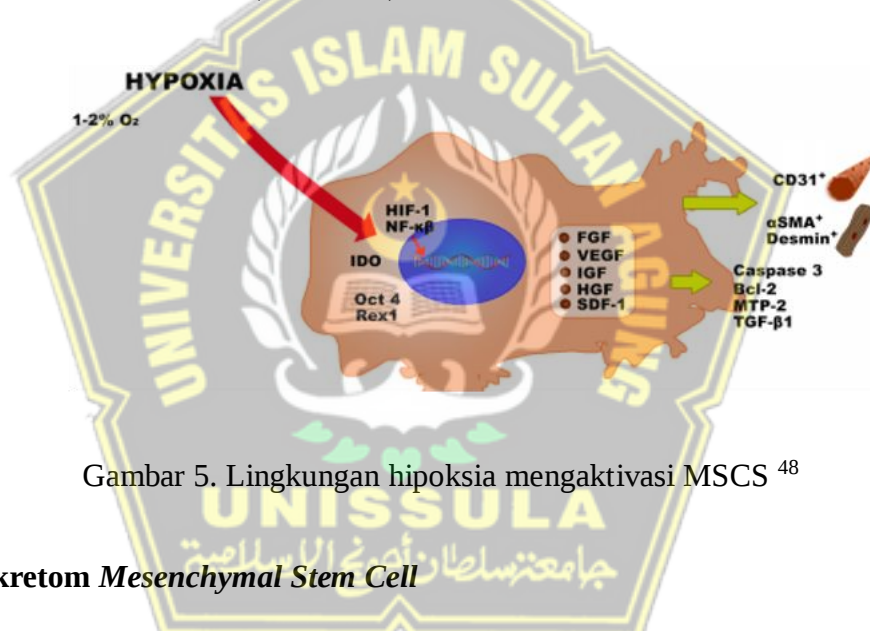
Gambar 4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁴⁴

2.3.4. Peran MSCs

Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berhubungan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 membantu memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Sehingga proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi. ^{45,46}

2.4 Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia memiliki sifat merusak bagi beberapa jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, *self renewal*, dan pelekatan MSCs.⁴⁷ Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs (Gambar 5).



Gambar 5. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS⁴⁸

2.5 Sekretom Mesenchymal Stem Cell

MSCs mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut sekretom, biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *growth factor* (GF), hormon, eksosom, mikrovesikel, faktor antiinflamasi dll.^{49,50} Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel. Salah satu sitokin yang bertanggung jawab dalam regenerasi kulit yaitu TGFβ.⁵¹ TGFβ memiliki peran kunci dalam regulator sintesis prokolagen I.⁵² TGFβ secara

signifikan terbukti menginduksi produksi α -SMA. TGF β juga menginduksi produksi kolagen.^{52,53} Disisi lain TGF β menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan kolagen teraktivasi.⁵⁴ Secretom memiliki kandungan IL-10 yang tinggi sehingga dapat menghambat produksi ROS dan menurunkan inflamasi dan aktivasi p53.^{55,56}

2.6 Polycystic Ovary Syndrome

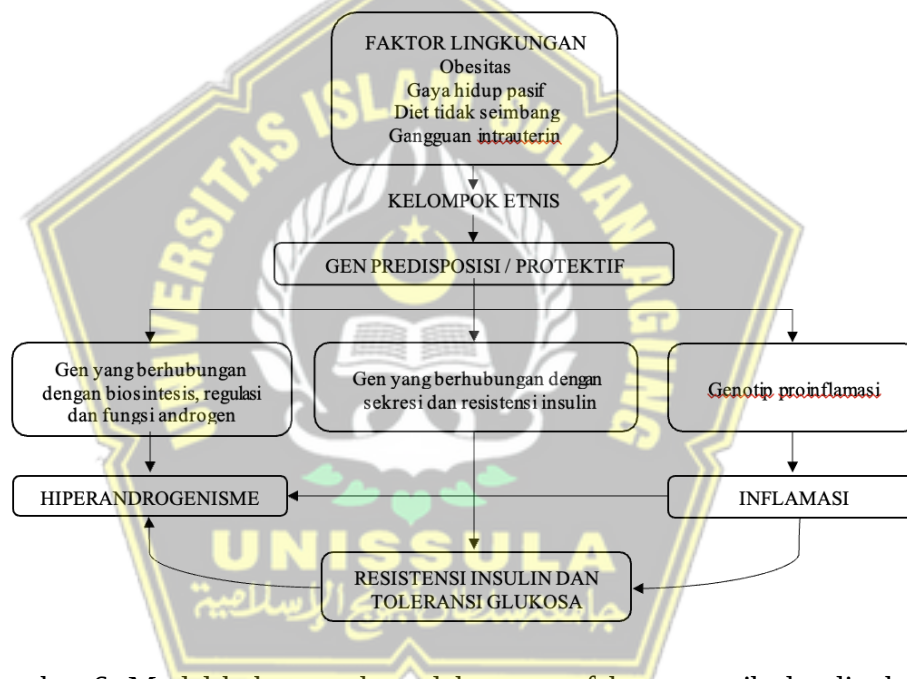
Polycystic ovary syndrome (PCOS) adalah gangguan endokrin yang *heterogeny* dan kompleks, yang etiologinya tidak diketahui. Stein dan Leventhal, pertama kali menjelaskan PCOS pada tahun 1935 sebagai kelompok gejala yang terdiri dari hirsutisme, amenore, pembesaran ovarium, dan obesitas; istilah ‘sindrom ovarium polikistik’ kemudian diperkenalkan meskipun nama sindrom Stein-Leventhal masih diterima.⁵⁷

Ovarium polikistik dapat dideteksi pencitraan panggul seperti USG atau bentuk lain, dengan 20-33% perkiraan prevalensi pada populasi. Akan tetapi, tidak semua wanita dengan ovarium polikistik menunjukkan gambaran klinis dan biokimia yang menentukan sindrom tersebut. Meskipun saat ini jelas bahwa USG memberikan teknik yang sangat baik untuk mendeteksi morfologi ovarium polikistik, namun identifikasi ovarium polikistik dengan USG tidak secara otomatis memberikan diagnosis PCOS.⁵⁷

Penyebab PCOS diyakini multifaktorial, tetapi sampai saat ini masih belum diketahui pasti, penyebabnya melibatkan interaksi kompleks antara faktor genetik, perilaku, dan lingkungan. Teknologi yang semakin berkembang, menjadikan fokus penelitian untuk mencari penyebab PCOS terus berubah, dari faktor ovarium, aksis

HPA, hingga gangguan aktivitas insulin. Faktor ini saling berinteraksi dalam regulasi fungsi ovarium.^{57,58}

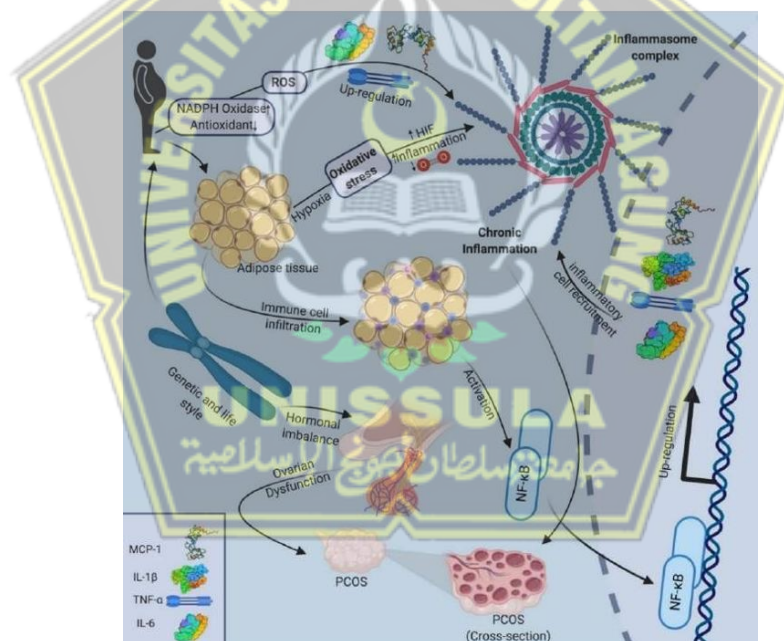
Pada penelitian tentang PCOS di berbagai ras etnik ditemukan bahwa prevalensi PCOS pada berbagai ras tidak berbeda, tetapi ras berpengaruh terhadap manifestasi klinis PCOS (resistensi insulin, obesitas, hiperandrogenisme, dislipidemia). Perbedaan manifestasi klinis itu mungkin disebabkan oleh faktor lingkungan, seperti pola makan, kebiasaan olahraga, dan gaya hidup (Gambar 6).^{4,12}



Gambar 6. Model hubungan kompleks antara faktor genetik dan lingkungan terhadap kejadian PCOS¹²

Patofisiologi PCOS hingga saat ini masih belum jelas diketahui. Bukti substansial menunjukkan adanya interaksi kompleks antara faktor endokrin, metabolik, genetik, dan lingkungan intrinsik. Terdapat beberapa teori yang menjelaskan patogenesis PCOS, yaitu :

1. Kerusakan neuroendokrin, menyebabkan peningkatan frekuensi pulsasi dan amplitudo LH dengan FSH yang relatif rendah.
2. Kerusakan intrinsik pada produksi androgen ovarium.
3. Perubahan metabolisme kortisol dan gangguan produksi androgen adrenal.
4. Resistensi insulin dengan hiperinsulinemia kompensasi yang mengakibatkan peningkatan produksi androgen ovarium secara langsung dan tidak langsung melalui penghambatan produksi SHBG hepar.
5. Peningkatan aktivitas saraf simpatis.
6. Defek genetik.



Gambar 7. Patofisiologi PCOS²³

Heterogenitas PCOS memperkuat sifat multifaktorial PCOS. Dari fenotipe yang beragam, hiperandrogenisme dan disfungsi ovarium merupakan dua ciri utama PCOS. Bila ada rangsangan ovarium untuk menghasilkan androgen dalam jumlah berlebihan, akumulasi banyak folikel atau kista dapat

diamati di ovarium. Resistensi insulin merupakan penyebab utama hiperandrogenisme pada PCOS, melalui stimulasi sekresi androgen ovarium dan penghambatan produksi *sex hormone-binding globulin* (SHBG). Wanita dengan PCOS dan hiperandrogenisme dapat mengalami pertumbuhan rambut berlebih, jerawat, dan/ atau folikulogenesis abnormal. Tiga jalur patofisiologis utama PCOS yaitu disfungsi ovulasi, pelepasan gonadotropin yang tidak teratur, dan resistensi insulin.⁴

Hipersekresi *luteinizing hormone* (LH) oleh kelenjar hipofisis, yang menyebabkan disfungsi ovarium dan hiperandrogenisme disebabkan oleh pelepasan pulsatil *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) dari hipotalamus yang terganggu pada PCOS. Sekresi LH yang terganggu ini muncul di awal masa pubertas dan terkait dengan penghambatan sekresi GnRH oleh progesteron yang terganggu. Meskipun kadar serum *follicle-stimulating hormone* (FSH) umumnya normal, folikel tampaknya lebih resisten terhadap FSH pada wanita dengan PCOS daripada kontrol. Hal ini mungkin disebabkan oleh peningkatan kadar *anti-Mullerian hormone* (AMH) intraovarian.⁵⁹

2.7 Pengaruh SH-MSCs Terhadap Ekspresi Gen IL-10 dan STAT3 pada Tikus Model PCOS

MSCs mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang disebut secretome yang mendukung regenerasi, antara lain seperti sitokin antiinflamasi (IL-10) dan *transforming growth factor* (TGF- β 1) yang akan mencegah PCOS. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan

growth factor.⁶⁰ Selanjutnya disebut secretome hipoksia *mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).

PCOS ditandai dengan peningkatan kadar androgen, gangguan kadar estrogen dan progesteron, kondisi hipoksia, dan inflamasi. Ketidakseimbangan hormon ini dapat memengaruhi produksi sitokin proinflamasi, TNF- α menyebabkan resistensi insulin melalui binding insulin dan RTK, sehingga gluconeogenesis dihambat. Peningkatan ekspresi IL-6 menngaktifkan Akt1 yang menyebabkan aktivasi IKK α . Aktivasi IKK α menginduksi aktivasi faktor transkripsi NF- κ B sehingga memicu transkripsi faktor inflamasi kembali, dan menekan ekspresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10. Kondisi inflmasi pada PCOS juga menyebabkan peningkatan stress oksidatif sehingga menghambat jalur STAT3 melalui hambatan translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma. Hal ini berdampak pada unfosforilasi STAT3 yang berujung pada *stasioner states* di sitoplasma. Keberadaan STAT3 di sitoplasma menghambat mengaktifasi gen *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3). Unfosforilasi STAT3 menghambat pelepasan antiapoptosis protein Bcl2 dan menginduksi pelepasan eksekutor apoptosis caspase-3 sehingga menyebabkan apoptosis pada folikel sebagai penyebab PCOS.^{61,62}

Sitokin IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan fosforilasi STAT3 dan membentuk homodimer yang bermigrasi ke nukleus untuk mendorong ekspresi gen yang responsif terhadap STAT3, termasuk SOCS3. SOCS3 juga menghambat translokasi NF- κ B ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi. Melalui sintesis SOCS3 dan penghambatan NF- κ B, IL-10 dapat

menekan ekspresi beberapa gen pro-inflamasi, termasuk gen sitokin TNF.⁶³ Kandungan lain dari SH-MSCs adalah TGF- β , yang dapat mengaktivasi fosforilasi SMAD2/3 untuk ditranslokasi ke nukleus dan menginduksi ekspresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10.⁶⁴ Maka dengan adanya SH-MSCs, merupakan kandidat yang mampu mengobati PCOS.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

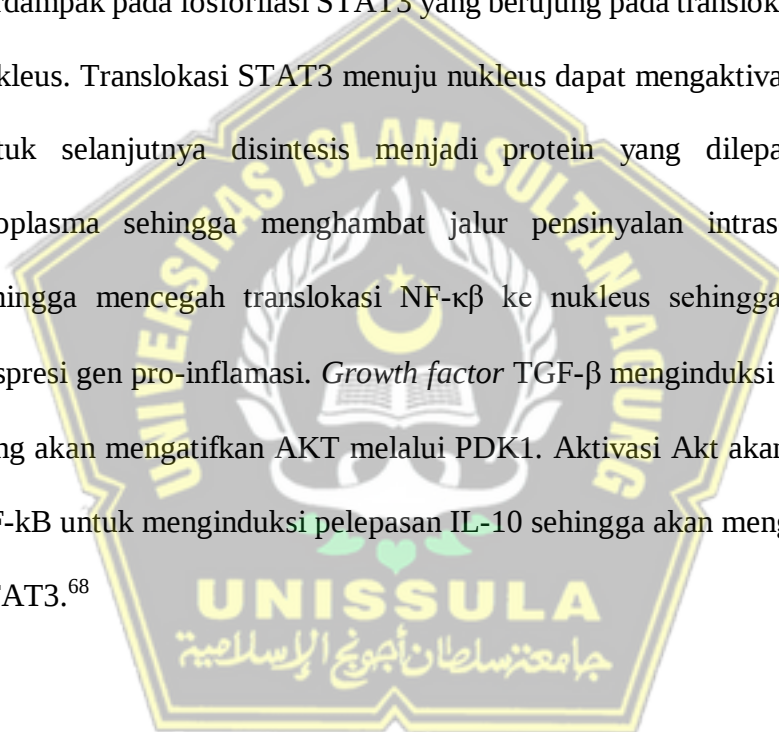
3.1. Kerangka Teori

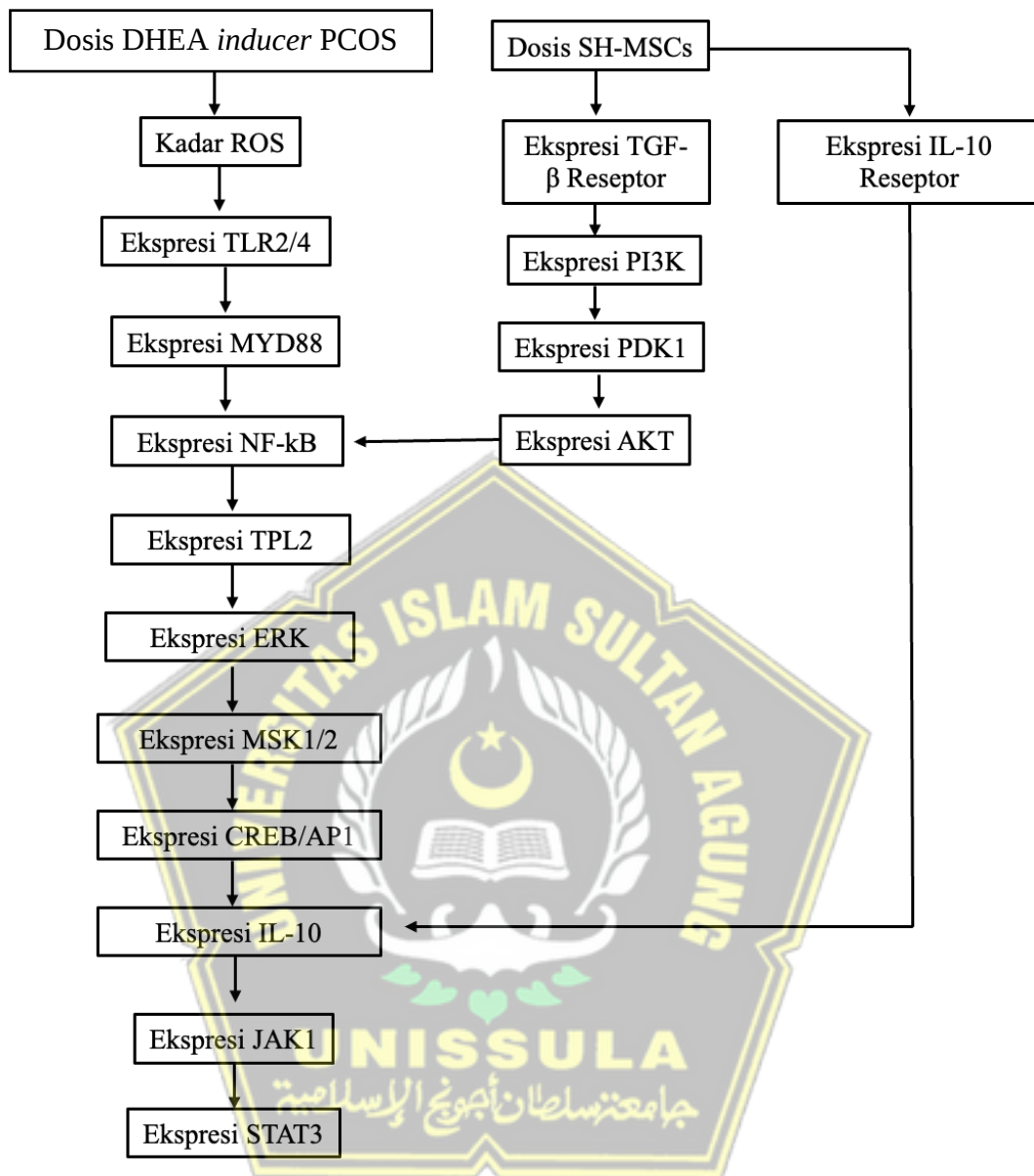
PCOS dikaitkan erat dengan kelainan endokrin kompleks yang memengaruhi reproduksi wanita akibat inflamasi kronik dan ketidakstabilan hormon. PCOS sangat dipengaruhi oleh ketidakseimbangan sitokin proinflamasi dan sitokin antiinflamasi. Sitokin proinflamasi dapat menyebabkan resistensi insulin yang merupakan patogenitas utama kondisi PCOS. Kondisi PCOS yang diinduksi akibat pemberian menginduksi pembentukan ROS yang akan menginduksi ekspresi jalur pensinyalan *toll like receptor 2/4* (TLR2/4) sehingga melepaskan *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88).^{36,38} Protein ini menginduksi pelepasan faktor transkripsi NF- κ B, translokasi NF- κ B ke nucleus menyebabkan aktivasi *tumor progression locus 2* (TPL2). TPL2 mengatur jalur MEK1/2 dan ERK1/2 untuk mengatur rangkaian respons inflamasi.⁶⁵ Aktivasi ERK ini akan menginduksi pembentukan *cAMP response element binding protein/activator protein 1* (CREB/AP1) yang diperantarai *mitogen- and stress-activated kinase 1* (MSK1/2) sehingga menghambat pelepasan sitokin antiinflamasi IL-10. IL-10 yang tersupresi akan menghambat aktivasi jalur STAT3 melalui hambatan translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma.⁶⁶

Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari

pada kondisi normal⁶⁰. Berbagai sitokin dan mediator yang muncul sebagai respon MSCs terhadap adanya hipoksia, salah satunya adalah IL-10⁶⁷. Berbagai sitokin tersebut yang diekspresikan pada medium, difiltrasi menggunakan TFF yang selanjutnya disebut sebagai SH-MSCs.

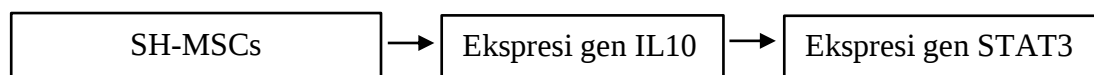
IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur STAT3 melalui translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma. Hal ini berdampak pada fosforilasi STAT3 yang berujung pada translokasinya menuju nukleus. Translokasi STAT3 menuju nukleus dapat mengaktifasi gen SOCS3 untuk selanjutnya disintesis menjadi protein yang dilepaskan menuju sitoplasma sehingga menghambat jalur pensinyalan intraseluler NF- κ B sehingga mencegah translokasi NF- κ B ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi. *Growth factor* TGF- β menginduksi ekspresi PI3K yang akan mengaktifkan AKT melalui PDK1. Aktivasi Akt akan menginduksi NF- κ B untuk menginduksi pelepasan IL-10 sehingga akan mengaktifkan jalur STAT3.⁶⁸





Gambar 8. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 9. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3.

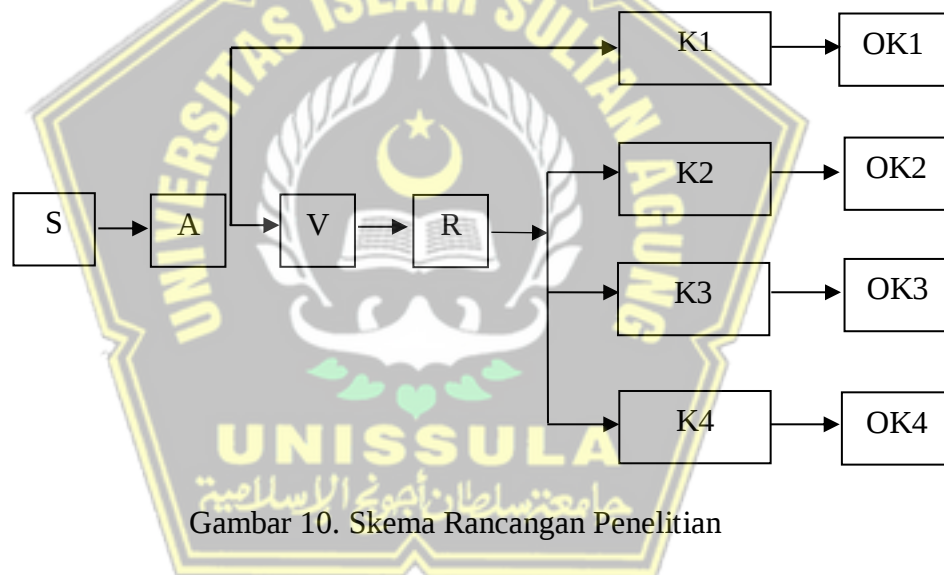


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol negatif) dan 1 kelompok tikus sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 10. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan K1 : Tikus Sehat

Perlakuan K2 : Kontrol Negatif (Tikus model PCOS dengan DHEA

100mg/g BB) secara subkutan yang tidak mendapat pengobatan)

Perlakuan K3 : Tikus model PCOS dengan DHEA (6 mg/100 g BB) secara subkutan dengan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L.

Perlakuan K4 : Tikus model PCOS dengan DHEA (6 mg/100 g BB) secara subkutan dengan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L.

OK : Observasi kelompok

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel Penelitian

4.2.2.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah SH-MSCs dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L.

4.2.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi IL-10 dan ekspresi gen STAT3.

4.2.2 Definisi Operasional

1.2.2.1 SH-MSCs

SH-MSCs adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSCs. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs secara hipoksia, kemudian difiltrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*.

Skala: Ordinal

1.2.2.2 Ekspresi gen IL-10

IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi yang memiliki peran dalam mencegah inflamasi pada stromal ovarium sehingga menghambat terjadinya PCOS. Pengukuran ekspresi gen IL-10 jaringan ovarium dilakukan dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk *multiple*.

Skala: Rasio

1.2.2.3 Ekspresi gen STAT3

STAT3 adalah gen yang memiliki peran dalam mengatur homeostatis hormonal di ovarium yang ketidakseimbangannya menyebabkan PCOS. Pengukuran ekspresi gen STAT3 jaringan ovarium dilakukan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode qRT-PCR yang disajikan dalam bentuk *multiple*.

Skala: Rasio

4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus betina galur *Wistar* berusia 22-44 hari dengan bobot badan ± 100 g yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House* SCCR, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

4.3.2 Sampel Penelitian

4.3.1.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus betina putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 22-44 hari
2. Tikus kondisi PCOS akibat induksi DHEA (6 mg/100 g BB) yang divalidasi melalui apusan vagina, pewarnaan HE struktur folikel ovary, dan kadar hormon testoteron.
3. Bobot badan 100 g.

4.3.1.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih betina galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit sebelum masa penelitian.

4.3.1.3 Kriteria Drop Out

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih betina galur *Wistar* dibagi menjadi 4 perlakuan yaitu perlakuan K1 (tikus sehat), K2 (tikus yang mengalami DHEA (6 mg/100 g BB) dan tidak diberikan perlakuan apapun), K3 (tikus yang mengalami DHEA (6 mg/100 g BB) dan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L), dan K4 (tikus yang mengalami DHEA (6 mg/100 g BB) dan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L).

4.4.1 Besar Sampel

Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini menggunakan rumus sampel eksperimental dari Federer, dengan rumus:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6 \rightarrow \text{Pembulatan menjadi 6}$$

keterangan :

t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan

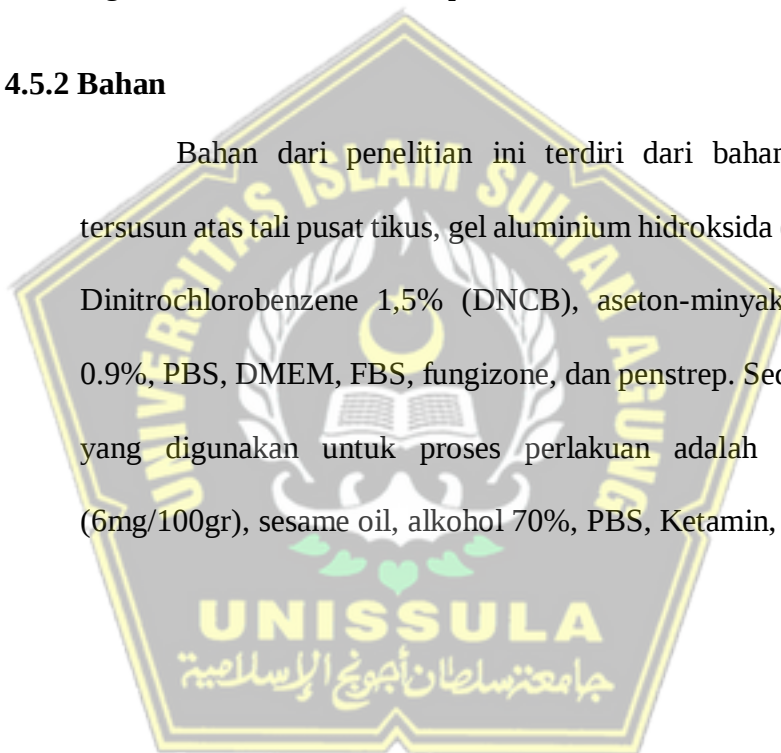
4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, *dissecting kit*, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi IL-10 dan STAT3.

4.5.2 Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, gel aluminium hidroksida (Al(OH)), 2,4-Dinitrochlorobenzene 1,5% (DNCB), aseton-minyak zaitun NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah DHEA 50mg (6mg/100gr), sesame oil, alkohol 70%, PBS, Ketamin, dan Xylasine.



4.6 Cara Penelitian

4.6.1 Perolehan Ethical Clearance

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

4.6.2 Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

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

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke *petri dish*, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diadukan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplet yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.

8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

4.6.3 Proses Hipoksia dan TFF

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam *chamber*.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan disaring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SH-MSC yang selanjutnya disiapkan sesuai dengan dosis P3 dan P4.

4.6.4 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diinduksi dengan DHEA (6 mg/100 g BB) dalam 0,2 ml olive oil (vehicle) secara subkutan selama 23 hari berturut-turut
2. Hari ke 18-23 dilakukan apusan vagina untuk validasi secara sitologi. Pengambilan data dilakukan pada pukul 08.00-10.00 pagi. Penentuan fase estrus dilakukan dengan cara pembuatan preparat apus vagina. Ujung cotton bud dibasahi dengan larutan NaCl fisiologis, secara perlahan cotton bud tersebut dimasukkan kedalam vagina mencit (5 mm) dan diputar perlahan searah dengan jarum jam sebanyak tiga rotasi. Ujung cotton bud dioleskan memanjang pada objek gelas menjadi tiga baris. Apusan dipastikan menempel dan dikering anginkan 5 menit. Apusan difiksasi menggunakan alkohol 70% dan diwarnai menggunakan methylen blue selama 5 menit. Pewarna yang berlebih dibersihkan dengan air mengalir. Amati pada perbesaran 400x guna evaluasi panjang dan fase siklus estrus. Yang dilihat adalah adanya epitel terkornifikasi yang menandakan fase estrus.
3. Hari ke 23 dilakukan validasi hormon testosterone menggunakan metode ELISA untuk melihat peningkatan hormon testosterone.

Prosedur Pengujian

- a. Siapkan semua reagen, larutan standar dan sampel sesuai instruksi. Bawa semua reagen ke suhu ruang sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu ruang.
- b. Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip yang tersisa ke dalam alumunium zip untuk disimpan.
- c. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu 2-8°C.
- d. Tambahkan 50µl standar ke sumuran standar. Catatan: Jangan menambahkan antibodi ke standar karena larutan standar mengandung antibodi terlabel biotin.
- e. Tambahkan 40µl sampel ke sumuran sampel lalu tambahkan 10µl antibodi anti-IL-10 ke sumuran sampel, lalu tambahkan 50µl streptavidin-HRP ke sumuran sampel dan sumur standar (Bukan sumuran blanko). Campur dengan baik. Tutupi plate dengan sealer. Inkubasi 60 menit pada suhu 37°C.
- f. Lepaskan sealer dan cuci sumuran 5 kali dengan wash buffer setidaknya 0,3 ml selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian.
- g. Tambahkan 50µl larutan substrat A ke masing-masing sumuran dan kemudian tambahkan 50µl larutan substrat B ke setiap sumuran.

- h. Inkubasi plate yang ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37°C di tempat gelap.
 - i. Tambahkan 50µl Stop Solution ke masing-masing sumuran, warna biru akan langsung berubah menjadi kuning.
 - j. Tentukan nilai OD masing-masing sumuran menggunakan microplate reader yang diset pada 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan stop solution.
4. Hari ke 23 tikus di validasi struktur folikel ovari. Tikus dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb). Validasi jaringan ovarium diamati dengan pengecatan HE untuk melihat folikel ovarium yang atresia, kista ovarium dan penurunan jumlah korpus luteum.
5. Selanjutnya injeksi DHEA diteruskan sampai hari ke 30 secara subcutan (untuk menghindari *ovarian self recovery*) dibarengi dengan pemberian SH-MSCs (hari ke 23-30 diberikan di hari 23-25-28-30) yang mengandung dosis 200 µL dan dosis 400 µL secara intraperitoneal. Tikus kontrol negatif diberikan perlakuan NaCl.
6. Pada hari ke 27-32, dilakukan pemeriksaan sitologi untuk mengetahui siklus estrus.
7. Pada hari ke 33, dilakukan pemeriksaan kadar testosterone, pemeriksaan PCR dan pemeriksaan sampel ovari pada semua kelompok untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

- a) Sampel ovarium tikus pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%.
- b) Sampel ovarium dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif.
- c) Sampel ovarium dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk proses dehidrasi.
- d) Sampel ovarium dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam.
- e) Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C dengan cara memasukkan sampel ovarium ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Sampel ovarium dimasukkan ke dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit.
- f) *Embedding*, sampel ovarium dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras.
- g) Sampel ovarium dalam blok parafin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 µm menggunakan mikrotom.
- h) Irisan sampel jaringan ditempelkan pada gelas benda dengan cara mengoleskan Mayer's albumin dan ditetesi sedikit

akuades lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga irisan menempel dengan sempurna.

- i) Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam.
- j) *Staining* (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna hematoksilin-eosin. Kandungan xylol diserap dengan kertas saring, kemudian berturut-turut dimasukkan ke alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, dan akuades masing-masing dilakukan selama 1-2 menit. Preparat dimasukkan ke dalam pewarna Hematoksilin selama 5-10 detik, lalu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit. Proses selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70% masing-masing selama 3-5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam eosin selama 5-10 menit, kemudian dicelupkan ke alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama 3-5 menit, lalu dikeringkan dengan kertas saring. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 15 menit, kemudian sediaan histologis ditetesi canada balsam.
- k) Preparat ditutup kaca penutup, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan.

4.6.5 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel ovarium sebanyak 100 mg kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan ke dalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
2. Sisi lain, PBMCs sebanyak 10^7 sel masing-masing ditransfer ke mikro tube dan diberi 50 mL RNA Iso Plus.
3. Potongan ovarium ditumbuk menggunakan micropaste dan ditambahkan lagi RNA Iso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
4. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
5. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
6. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
7. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40°C . Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.

8. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (Diethyl pyrocarbonat) DEPC lalu bolak-balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40°C.
9. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 µm. Campuran diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80°C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
10. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 µL OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 µL, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70°C.
11. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 µL, DEPC-Treated H₂O 5 µL, ReverTraAce 1 µL. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit dan 85°C selama 5 menit.

4.6.6 Pembacaan ekspresi gen IL-10 dan STAT3 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi gen IL-10 dan STAT3 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2. Campuran dari 3 μ L cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ L, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 μ L untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μ L Nuclease Free Water.
3. Primer IL-10 yang digunakan adalah F: 5'-CTGTCACGGAGATCAATGTGG-3' dan R: 5'-AAGGCGTAGCTGAACAAGGTG-3'. Primer STAT3 yang digunakan adalah F: 5'-CTGCTGAGGAGGATTGTCCAC-3' dan R: 5'-CACGACAGCCTGGAGGTGA-3'. Primer *housekeeping* gene GAPDH yang digunakan adalah F: 5'-TACCCACGGCAAGTTCAACG3' dan R: 5'-ACTCCACGACATACTCAGCAC3'.
4. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine.
5. Peningkatan ekspresi gen dianalisis dalam ratio peningkatan terhadap house keeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.

4.7 Tempat dan Waktu Penelitian

4.7.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* FK Unissula Semarang.

4.7.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli - Agustus 2023.

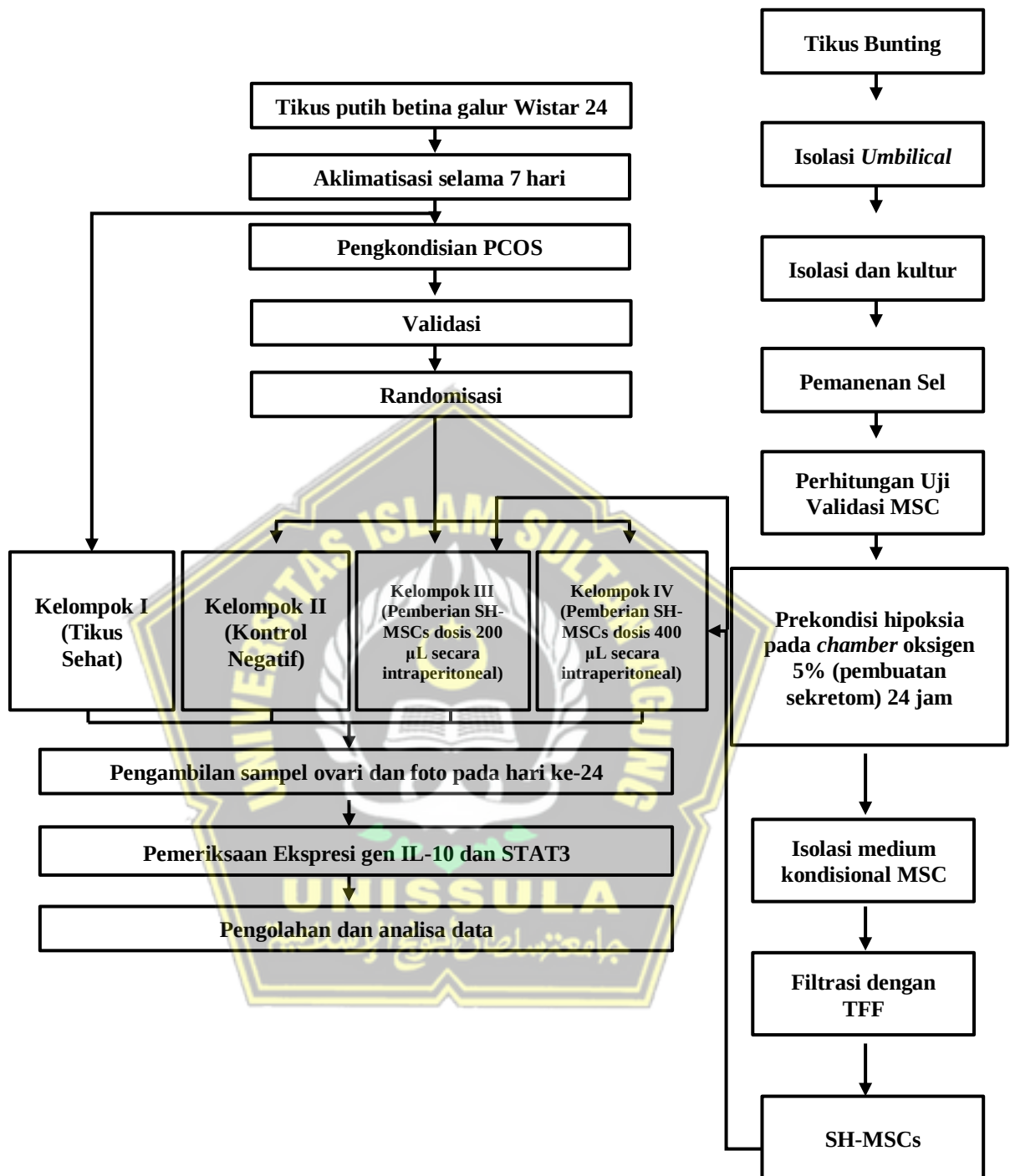
4.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ($p > 0,05$) dan tidak homogen ($p < 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Jika terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar

kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 11. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus galur *Wistar* model PCOS.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juli sampai Agustus 2023 bertempat di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.

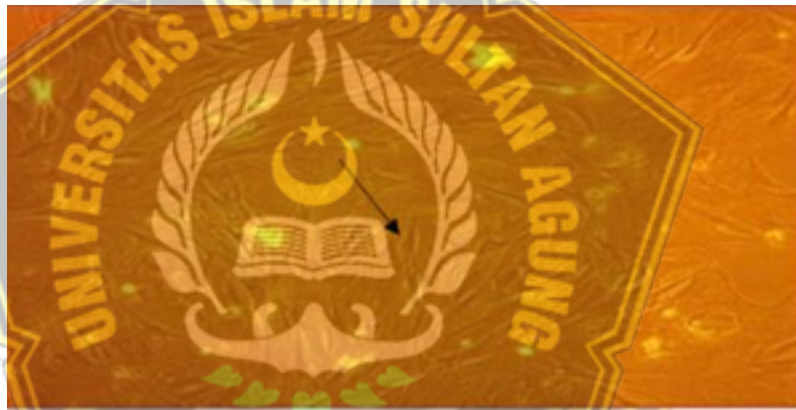
Penelitian menggunakan Tikus galur *Wistar* betina sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 24 ekor tikus sesuai kriteria Federer. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 4 kelompok, K1 Tikus sehat, K2 Tikus sakit tanpa perlakuan (kontrol positif), P1 Tikus sakit dengan perlakuan sekretom dosis 200 μ L dan P2 Tikus sakit dengan perlakuan sekretom dosis 400 μ L.

SH-MSCs yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Umbilical Cord* tikus usia kehamilan 21 hari. Validasi SH-MSCs menggunakan analisis kemampuan differensiasi osteogenic serta analisis fenotip sel menggunakan *flowcytometri*. Sel yang sudah tervalidasi kemudian di inkubasi pada kondisi hipoksia.

5.1 HASIL PENELITIAN

5.1.1 Isolasi Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells

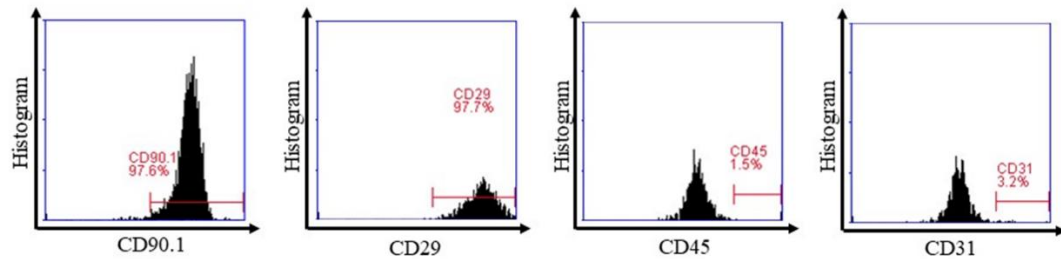
Isolasi SH-MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang yang menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dikultur pada flask plastik dengan medium khusus. Setelah pasase ke 5 pengkulturan SH-MSCs didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis.



Gambar 12. Isolasi SH-MSCs dengan sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.

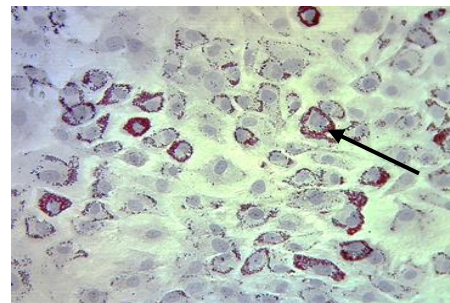
Hasil isolasi sel punca mesenkimal divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan SH-MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Pada penelitian ini menunjukan bahwa SH-MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99,80%),

CD29(94,20%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%)



Gambar 13. Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

Penelitian ini menganalisis kemampuan SH-MSCs dalam berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel matur. SH-MSCs diberi medium khusus sehingga dapat berdiferensiasi masing-masing menjadi osteofit dan adiposit. Penelitian ini menunjukkan bahwa SH-MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteofit dan adiposit yang diindikasikan dari endapan kalsium dan lemak berupa penampakan merah menggunakan pewarnaan *Alizarin Red* dan *oil Red dye* pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik.



Gambar 14. (A) SH-MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O₂ 5% selama 24 jam menggunakan *chamber hypoxia*. MSCs yang dihipoksik terlihat lebih tumbuh merapat dibandingkan dengan sebelum dikultur pada kondisi hipoksia seperti yang terlihat pada Gambar 15.



Gambar 15. (A) morfologi MSCs sebelum dikultur pada kondisi hipoksia, (B) morfologi MSCs setelah dikultur pada kondisi hipoksia

Medium kultur *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) yang mengandung sekretom kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *Tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan molekular *weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50kDa yang mengandung sitokin interleukin-10 atau IL-10 dan

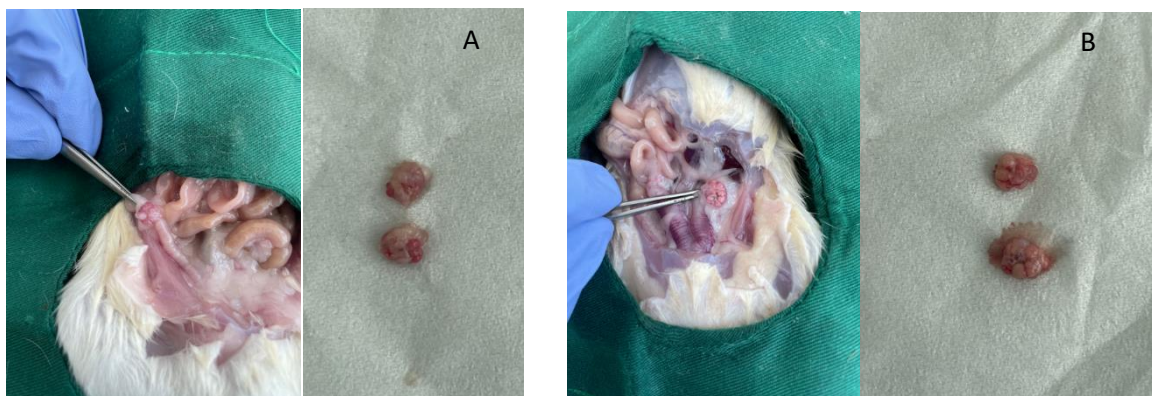
Transforming growth factor $-\beta$.⁶⁹ Hasil analisis konsentrasi sekretom ditampilkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi sitokin dan factor pertumbuhan pada SH-MSCs

Molecules	SH-MSCs Value $\pm$ SE (pg/mL)
VEGF	1017.16 $\pm$ 40.31
PDGF	1047.23 $\pm$ 38.73
bFGF	975.14 $\pm$ 34.89
IL-10	545.17 $\pm$ 13.54
TGF- β	272.13 $\pm$ 10.58

5.1.2 Validasi Hewan Coba PCOS secara Makroskopik

Induksi DHEA pada tikus berdasarkan pengamatan secara makroskopis terlihat adanya benjolan yang lebih banyak dibandingkan dengan tikus sehat, yang diduga merupakan cystic folikel yang menjadi salah satu tanda PCOS (Gambar 16).



Gambar 16. (A) bentuk makroskopis ovarium yang tidak diberi induksi DHEA, (B) bentuk makroskopis yang diinduksi DHEA

5.1.3. Validasi Hewan Coba PCOS dengan Hematoksin Eosin

Induksi DHEA pada tikus berdasarkan pengamatan secara mikroskopis terlihat adanya cystic folikel yang menjadi salah satu tanda PCOS seperti yang terlihat pada gambar berikut.

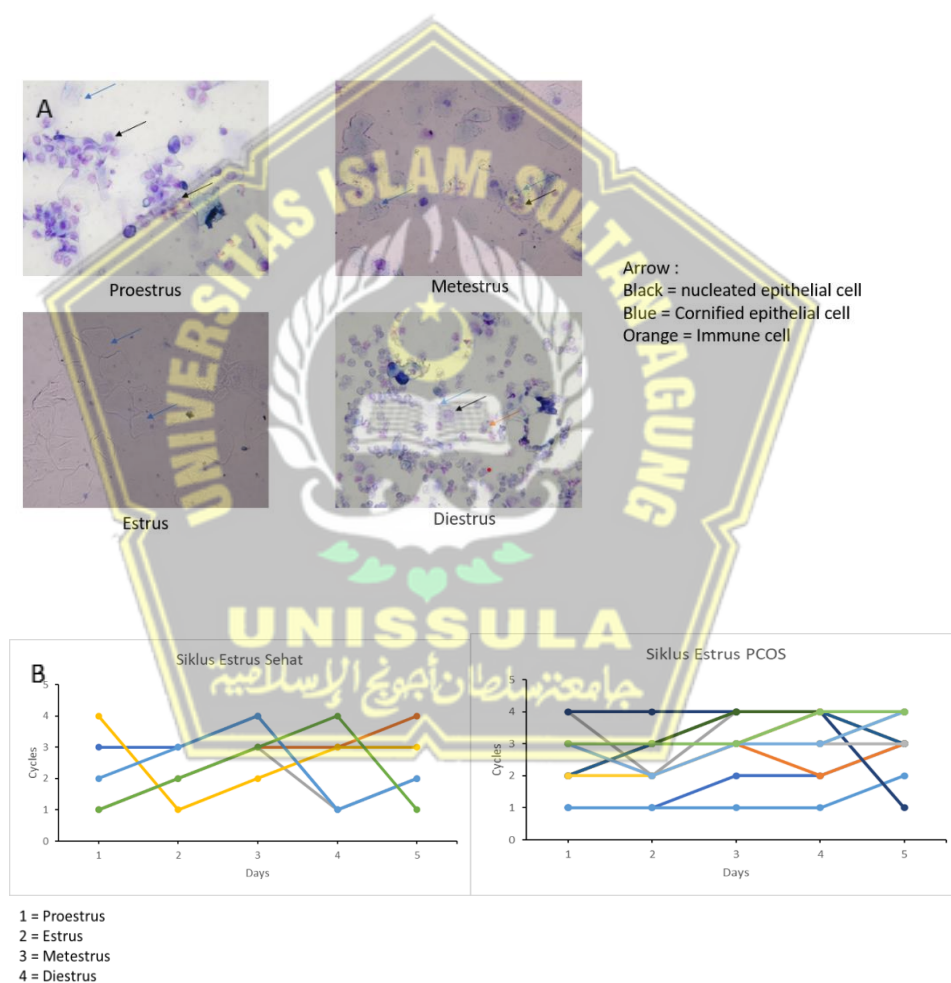


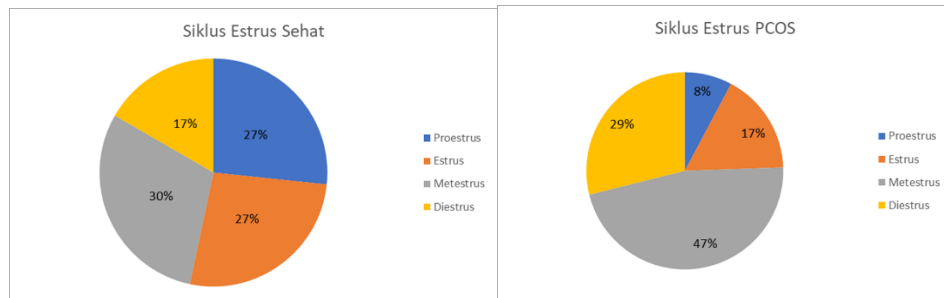
Gambar 17. (A) bentuk sediaan mikroskopis ovarium normal, (B) bentuk sediaan mikroskopis yang diinduksi DHEA

5.1.4 Validasi Hewan Coba dengan Siklus Estrus

Validasi model hewan PCOS menggunakan metode pemantauan siklus estrus berhasil tercapai dengan sukses dalam penelitian ini. Hewan model yang telah diinduksi dengan metode yang sesuai menunjukkan perubahan yang konsisten dengan karakteristik PCOS, termasuk gangguan pada siklus estrus, pembentukan kista ovarium, dan perubahan hormon yang relevan. Data yang dikumpulkan selama periode

pemantauan berdasarkan analisis statistik menunjukkan bahwa gejala PCOS pada hewan model tersebut signifikan dan konsisten. Selain itu, perbandingan dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami induksi PCOS secara jelas membedakan perubahan yang diamati sebagai hasil dari sindrom ovarium polikistik. Kesuksesan dalam validasi ini memberikan landasan yang kuat bagi penelitian lebih lanjut dalam memahami mekanisme PCOS dan pengembangan terapi potensial.





Gambar 18. (A) bentuk sediaan mikroskopis siklus estrus tikus, (B) grafik perbedaan siklus estrus pada tikus sehat dengan yang diinduksi DHEA

5.1.5 Validasi Hewan Coba dengan testosterone

Validasi hewan model PCOS dengan menggunakan metode pengecekan hormon testosteron telah berhasil dicapai dalam penelitian ini. Hewan model yang telah diinduksi dengan hormon dan mengalami gangguan hormonal yang mirip dengan PCOS pada manusia telah menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam kadar testosteron. Data hasil pengukuran hormon testosteron secara kuantitatif secara konsisten menunjukkan perubahan yang relevan dan relevan dengan karakteristik PCOS. Selain itu, perbandingan dengan kelompok kontrol yang tidak diinduksi PCOS secara jelas membedakan hewan model sebagai model yang mewakili PCOS. Validasi ini memberikan dasar yang kuat bagi penelitian lebih lanjut dalam memahami mekanisme PCOS dan mengembangkan terapi potensial untuk sindrom ovarium polikistik.

Tabel 2. Konsentrasi Testosteron Tikus Validasi

Kelompok	Rerata Testosteron (pg/mL)	Stdev (pg/mL)
Sehat	46.67	20.82
PCOS	80	26.46

5.1.6 Efek pemberian sekretom SPM hipoksia dosis 200 μ dan III pada kadar IL-10 dan STAT3

Tabel 3. Data Hasil Penelitian Ekspresi Gen IL-10 dn STAT-3

Variabel	Kelompok				P Value
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ SD Kontrol Sehat	Rerata $\pm$ SD Kontrol Negatif	Rerata $\pm$ SD SH-MSCs 200 μ l	Rerata $\pm$ SD SH-MSCs 400 μ l	
IL-10 (pg/mL)	1 $\pm$ 0,1	0,1804 $\pm$ 0,9710	0,4041 $\pm$ 0,21569	0,9117 $\pm$ 0,38359	0,001
STAT3 (pg/mL)	1 $\pm$ 0,1	0,6928 $\pm$ 0,3353	0,9022 $\pm$ 0,30977	1,3509 $\pm$ 0,44429	0,021

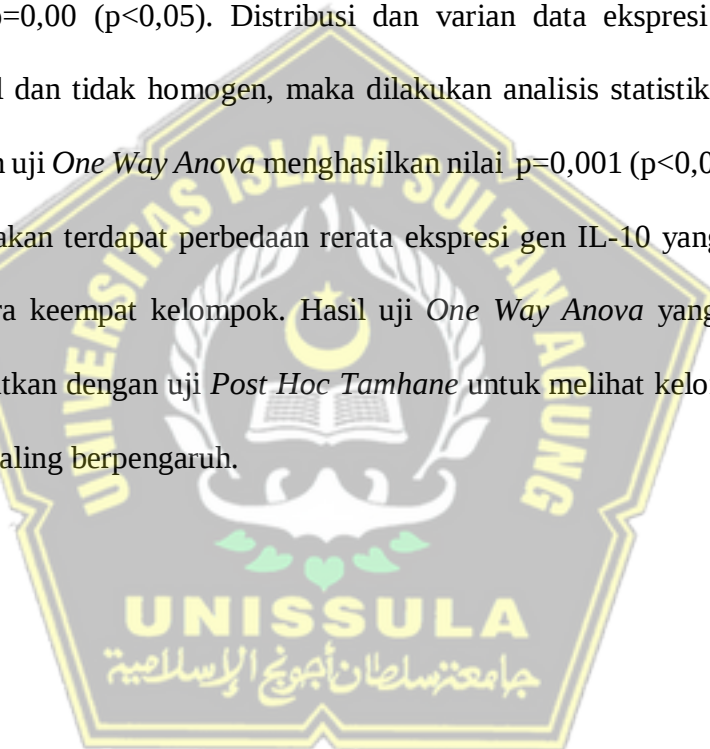
Keterangan :

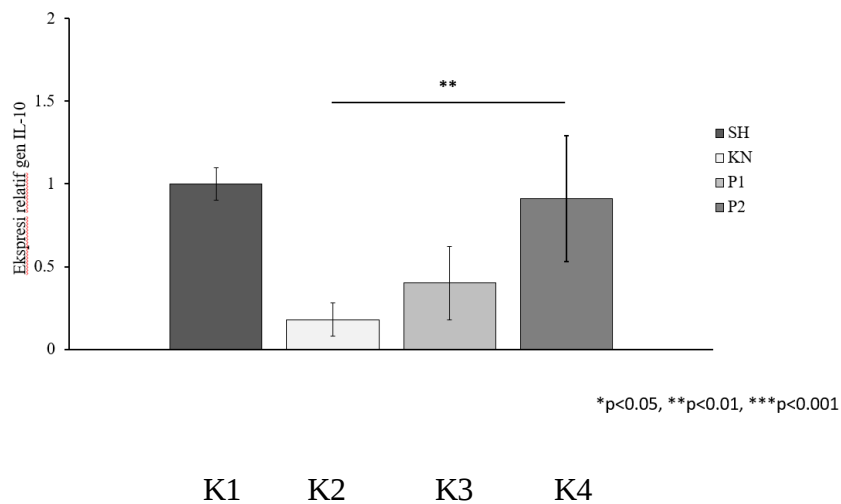
*Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

** Levene's Test ($p > 0,05$ = homogen)

*** One Way Anova ($p < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 6. Rerata kadar IL-10 di kelompok K1 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata kadar IL-10 kelompok K4. Selanjutnya rerata ekspresi gen IL-10 kelompok K3 dan rerata ekspresi gen IL-10 kelompok K2. Data ekspresi gen IL-10 keempat kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p < 0,05$ dan juga memiliki varian data yang tidak homogen ditunjukkan dengan hasil Levene's Test dengan nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen IL-10 normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen IL-10 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.





Gambar 19. Grafik Ekspresi gen IL-10 Pada Seluruh Kelompok Penelitian

Tabel 4. Uji *Post Hoc* Tamhane Ekspresi gen IL-10 pada Masing-masing Kelompok.

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K2	K3	0,153	-0,5252	0,0779
	K4*	0,014	-1,2723	-1,903
K3	K2	0,153	-0,0779	0,5252
	K4	0,066	-1,0496	0,0343
K4	K2*	0,014	0,1903	1,2723
	K3	0,066	-0,343	1,0496

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

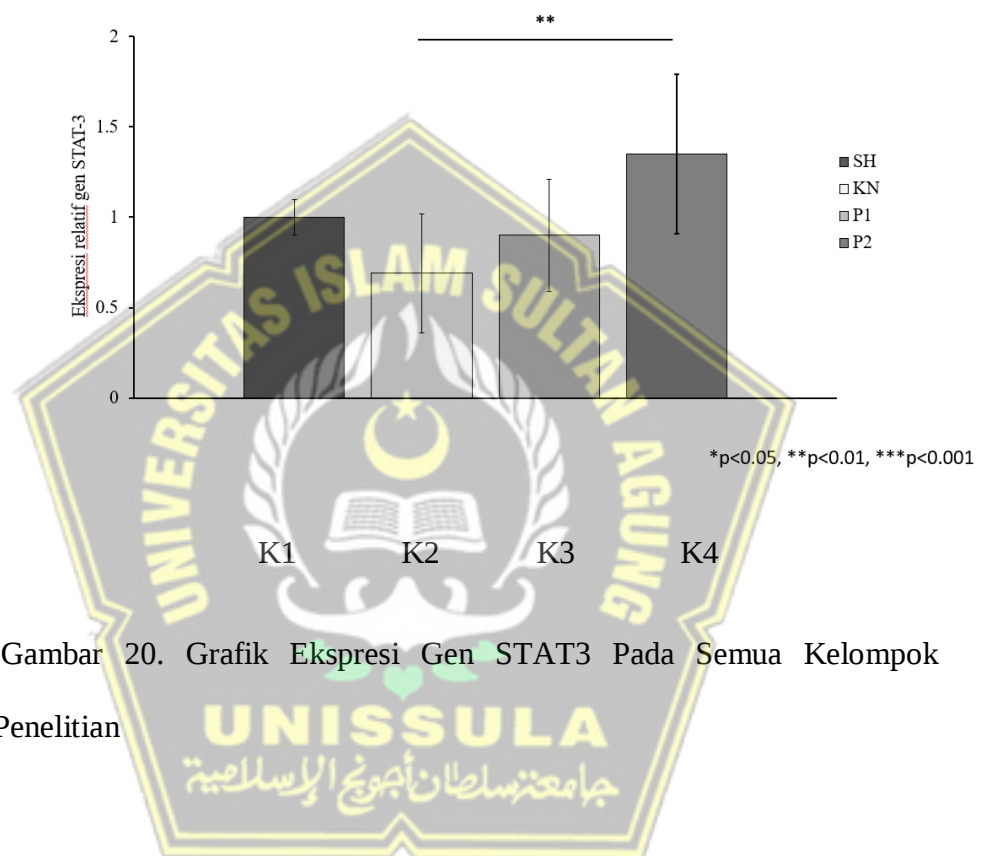
Diketahui berdasarkan data statistic data terdistribusi normal tidak homogen, sehingga dilakukan uji Post Hoc Tamhane. Didapatkan hasil yang signifikan antara kelompok K4 dibandingkan dengan K2 ($p = 0,014$) dan pada K4 dibandingkan dengan K2 diperoleh nilai signifikansi 0,014 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Hasil K3 dan K4 secara statistik tidak bermakna namun secara deskriptif ekspresi gen IL-10 pada K4 mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok 3. Hasil uji *Post Hoc Tamhane* pada data ekspresi gen IL-10 menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs 200 μ l dan 400 μ l dapat meningkatkan ekspresi gen IL-10 pada tikus betina galur wistar PCOS.

5.1.3 Efek Pemberian SH-MSCs dosis 200 μ l dan 400 μ l pada ekspresi gen STAT3

Pada penelitian ini di dapatkan rerata ekspresi gen STAT3 di kelompok K1 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen STAT3 kelompok K4. Selanjutnya rerata ekspresi gen STAT3 kelompok K3 dan rerata ekspresi gen STAT3 kelompok K2 (Tabel 6).

Data ekspresi gen STAT3 keempat kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,820$ ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen STAT3 normal dan homogen, maka dilakukan

analisis statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p=0,021$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen STAT3 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 20. Grafik Ekspresi Gen STAT3 Pada Semua Kelompok Penelitian

Tabel 5. Uji *Post Hoc* LSD Ekspresi Gen STAT3 pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K2	K3	0,339	-0,6614	0,2425
	K4*	0,007	-1,1101	-0,2062

K3	K2	0,339	-0.2425	0,6614
	K4	0,051	-0,0032	0,9006
K4	K2*	0,007	0.2062	1,1101
	K3	0,051	-0,0032	0,9006

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan

Diketahui berdasarkan data statistik data terdistribusi normal dan homogen, sehingga dilakukan uji Post Hoc LSD. Didapatkan hasil yang signifikan antara kelompok K4 dibandingkan dengan K2 ($p = 0,007$) dan pada K2 dibandingkan dengan K4 diperoleh nilai signifikansi 0,007 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Hasil uji *Post Hoc LSD* pada data ekspresi gen STAT3 menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs 200 μ l dan 400 μ l yang dapat meningkatkan ekspresi gen STAT3 pada tikus betina galur wistar PCOS.

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Polycystic ovary syndrome (PCOS) adalah suatu kondisi di mana anovulasi yang berlangsung lama dan hiperandrogenisme seringkali mengakibatkan masalah kesuburan.⁸³⁻⁸⁵ PCOS sangat terkait dengan peradangan kronis yang dipicu oleh glukosa dan lemak jenuh, yang pada gilirannya menyebabkan hiperandrogenisme.⁸⁶ Keadaan peradangan ini memicu peningkatan tingkat reactive oxygen species (ROS) yang mengaktifkan faktor transkripsi nuclear factor kappa beta (NF-KB) dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF alpha.⁸⁶⁻⁸⁸

Peradangan kronis terjadi di ovarium dan jaringan sekitarnya yang ditandai dengan melimpahnya Makrofag tipe 1 (M1) yang merupakan subpopulasi makrofag yang menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti IL-6, TNF- α , dan IL-1 β , yang dapat memicu dan mempertahankan peradangan kronis.⁸⁹ Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pada beberapa kasus PCOS, terjadi ketidakseimbangan antara aktivitas M1 dan kadar IL-10. Pemberian SH-MSC pada K4 yang mengandung IL-10 yang lebih tinggi dibanding K3 dapat mentransformasi M1 menjadi M2 yang bersifat anti-inflamasi.⁸⁹⁻⁹¹ Diferensiasi M1 menjadi M2 akan menyeimbangkan populasi makrofag di dalam ovarium sehingga dapat menghentikan proses inflamasi sehingga menurunkan folikulogenesis sehingga tidak terjadi PCOS.⁹¹⁻⁹³

IL-10 dapat menghentikan inflamasi dengan menghambat aktivasi NF-KB melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah menghambat aktivasi IkappaB kinase (IKK), yang merupakan langkah awal dalam aktivasi NF- κ B.^{94,95} Selain itu IL-10 dapat menghambat jalur TLR dengan menghambat fosforilasi dari mitogen-activated protein kinase (MAPK) dan TGF-beta activated kinase 1 (TAK1), yang mengarah pada pengurangan aktivasi NF-KB yang disebabkan oleh reseptor TLR.⁹⁶ IL-10 juga dapat menghambat aktivitas Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6), yang merupakan mediator penting dalam aktivasi NF-KB.⁹⁶⁻¹⁰⁰ IL-10 dapat menghambat aktivasi TRAF6, yang mengurangi aktivasi NF-KB yang diinduksi oleh sinyal TRAF6.

IL-10 yang terkandung dalam SH-MSCs yang memiliki fungsi sebagai anti inflamasi mengaktivasi STAT3 yang terlihat dari peningkatan secara signifikan pada K4.⁷⁴⁻⁷⁶ Faktor transkripsi STAT3 dapat mengikat daerah promotor gen

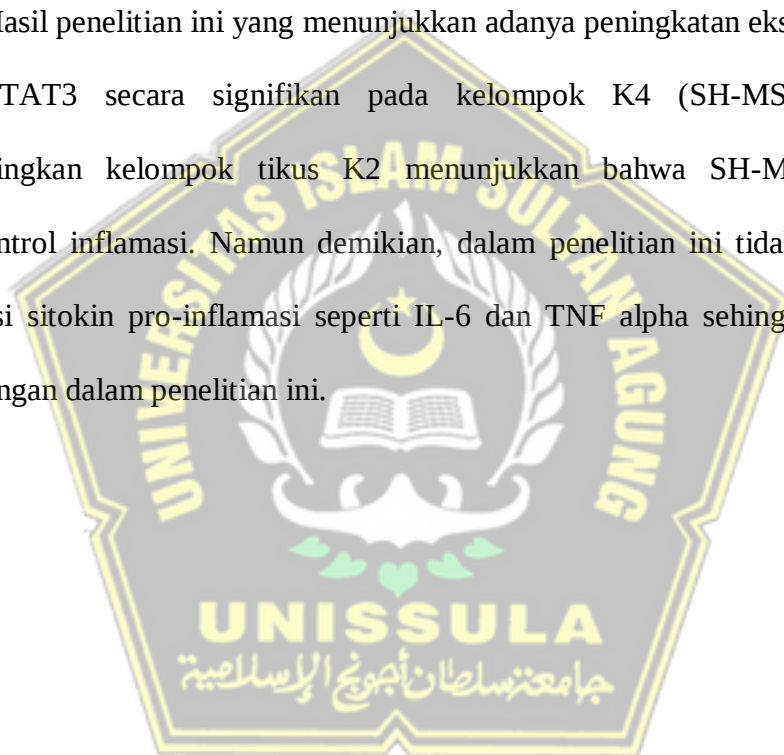
yang mengatur ekspresi sitokin pro-inflamasi dan menghambat transkripsi gen-gen ini sehingga mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi pada inflamasi kronis PCOS. STAT3 berperan penting dalam regulasi fungsi sel T regulator (Treg), yang memiliki peran kunci dalam meredakan peradangan dan menjaga toleransi imunologis. Aktivasi STAT3 dalam Treg dapat meningkatkan kemampuan mereka untuk menghambat respon imun berlebihan dan meredakan peradangan. Selain itu STAT3 dapat berperan dalam mengarahkan diferensiasi makrofag ke arah fenotipe M2, yang menghasilkan lebih sedikit sitokin pro-inflamasi dan lebih banyak sitokin antiinflamasi, membantu meredakan peradangan.

Pada penelitian lain menunjukkan bahwa terjadi penurunan inflamasi melalui aktivasi jalur IL-10 STAT3 *pathways*. IL-10 akan berikatan dengan IL-10R menghasilkan aktivasi dari JAK 1 yang menginduksi fosforilasi STAT3. Protein STAT3 masuk ke nukleus dan mengaktivasi sekuens mRNA SOSC3 yang kemudian akan diekspresikan secara intraseluler dan dapat menekan jalur pensinyalan proinflamasi, yaitu NF- κ B. Penekanan pada jalur NF- κ B akan menyebabkan penurunan sekresi sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-6.

^{78,79} Penelitian lainnya dengan menggunakan Fibrin Facilitates MSCs menunjukkan bahwa, MSCs meregulasi estradiol dan progesterone, berkurangnya gonadotropin (LH/FSH, testosterone (T) Dan TGF- β 1, siklus estrus yang teratur, peningkatan jumlah sel granulosa, dan berkurangnya folikel kistik yang belum matang. ⁸⁰

IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur STAT3 melalui translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma.^{17,18} Hal ini berdampak pada fosforilasi STAT3 yang berujung pada translokasinya menuju nukleus. Translokasi STAT3 menuju nukleus dapat mengaktifasi gen SOCS3 untuk selanjutnya disintesis menjadi protein yang dilepaskan menuju sitoplasma sehingga menghambat jalur pensinyalan intraseluler NF- κ B sehingga mencegah translokasi NF- κ B ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi.

Hasil penelitian ini yang menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-10 dan STAT3 secara signifikan pada kelompok K4 (SH-MSCs 400 μ l) dibandingkan kelompok tikus K2 menunjukkan bahwa SH-MSCs dapat mengontrol inflamasi. Namun demikian, dalam penelitian ini tidak dianalisis ekspresi sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF alpha sehingga menjadi kekurangan dalam penelitian ini.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. SH-MSCs dapat mempengaruhi peningkatan ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus galur *Wistar* model PCOS.
2. Pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dosis 400 μ l terbukti secara bermakna berpengaruh dibandingkan dosis 200 μ l dibandingkan kelompok kontrol terhadap peningkatan kadar IL-10 pada tikus PCOS.
3. Pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dosis 400 μ l terbukti secara bermakna berpengaruh dibandingkan dosis 200 μ l dibandingkan kelompok kontrol terhadap peningkatan STAT3 pada tikus PCOS.

6.2 Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah adanya analisis kadar sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF alpha pada penelitian pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap PCOS.

DAFTAR PUSTAKA

1. Deswal R, Narwal V, Dang A, Pundir CS. The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Systematic Review. Vol. 13, *Journal of Human Reproductive Sciences*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2020. p. 261–71.
2. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. Vol. 2016, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation; 2016.
3. You M, Wang Z, Kim HJ, Lee YH, Kim HA. Pear pomace alleviated atopic dermatitis in NC/Nga mice and inhibited LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Nutr Res Pract*. 2022;16(5):577–88.
4. Wang H, Feng X, Wang T, Pan J, Zheng Z, Su Y, et al. Role and mechanism of the p-JAK2/p-STAT3 signaling pathway in follicular development in PCOS rats. *Gen Comp Endocrinol*. 2023 Jan 1;330.
5. Cabus U, Kabukcu C, Fenkci S, Caner V, Oztekin O, Fenkci V, et al. Serum Caspase-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2020 Mar 1;59(2):207–10.
6. Wolf WM, Wattick RA, Kinkade ON, Olfert MD. Geographical prevalence of polycystic ovary syndrome as determined by region and race/ethnicity. Vol. 15, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2018.
7. Mota P, Bø K. Physical Activity and Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period. *Obstetrics and gynecology*. 2021;137(2):376.
8. Zainiyah Z, Susanti E, Suhron M, Studi Profesi Bidan P, Studi DIV Kebidanan P, Studi Keperawatan P, et al. Yoga Is a Solution for Weight Loss and Stress in Insulin Resistance Polycystic Ovary Syndrome (Pcos). *Jurnal Paradigma*. 2021;3(1):54–62.
9. Joham AE, Teede HJ, Ranasinha S, Zoungas S, Boyle J. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: Data from a large community-based cohort study. *J Womens Health*. 2015;24(4):299–307.
10. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, Amansyah F, Amansyah F, Berlian MA, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Res*. 2021;10:1–19.
11. Jee MK, Im YB, Choi JI, Kang SK. Compensation of cATSCs-derived TGFβ1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatitis. *Cell Death Dis*. 2013;4(2):1–13.

12. Chugh RM, Park H soo, El Andaloussi A, Elsharoud A, Esfandyari S, Ulin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Dec 1;12(1).
13. Maliqueo M, Sundström Poromaa I, Vanky E, Fornes R, Benrick A, Åkerud H, et al. Placental STAT3 signaling is activated in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction.* 2015 Mar 1;30(3):692–700.
14. Izadi M, Rezvani ME, Aliabadi A, Karimi M, Aflatoonian B. Mesenchymal stem cells-derived exosomes as a promising new approach for the treatment of infertility caused by polycystic ovary syndrome. Vol. 13, *Frontiers in Pharmacology.* Frontiers Media S.A.; 2022.
15. Prayitno GD, Lestari K, Sartika CR, Djuwantono T, Widjaya A, Muharam R, et al. Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment: A Systematic Review. *Medicines.* 2022 Dec 23;10(1):3.
16. Dace DS, Khan AA, Kelly J, Apte RS. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development. *PLoS One.* 2008 Oct 13;3(10).
17. Tan W, Zou JL, Yoshida S, Jiang B, Zhou Y Di. Increased vitreal levels of interleukin-10 in diabetic retinopathy: A Meta-analysis. *Int J Ophthalmol.* 2020 Sep 1;13(9):1477–83.
18. Wu H, Hwang DK, Song X, Tao Y. Association between Aqueous Cytokines and Diabetic Retinopathy Stage. *J Ophthalmol.* 2017;2017.
19. Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics.* 2013 Nov;12(6):489–98.
20. Hong L, Lin Y, Yang X, Wu T, Zhang Y, Xie Z, et al. A Narrative Review of STAT Proteins in Diabetic Retinopathy: From Mechanisms to Therapeutic Prospects. Vol. 11, *Ophthalmology and Therapy.* Adis; 2022. p. 2005–26.
21. Shephard MT, Merkhani MM, Forsyth NR. Human Mesenchymal Stem Cell Secretome Driven T Cell Immunomodulation Is IL-10 Dependent. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13596.
22. Xie Q, Xiong X, Xiao N, He K, Chen M, Peng J, et al. Mesenchymal Stem Cells Alleviate DHEA-Induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by Inhibiting Inflammation in Mice. *Stem Cells Int.* 2019;2019.

23. Chugh RM, Park HS, Esfandyari S, Elsharoud A, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal stem cell-conditioned media regulate steroidogenesis and inhibit androgen secretion in a PCOS cell model via BMP-2. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 1;22(17).
24. Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility. Vol. 9, *Cells.* NLM (Medline); 2020.
25. Li Y, Guo J, Deng S, Gao Z, Liu Y, Gu Q. Fibrin facilitates mesenchymal stem cells to ameliorate rats with polycystic ovary syndrome. *Applied Sciences (Switzerland).* 2020 May 1;10(10).
26. Huang J, Tan Q, Tai N, Pearson JA, Li Y, Chao C, et al. IL-10 Deficiency Accelerates Type 1 Diabetes Development via Modulation of Innate and Adaptive Immune Cells and Gut Microbiota in BDC2.5 NOD Mice. *Front Immunol.* 2021;12(July):1–13.
27. Kong L, Wang Q, Jin J, Xiang Z, Chen T, Shen S, et al. Insulin resistance enhances the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in ovarian granulosa cells. *PLoS One.* 2017 Nov 1;12(11).
28. Prayitno GD, Lestari K, Sartika CR, Djuwantono T, Widjaya A, Muharam R, et al. Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment: A Systematic Review. *Medicines.* 2022 Dec 23;10(1):3.
29. Kumar NP, Moideen K, George PJ, Dolla C, Kumaran P, Babu S. Coincident diabetes mellitus modulates Th1-, Th2-, and Th17-cell responses in latent tuberculosis in an IL-10- and TGF- β -dependent manner. *Eur J Immunol.* 2016;46(2):390–9.
30. Mesquita I, Ferreira C, Barbosa AM, Ferreira CM, Moreira D, Carvalho A, et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2018;112(June):16–20.
31. Abraham Gnanadass S, Divakar Prabhu Y, Valsala Gopalakrishnan A. Association of metabolic and inflammatory markers with polycystic ovarian syndrome (PCOS): an update. Vol. 303, *Archives of Gynecology and Obstetrics.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 631–43.
32. Huang YH, Chen MH, Guo QL, Chen ZX, Chen QD, Wang XZ. Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis. *Cell Signal.* 2020;66(October 2019):109445.
33. Lee H, Pal SK, Reckamp K, Figlin RA, Yu H. STAT3: A Target to Enhance Antitumor Immune Response. In 2010. p. 41–59.

34. Kottaiswamy A, Kizhakeyil A, Padmanaban AM, Mirza FB, Vijay VR, Lee PS, et al. The Citrus Flavanone Hesperetin Induces Apoptosis in CTCL Cells via STAT3/Notch1/NFκB-Mediated Signaling Axis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;20(12):1459–68.
35. Ma JH, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. Vol. 18, *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd.; 2020.
36. Maliqueo M, Sundström Poromaa I, Vanky E, Fornes R, Benrick A, Åkerud H, et al. Placental STAT3 signaling is activated in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2015 Mar 1;30(3):692–700.
37. Wang H, Feng X, Wang T, Pan J, Zheng Z, Su Y, et al. Role and mechanism of the p-JAK2/p-STAT3 signaling pathway in follicular development in PCOS rats. *Gen Comp Endocrinol*. 2023 Jan 1;330.
38. Shao S, Wang H, Shao W, Liu N. MiR-199a-5p stimulates ovarian granulosa cell apoptosis in polycystic ovary syndrome. *J Mol Endocrinol*. 2020 Nov 1;65(4):187–201.
39. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12(2):218–26.
40. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems*. 2018;
41. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. 2011;(December 2011).
42. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina*. 2019;38(3):164.
43. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1–10.
44. Naguib YW, Cui Z. *Nanomedicine : The Promise*. 2014;135–56.
45. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep*. 2016;2(2):168–73.
46. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).

47. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M, et al. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(3):305–10.
48. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*. 2014;12(1):1–14.
49. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019;8(5):467.
50. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552.
51. Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H, et al. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–8.
52. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY, et al. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2017;116(5):351–8.
53. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004;36(8):1482–91.
54. Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct interaction with Smad4 protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(12):8737–49.
55. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(6 24-6):1196–202.
56. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):1–15.
57. Peitsidis P, Agrawal R. Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: A systematic review. Vol. 20, *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd; 2010. p. 444–52.

58. Guruvaiah P, Govatati S, Reddy TV, Lomada D, Deenadayal M, Shivaji S, et al. The VEGF +405 G>C 5' untranslated region polymorphism and risk of PCOS: a study in the South Indian Women. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Sep 23;31(10):1383–9.
59. Di Pietro M, Pascuali N, Parborell F, Abramovich D. Ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome. Vol. 155, *Reproduction*. BioScientifica Ltd.; 2018. p. R199–209.
60. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina.* 2019;38(3):164–71.
61. Almawi WY, Gammoh E, Malalla ZH, Al-Madhi SA. Analysis of VEGFA variants and changes in VEGF levels underscores the contribution of VEGF to polycystic ovary syndrome. *PLoS One.* 2016 Nov 1;11(11).
62. Zhao J, Li D, Tang H, Tang L. Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with polycystic ovarian syndrome risk: A meta-analysis. Vol. 18, *Reproductive Biology and Endocrinology*. BioMed Central Ltd.; 2020.
63. Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules.* 2020;10(7):1–15.
64. Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupár J, Yang X, et al. TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene.* 2013;32(12):1549–59.
65. Schülke S. Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Front Immunol.* 2018 Mar 19;9(MAR).
66. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. 2010. p. 170–81.
67. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol.* 2018;9(December):1–17.
68. Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2012;1820(10):1693–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.011>
69. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, Amansyah F, Amansyah F, Berlian MA, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Res.* 2021 Mar 22;10:228.

70. Walter MR. The molecular basis of IL-10 function: From receptor structure to the onset of signaling. Vol. 380, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Verlag; 2014. p. 191–212.
71. Putra A. BASIC MOLECULAR STEM CELL. Semarang: Unisulla Press; 2019. 400 p.
72. Prayitno GD, Lestari K, Sartika CR, Djuwantono T, Widjaya A, Muharam R, et al. Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment: A Systematic Review. Medicines. 2022 Dec 23;10(1):3.
73. Kong L, Wang Q, Jin J, Xiang Z, Chen T, Shen S, et al. Insulin resistance enhances the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in ovarian granulosa cells. PLoS One. 2017 Nov 1;12(11).
74. Wilson EB, Kidani Y, Elsaesser H, Barnard J, Raff L, Karp CL, et al. NIH Public Access. 2013;11(5):481–91.
75. Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. 2012;133(1):11–21.
76. Mühl H, Dhingra S, Booz GW, Goren NB, Cevey AC, Penas FN, et al. IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org. 2019;1:1267.
77. Chugh RM, Park H soo, El Andaloussi A, Elsharoud A, Esfandyari S, Ulin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10. Stem Cell Res Ther. 2021 Dec 1;12(1).
78. Mühl H, Dhingra S, Booz GW, Goren NB, Cevey AC, Penas FN, et al. IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org. 2019;1:1267.
79. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nature Reviews Immunology. 2010;10(3):170–81.
80. Li Y, Guo J, Deng S, Gao Z, Liu Y, Gu Q. Fibrin facilitates mesenchymal stem cells to ameliorate rats with polycystic ovary syndrome. Applied Sciences (Switzerland). 2020 May 1;10(10).
81. Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF-κB pathway. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2012 Oct;1820(10):1693–703.

82. Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility. Vol. 9, Cells. NLM (Medline); 2020.
83. Liao B, Qiao J, Pang Y. Central Regulation of PCOS: Abnormal Neuronal-Reproductive-Metabolic Circuits in PCOS Pathophysiology. *Frontiers in Endocrinology*. 2021.
84. Gleicher N, Darmon S, Patrizio P, Barad DH. Reconsidering the Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Biomedicines*. 2022;
85. Rudnicka E, Kunicki M, Calik-Ksepka A, Suchta K, Duszewska A, Smolarczyk K, et al. Anti-müllerian hormone in pathogenesis, diagnostic and treatment of PCOS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
86. Kałużna M, Człapka-Matyasik M, Wachowiak-Ochmańska K, Moczko J, Kaczmarek J, Janicki A, et al. Effect of central obesity and hyperandrogenism on selected inflammatory markers in patients with pcos: A whtr-matched case-control study. *J Clin Med*. 2020;
87. Dabravolski SA, Nikiforov NG, Eid AH, Nedosugova L V., Starodubova A V., Popkova T V., et al. Mitochondrial dysfunction and chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
88. Rudnicka E, Suchta K, Grymowicz M, Calik-ksepka A, Smolarczyk K, Duszewska AM, et al. Chronic low grade inflammation in pathogenesis of pcos. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
89. Li N, Wang X, Wang X, Yu H, Lin L, Sun C, et al. Upregulation of FoxO 1 signaling mediates the proinflammatory cytokine upregulation in the macrophage from polycystic ovary syndrome patients. *Clin Lab*. 2017;
90. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018.
91. Cosma NC, Üsekes B, Otto LR, Gerike S, Heuser I, Regen F, et al. M1/M2 polarization in major depressive disorder: Disentangling state from trait effects in an individualized cell-culture-based approach. *Brain Behav Immun*. 2021;
92. Cutolo M, Campitiello R, Gotelli E, Soldano S. The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Frontiers in Immunology*. 2022.
93. Ono Y, Nagai M, Yoshino O, Koga K, Osuga Y, Fujii T, et al. The role of m1, m2 macrophage(MΦ)in folliculogenesis. *Reprod Immunol Biol*. 2018;
94. Ono Y, Nagai M, Yoshino O, Koga K, Kobayashi M, Ito M, et al. M1 macrophages are involved in folliculogenesis and M2 macrophages play an essential role for successful implantation. *J Reprod Immunol*. 2017;
95. Ono Y, Nagai M, Yoshino O, Koga K, Nawaz A, Hatta H, et al. CD11c+ M1-like macrophages (MΦs) but not CD206+ M2-like MΦ are involved in folliculogenesis in mice ovary. *Sci Rep*. 2018;

96. Altındağ F. Silymarin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by downregulating TNF- α and NF- κ B and by upregulating IL-10. *J Exp Clin Med*. 2022;
97. Chen E, Liu G, Zhou X, Zhang W, Wang C, Hu D, et al. Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *FASEB J*. 2018;
98. Strickson S, Emmerich CH, Goh ETH, Zhang J, Kelsall IR, MacArtney T, et al. Roles of the TRAF6 and Pellino E3 ligases in MyD88 and RANKL signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;
99. Mühl H, Dhingra S, Booz GW, Goren NB, Cevey ÁC, Penas FN, et al. IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Front Immunol* | www.frontiersin.org [Internet]. 2019;1:1267. Available from: <http://www.frontiersin.org>
100. Pang QM, Yang R, Zhang M, Zou WH, Qian NN, Xu QJ, et al. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Macrophage Plasticity through the IL-10/STAT3 Pathway. *Stem Cells Int*. 2022;

