

**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HIPOKSIA*
MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI
GEN IL-10 DAN STAT-3**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Luka Superfisial yang Terinfeksi Bakteri
Staphylococcus aureus)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

Ida Ayu Maharani

MBK 2118010258

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

2024

TESIS

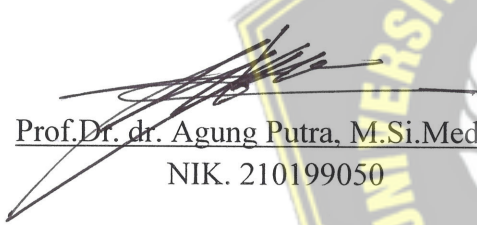
**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HIPOKSIA*
MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs) TERHADAP
EKSPRESI GEN IL-10 DAN STAT-3**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Luka Superfisial yang Terinfeksi
Bakteri *Staphylococcus aureus*)**


Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,



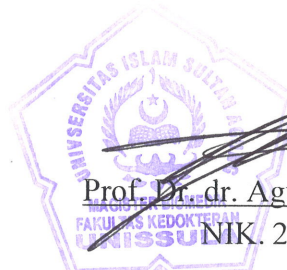
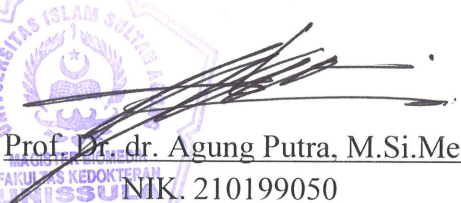
Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050



Dr. dr. H. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes
NIK. 210198046



Mengetahui,
Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



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

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya 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, Mei 2024



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, tesis penulis yang berjudul, **“PENGARUH PEMBERIAN GEL SECRETOME HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI GEN IL-10 DAN STAT-3 (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Luka Superfisial yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*)”** bisa diselesaikan. Tesis ini disusun untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan saya untuk mengambil dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
3. Dr.dr.H.Joko Wahyu Wibowo,M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia memberikan waktu dan pikiran untuk membantu penulis selama proses penulisan tesis.

4. Prof.Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K) selaku penguji I , Dr.dr. Pasid Harlisa, Sp.KK., FINSDV selaku penguji II dan Dr.dr.Atina Hussana Msi Apt selaku penguji III, yang telah berkenan menguji dan memberikan saran kritik membangun dalam penyusunan tesis ini
5. Semua dosen di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah sangat membantu dalam proses penyusunan tesis.
6. Suami dan anak-anak kebanggaan ibu : Syifa, Adel, Bimo terimakasih dukungan dan pengertiannya.
7. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research): Mba Salindri, mas Ariq,mas Iffan, mas Hussen, mas Ardi, drh Ghazi, mas Oky terimakasih atas bantuan dan bimbingannya.
8. Penulis berterima kasih kepada semua orang yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari masih ada kesalahan yang belum diperbaiki selama proses penyusunan penelitian ini. Karena itu, saran darimanapun akan diterima. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi banyak orang.

Semarang, Juni 2024

(Ida Ayu Maharani)

ABSTRAK

Latar belakang: Luka superficial pada kulit yang terinfeksi yaitu infeksi yang terjadi di permukaan kulit epidermis (superficial) dan telah terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen seperti *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat respon stres oksidatif. SH-MSCs dapat menghambat respon inflamasi melalui peningkatan ekspresi IL-10 dan STAT 3 pada tikus luka superficial. **Tujuan:** Membuktikan gel *Secretom Hipoksia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen IL 10 dan STAT 3 pada luka superficial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* dengan *post test control group*. Kelompok K2, K3, P1 dan P2 tikus model infeksi superficial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*, sedangkan pada kelompok K1 kelompok sehat. Pada K2 sebagai kontrol negatif (perlakuan 100 mg base gel), K3 sebagai kontrol positif (Tikus model Infeksi Superfisial dengan perlakuan pemberian gentamicin topical), sedangkan P1 (Tikus model Infeksi Superfisial dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 25%) dan P2 Tikus model Infeksi Superfisial dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 50%). Ekspresi gen IL-10 dan STAT 3 diuji menggunakan uji *Mann Whitney Test*.

Hasil: Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi terdapat perbedaan gen IL-10 pada kelompok P1 sig. ($p = 0,048$) dan P2 sig. ($p = 0,000$) dibanding K2, serta terdapat perbedaan pada ekspresi gen STAT3 kelompok P1 dan P2 dibanding K3 sig. ($p = 0,000$) setelah diberikan perlakuan.

Kesimpulan: Pemberian gel *Secretom Hipoksia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) berpengaruh meningkatkan ekspresi gen IL 10 dan STAT 3 pada luka superficial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

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

ABSTRACT

Background: Superficial skin wounds infected with pathogens such as *Staphylococcus aureus* can lead to the production of Reactive Oxygen Species (ROS) due to the oxidative stress response. Secretome from Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) can inhibit the inflammatory response by increasing the expression of IL-10 and STAT3 in mice with superficial wounds. **Objective:** To demonstrate the effect of SH-MSC gel on the expression of IL-10 and STAT3 genes in superficial wounds infected with *Staphylococcus aureus*.

Method: In vivo experimental research with post test control group. Groups K2, K3, P1 and P2 were superficial infection model mice infected with *Staphylococcus aureus* bacteria, while group K1 was a healthy group. In K2 as a negative control (100 mg base gel treatment), K3 as a positive control (Superficial Infection model mice treated with topical gentamicin), while P1 (Superficial Infection model mice with a 25% dose of SH-MSCs gel) and P2 model mice Superficial Infection by administering a 50% dose of SH-MSCs gel. IL-10 and STAT 3 gene expression was tested using the Mann Whitney Test.

Results: The study showed a significant difference in IL-10 gene expression in group P1 ($p = 0.048$) and group P2 ($p = 0.000$) compared to group K2. Additionally, there was a significant difference in STAT3 gene expression in groups P1 and P2 compared to group K3 ($p = 0.000$) after treatment.

Conclusion: The application of SH-MSC gel significantly increases the expression of IL-10 and STAT3 genes in superficial wounds infected with *Staphylococcus aureus*.

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

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN DEWAN PENGUJI.....	iii
PERNYATAAN	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR SIGKATAN	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
1.5 Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Interleukin 10 (IL 10).....	9
2.1.1 Pengertian	9
2.1.2 Protein, Gen dan Ekspresi	10
2.1.3 Jalur Sinyal Produksi IL 10	11
2.1.4 Jalur Sinyal dan Mekanisme kerja IL 10	13
2.2 STAT 3 (<i>Signal Transduction and Transcription 3</i>)	15
2.2.1 Definisi	15
2.2.2 Mekanisme Jalur STAT 3	16
2.3 Mesenchymal Stem Cells.....	18
2.3.1 Definisi	18
2.3.2 Sumber dan Karakteristik	19
2.4 Secretom MSCs	22
2.5 Hypoxia	25
2.6 Sediaan Gel	26
2.7 Farmakokinetik Obat Topikal	30
2.7.1 Jalur Penetrasi Sediaan Topikal	31

2.7.2	Absorpsi Sediaan Topical Secara Umum	31
2.8	Hubungan Secretom Hypoxia Mscs Terhadap IL 10 Dan STAT 3.....	33
BAB III	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	34
3.1	Kerangka Teori.....	36
3.2	Kerangka Konsep	37
3.3	Hipotesis.....	37
BAB IV	METODE PENELITIAN	38
4.1	Jenis Penelitian Dan Rancangan Penelitian	38
4.2	Variable Penelitian Dan Definisi Operasional	39
4.2.1	Variable Penelitian	39
4.2.2	Definisi Operasional	39
4.3	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	40
4.3.1	Subjek Penelitian	41
4.3.2	Sampel Penelitian	41
4.3.3	Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	42
4.3.4	Besar Sampel.....	42
4.4	Alat dan Bahan	43
4.4.1	Alat	43
4.4.2	Bahan	44
4.5	Cara Penelitian.....	45
4.5.1	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	45
4.5.2	Prosedur Metode Isolasi MSCs	45
4.5.3	Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31.....	46
4.5.4	Proses Hipoksia dan Filtrasi SH MSC.....	47
4.5.5	Pembuatan Sediaan Gel	48
4.5.6	Pembuatan Model Luka	48
4.5.7	Terminasi dan Pengambilan Jaringan.....	50
4.5.8	Ekstraksi dan Sintesis cDNA	50
4.5.9	Pembacaan IL 10 dan STAT 3 dengan qRT -PCR.....	52
4.5.10	Pembuatan Block Parafin.....	53
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian.....	54
4.7	Analisis Data.....	55
4.8	Alur Penelitian	55
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	56
5.1	Hasil.....	57
5.1.1	Isolasi Secretom Hipoksia MSC	57
5.1.2	Validasi Model Luka Infeksi Superficial.....	58
5.1.3	Efek Pemberian Gel SH-MSCs dosis 25% dan 50% terhadap Ekspresi gen IL 10 dan STAT 3.....	61
5.2	Pembahasan Hasil Penelitian	66

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	70
6.1 Kesimpulan	70
6.2 Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN	76



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
CSIF	: <i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECM	: <i>Extra Celullar Matrix</i>
EDA-FN	: <i>Extra-domain A containing fibronectin</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IKB	: <i>I Kappa Beta</i>
IKK	: <i>IkB kinase</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
LAP	: <i>Latency Associated Peptide</i>
LIF	: <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>

MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MDC	: <i>Monocyte-Derived Chemokine</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-1A	: <i>Macrophage Inflammatory Protein -1A</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal stem cell</i>
NK	: <i>Natural Killer Cell</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p50 p65	: <i>Heterodimer NFκB</i>
PAF	: <i>Platelet Activating Factor</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
SH-MSC	: <i>Secretom Hipoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
SHP 1	: <i>Src Homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase 1</i>
STAT 3	: <i>Signal Transduction and Transcription 3</i>
Th2	: <i>T helper 2</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1</i>

TRP-2 : *Tyrosinase-related Protein-2*
TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*
TGF- β 1 : *Transforming Growth Factor beta 1*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*
UC MSC CM : *Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium*
UVB : *Ultra Violet*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur Interleukin 10	14
Gambar 2.2 Sumber Mesenchymal Stem Cell	19
Gambar 2.3 Secretom MSC	25
Gambar 2.4 Lingkungan Hypoxia mengaktivasi MSC.....	26
Gambar 3.1 Kerangka Teori	36
Gambar 3.2 Kerangka konsep.....	37
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	38
Gambar 4.2 Alur Penelitian	55
Gambar 5.1 Isolasi MSCs dengan sel berbentuk <i>spindle-like</i> pada pembesaran 100x	57
Gambar 5.2. Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD3.....	58
Gambar 5.3 (A) 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)	59
Gambar 5.4 Morfologi MSCs sebelum dan setelah kondisi hipoksia	60
Gambar 5.5 Ekspresi Gen IL-10	63
Gambar 5.6 Ekspresi Gen STAT 3	64

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas penelitian	6
Tabel 4.1 Reagen yang digunakan dalam <i>flowcytometri</i>	42
Tabel 5.1. Hasil Analisis konsentrasi skretom.....	62
Tabel 5.2. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen IL 10 dan STAT 3	64
Tabel 5.3. Uji Mann Whitney Ekspresi gen IL 10 dan STAT 3	65



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka superfisial pada kulit yang terinfeksi yaitu infeksi yang terjadi di permukaan kulit epidermis dan telah terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri, jamur, atau virus^{1,2}. Infeksi yang paling umum sering terjadi disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram-positif komensal dan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Bakteri *Staphylococcus aureus* masuk pada area luka terbuka seperti luka sayatan². Kondisi kebersihan yang buruk, baik pada luka maupun area sekitarnya, meningkatkan risiko infeksi. Kontaminasi dengan bakteri *Staphylococcus* dari lingkungan atau permukaan yang terkontaminasi dapat memperburuk risiko infeksi^{2,3}. Kondisi medis tertentu, seperti diabetes, penyakit vaskular perifer, atau penurunan sistem kekebalan tubuh, dapat meningkatkan risiko infeksi luka. Pada kondisi-kondisi ini, penyembuhan luka dapat terganggu dan kulit menjadi lebih rentan terhadap infeksi^{4,5}. Penggunaan antibiotik dalam jangka panjang atau secara berulang-ulang dapat mengganggu keseimbangan bakteri normal pada kulit dan menyebabkan pertumbuhan berlebihan bakteri patogen, termasuk *Staphylococcus*. Jumlah morbiditas dan mortalitas meningkat karena infeksi memperlambat penyembuhan luka⁶. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat respon stres oksidatif. ROS dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka, baik

secara positif maupun negatif⁷. Kelebihan ROS memicu transduksi sinyal dan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), sebuah mediator inflamasi. Respon inflamasi yang dimediasi oleh heterodimer subunit p50 dan p65. Berbagai sitokin inflamasi, kemokin, dan faktor transkripsi dibuat oleh aktivasi pensinyalan NF- κ B. Mereka memulai dan mengontrol reaksi inflamasi serta mengatur respons host terhadap kerusakan jaringan^{8,9}. NF- κ B menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), *interleukin 1* (IL-1), dan *interleukin-6* (IL-6) yang menyebabkan inflamasi kulit. Aktivasi *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT 3) dapat dipicu oleh berbagai faktor, seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan IL-6. Aktivasi faktor ini dapat memicu produksi sitokin pro-inflamasi, yang meningkatkan respons inflamasi⁹. Ketika IL-10 dan STAT 3 diaktifkan, mereka bekerja bersama untuk menghambat peradangan dengan mengurangi produksi sitokin proinflamasi, menghambat aktivasi sel imun, dan mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam respons imun¹⁰. *Conditioned medium mesenchymal stem cells* (CM-MSCs) mencegah inflamasi melalui hambatan jalur NF- κ B melalui pelepasan sitokin antiinflamasi¹¹. Kondisi hipoksia MSCs meningkatkan pelepasan sitokin dan *growth factor* dalam secretom¹².

Luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan masalah kesehatan serius, yang dapat menyebabkan komplikasi jika tidak diobati dengan tepat. *Staphylococcus aureus* adalah patogen yang sering ditemukan pada kulit manusia dan dapat menyebabkan banyak infeksi,

termasuk infeksi pada luka terbuka. Infeksi bakteri pada luka superfisial dapat menghambat proses penyembuhan dan meningkatkan risiko komplikasi seperti sepsis¹³. Infeksi bakteri pada kulit adalah alasan umum untuk kunjungan darurat. Anak-anak di bawah lima tahun dan orang dewasa di atas 65 tahun lebih sering terkena dibandingkan kelompok umur lainnya. Risiko infeksi meningkat jika perawatan luka kurang baik. Angka kejadian luka terus meningkat. Sebuah penelitian tahun 2014 menemukan bahwa 17,2 juta pasien rawat jalan dan rawat inap mengalami luka akut di rumah sakit saat ini. Luka yang tidak diobati dengan benar dapat terinfeksi oleh mikroorganisme dan menjadi luka yang bertahan lama. 2.21 dari 1000 orang menderita luka kronik¹⁴.

Beberapa penelitian preklinis menunjukkan bahwa Secretom Hypoxia MSCs (SH-MSCs) adalah medium kultur mesenchymal stem cell (MSCs) yang dikondisikan untuk hipoksia 5% dan mengalami proses filtrasi menggunakan teknik Tangential Flow Filtration (TFF). Selain itu, mereka mengandung berbagai sitokin anti-inflamasi, termasuk IL-10 dan Transforming Growth Factor beta (TGF- β)¹⁵. Peran MSC dengan IL-10 dan TGF- β berfungsi sebagai sitokin antiinflamasi yang kuat dalam mengendalikan respons inflamasi yang berlebihan. Secara khusus IL-10 melemahkan sinyal pro-inflamasi dengan menghambat pelepasan sitokin pro-inflamasi terutama *Interferon-gamma* (IFN- γ), IL-2, dan TNF- α ¹⁶. Studi klinis terdahulu menerangkan bahwa IL-10 dapat menghambat proses inflamasi melalui penahanan aktivasi NF- κ B¹⁷. Pada penelitian sebelumnya melaporkan pemberian gel topikal MSC-CM-S berhasil mempercepat

penyembuhan luka pada model jaringan eksisi kulit tikus. MSC-CM-S dapat meningkatkan kadar PDGF dan VEGF serta kepadatan fibroblas dalam proses penyembuhan luka eksisi⁹. Pemberian gel topikal secretome MSCs-CM dapat mempercepat penyembuhan luka pada model jaringan eksisi kulit tikus namun, Pemberian gel tersebut telah menunjukkan potensi dalam mengurangi peradangan dan mempromosikan penyembuhan luka pada beberapa kondisi inflamasi. Namun, untuk memahami dampak ini, penelitian lebih lanjut masih diperlukan, terutama terkait ekspresi gen IL 10 dan STAT 3.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian tersebut diatas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah: "Apakah terdapat pengaruh pemberian gel *Secretom Hipoksia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen IL 10 dan STAT -3 pada luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana gel SH-MSCs mempengaruhi ekspresi gen IL 10 dan STAT -3 pada luka superfisial yang terinfeksi *Staphylococcus aureus*."

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh gel SH MSCs dosis 25% terhadap peningkatan ekspresi gen IL 10 antar kelompok perlakuan

dibanding tikus model luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Membuktikan pengaruh gel SH MSCs dosis 50% terhadap peningkatan ekspresi gen STAT 3 antar kelompok perlakuan dibanding tikus model luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Diharapkan hasil penelitian ini akan meningkatkan pengetahuan tentang bagaimana SH-MSCs membantu ekspresi gen IL 10 dan STAT -3 pada tikus model luka superfisial yang terinfeksi *Staphylococcus aureus*.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan akan dapat memberikan manfaat *Secretom Hipoksia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) dalam memperbaiki inflamasi pada luka kondisi infeksi kulit superfisial serta dapat memberikan masukan bagi praktisi kedokteran untuk penelitian selanjutnya dan kegunaannya dalam hal klinis.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Ramadhanti O.W.,Putra A, Sadyah N.A.C., Subhan P., Hidayah N.,Prasetyo A.,2021	Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cell Hipoksia dan Normoksia Terhadap Ekspresi IL-10 pada Tikus Model Luka Eksisi	In Vivo, Eksperimental	H-MSCs dapat meningkatkan ekspresi serial IL10 yang mengarah pada perbaikan luka model tikus luka eksisi dibandingkan dengan N-MSCs
Novalia K.,Edi D., Chodidjah, Nasihun T.,Putra A,2018	Pengaruh Medium Conditional MSC yang diaktivasi TNF- α terhadap kadar PDGF dan jumlah fibroblas (pemberian secara topikal dan kombinasi injeksi subkutan pada eksisi kulit tikus galur wistar)	In Vivo Eksperimental	Pemberian MSC-CM yang diaktivasi TNF- α secara topikal lebih signifikan.
Berlian MA,Alif I, Subhan P,Handoyo P., Husain S.A., Sidiq D,Adityani R, 2022	<i>Topical Gel of Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium-induced Serum Injury Accelerates Wound Healing in Skin Excision Tissue</i>	In Vivo Eksperimental	Gel topikal MSC-CM-S efektif mempercepat penutupan luka dengan meningkatkan kadar PDGF dan VEGF pada tikus full-thickness skin defect.
Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A, 2019	<i>Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells</i>	In Vivo Eksperimental	Hipoksia MSC meningkatkan proliferasi dan stemness MSC serta sitokin lebih optimal
Lombardi F,Palumbo P,Augello FR,Cifone MG, Cinque B, Giuliani M, 2019	<i>Secretome of Adipose Tissue-Derived Stem Cells (ASCs) as a Novel Trend</i>	In Vivo Eksperimental	Membandingkan dua teknik utama persiapan vesikel ekstraseluler: Ultracentrifugasi dan presipitasi,

	<i>in Chronic Non-Healing Wounds: An Overview of Experimental In Vitro and In Vivo Studies and Methodological Variables</i>		menunjukkan efek percepatan ASC-CM atau ASC-Evs pada proses penyembuhan luka dan neovaskularisasi
H.A.,Dwiarlind Balaji S, Steen E, Narmoneva D A, 2022	<i>IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3</i>	Invitro Eksperimental	Overekspresi IL-10 pada luka kulit meningkatkan ekspresi VEGF dan CXCL12 oleh fibroblas di lokasi cedera kulit serta mendukung
LilMeirong, Luan Fuxin, YaliZhao, Haojie Hao, Liu Jiejie, Dong Liang, 2017	<i>Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars</i>	In vivo Eksperimental	Penyembuhan luka lebih cepat dan bekas luka lebih sedikit setelah diobati dengan UC-MS-CM

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian UC MSC CM mendorong penyembuhan luka secara in vivo. Penyembuhan luka lebih cepat dan bekas luka lebih sedikit setelah diobati dengan UC-MSC-CM¹⁸. Pada penelitian yang sebelumnya, menggunakan medium yang diperoleh dari proses kultur MSC dengan modifikasi lingkungan hipoksia mengungkapkan kondisi hipoksia MSCs meningkatkan produksi sitokin yang di sekresikan¹⁹. Pada penelitian terdahulu menggunakan *Medium Conditional* MSC yang diaktivasi TNF- α secara topikal lebih signifikan terhadap kadar PDGF dan jumlah fibroblas²⁰. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana pemakaian topikal gel SH MSCs pada tikus luka superficial yang diinduksi bakteri *Staphulococous aureus* dan dianalisis ekspresi gen IL 10 dan STAT 3. Penelitian terdahulu mengungkapkan pemberian *Hipoksia Mesenchymal Stem Cell* secara topical pada luka eksisi dapat meningkatkan ekspresi IL-10, yang menghasilkan luka yang lebih baik pada tikus dengan luka eksisi dibandingkan dengan N-MSC²¹. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa menggunakan gel topikal MSC-CM-S efektif mempercepat penutupan luka dengan meningkatkan kadar PDGF dan VEGF pada tikus *full-thickness skin defect*²². Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH MSCs akan diberikan pada tikus luka superficial yang diinduksi bakteri *Staphulococous aureus* dan dianalisis ekspresi gen IL 10 dan STAT 3.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin IL-10

2.1.1. Pengertian

Sitokin dengan sifat anti-inflamasi yang kuat, interleukin-10 (IL-10) bertanggung jawab untuk mengontrol respons kekebalan tubuh terhadap patogen, mencegah cedera, dan menjaga homeostasis normal.

Peningkatan imunopatologi sebagai respons terhadap infeksi dan risiko berkembangnya banyak penyakit autoimun dikaitkan dengan disregulasi IL-10. Interleukin-10 pertama kali dikenal sebagai faktor penghambat sintesis sitokin (CSIF), yang dihasilkan oleh sel Th2 dan menghambat aktivasi dan produksi sel Th1. Kemampuan IL-10 untuk menghambat produksi sitokin baik oleh sel T maupun sel pembunuh alami (NK) ditemukan secara tidak langsung melalui penghambatan fungsi sel makrofag dan monosit¹⁰. Penelitian lebih lanjut selanjutnya menunjukkan bahwa IL-10 mampu secara luas menghambat aktivasi fungsi makrofag/monosit, termasuk sintesis monokin, produksi oksida nitrat, dan ekspresi MHC kelas II dan molekul berharga seperti IL-12 dan CD-80/CD86^{10,23}. IL-10 merupakan komponen kunci dari sistem sitokin yang berfungsi mengatur dan menekan ekspresi sitokin inflamasi selama fase pemulihan infeksi sehingga mengurangi kerusakan akibat sitokin inflamasi. IL-10 berikatan dengan IL-10R, suatu reseptor dimerik yang

terdiri dari rantai IL-10R1 berafinitas tinggi yang diekspresikan terutama pada leukosit dan unik untuk pengenalan IL-10, dan rantai IL-10R2 yang diekspresikan ada di mana-mana dan terlibat dalam pengenalan. Sitokin selain IL-10R. 10 keluarga (IL-26, IL-28A, IL-28B, IL-22, dan IL-29)²⁴.

Interleukin-10 dapat menghambat produksi IL-6, IL-12, IL-18, TNF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF dan PAF dari monosit/makrofag menjadi aktif. Karena sitokin bekerja secara sinergis dalam jalur dan proses inflamasi serta meningkatkan respon inflamasi dengan mengaktifkan mediator yang lebih rendah seperti kemokin, prostaglandin, dan PAF, efek penghambatan IL-10 terhadap produksi IL-1 dan TNF sangat penting untuk mencegah peradangan. Selain itu, interleukin-10 membatasi produksi kemokin oleh monosit yang diaktifkan, yang bertanggung jawab atas rekrutmen monosit, neutrofil, limfosit T, dan sel dendritik.

2.1.2 Protein, Gen dan Ekspresi IL-10

Peptida sintetik yang berasal dari rangkaian asam amino IL-10 telah terbukti meniru aktivitas IL-10 baik secara in vitro maupun in vivo. Peptida IL-10 ini, yang terdiri dari 9 asam amino dengan fusi C-terminal IL-10, diperkirakan dapat membatasi ekspresi HLA-DR dan produksi sitokin IL-8 pada monosit manusia serta menghambat produksi TNF oleh sel T CD8+. Selain itu, peptida ini meningkatkan produksi IL-1RA oleh monosit, yang kemudian menarik sel T CD8+ dan merangsang proliferasi sel mast pada tikus sebagai respons terhadap IL-4²⁶.

IL-10 dikodekan oleh gen IL-10 manusia yang memiliki ukuran 4,7 kb dan terletak pada kromosom 1, tepatnya di daerah 1q31-32. Gen ini terdiri dari 5 ekson dan 4 intron. Aktivasi ekspresi gen IL-10 menghasilkan mRNA sekitar 2 kb (hIL-10) dan sekitar 1,4 kb (mIL-10). Interleukin-10 diekspresikan dalam berbagai jenis sel, sering kali sebagai respons terhadap aktivasi sinyal yang berbeda-beda pada tiap jenis sel, seperti limfosit T, leukosit monosit, dan makrofag²⁷. Aktivasi patogen pada sel dendritik dan makrofag melibatkan pengenalan produk turunan patogen oleh reseptor pengenalan pola (PRR) yang memicu ekspresi sitokin dan faktor lainnya²⁸. Makrofag dan sel dendritik dapat mengekspresikan IL-10 secara *in vitro* setelah diaktifkan oleh PRR tertentu. Agonis toll-like receptor-2 (TLR-2) diyakini memiliki peran khusus dalam merangsang ekspresi IL-10 oleh sel penyaji antigen. Aktivasi melalui TLR menginduksi makrofag untuk menghasilkan IL-10 dalam jumlah tinggi, sementara sel dendritik myeloid hanya menghasilkan IL-10 dalam jumlah sedang, dan sel dendritik plasmacytoid (pDCs) hampir tidak menghasilkan IL-10 yang terdeteksi. Selain itu, IL-10 juga dapat dirangsang melalui jalur TLR-independen, misalnya melalui C-type lectins DC-specific ICAM³²⁹. Beberapa faktor transkripsi seperti *transducers and activators of transcription* (STAT) dan *nuclear factor* κ -B (NF- κ B) merupakan faktor penting dalam regulasi IL-10. Berbagai faktor ini diekspresikan pada tipe sel efektor dan non-imun, serta berperan dalam mengatur regulasi faktor inflamasi^{30,31}.

2.1.3 Jalur Transmisi Sinyal Produksi IL-10

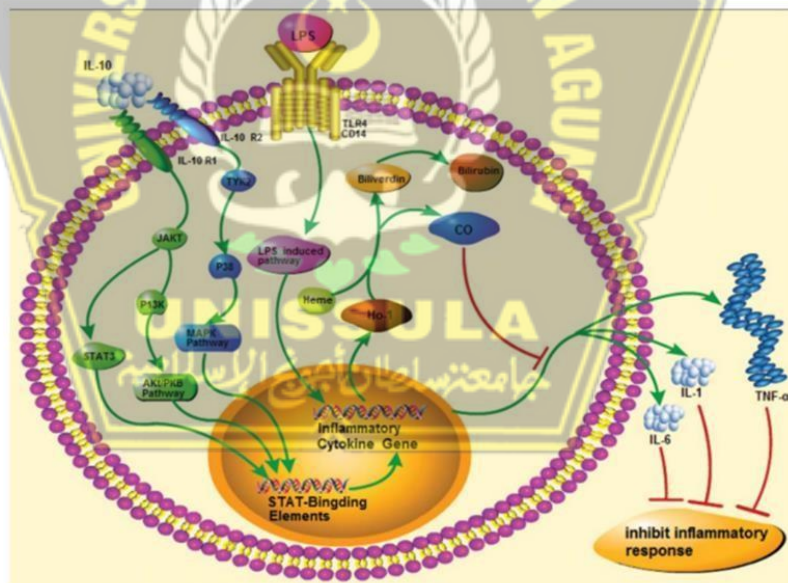
Aktivasi patogen pada sel dendritik dan makrofag melibatkan pathogen-derived products oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) yang menginduksi ekspresi sitokin dan faktor lainnya. Makrofag dan sel dendritik dapat mengekspresikan IL-10 *in vitro* setelah aktivasi PRR spesifik. *Agonis toll-like receptor-2* (TLR-2) diketahui secara spesifik berfungsi untuk merangsang ekspresi IL-10 oleh sel penyaji antigen. Aktivasi makrofag melalui TLRs menghasilkan produksi IL-10 tingkat tinggi, sedangkan sel dendritik myeloid hanya menghasilkan IL-10 dalam jumlah sedang dan sel dendritik plasmacytoid (pDCs) tidak menghasilkan IL-10 pada tingkat IL-10 yang terdeteksi²². Selain itu, IL-10 juga dapat distimulasi oleh rangsangan independen TLR seperti C- type lectins DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN; juga dikenal sebagai CLEC4M) dan dectin1 (juga dikenal sebagai CLEC7A). Setelah ligasi TLR, kaskade pensinyalan berikutnya yang diaktifkan adalah domain Toll/IL-1 receptor (TIR) yang mengandung molekul adaptor seperti diferensiasi protein respon primer myeloid 88 (MYD88) dan domain TIR yang berisi molekul adaptor yang mengaktifkan IFN- β (TRIF; juga dikenal sebagai TICAM1). Hal ini menyebabkan produksi IL-10 dan sitokin inflamasi. Pensinyalan TLR dengan MYD88 mengarah pada aktivasi protein kinase teraktivasi mitogen (MAPKs) serta faktor nuklir- κ B (NF- κ B)³².

2.1.4 Mekanisme Kerja dan Jalur Sinyal IL-10

Jalur pensinyalan IL-10 dicirikan sebagai sistem jalur JAK/STAT dimana pensinyalan ini dapat menghasilkan kekuatan pendorong utama untuk ekspresi profil genetik imunomodulator dengan efek menghambat mediator proinflamasi, menurunkan presentasi antigen dan fagositosis, dan meningkatkan fungsi penghambatan, toleransi serta scavenger dalam jumlah besar, terutama monosit dan makrofag, yang menjadi target IL-10^{8,32}.

Interaksi antara IL-10/IL-10R yang terkait dengan family Jak1 dan Tyk2 yang terkait dengan IL-10R1 dan IL-10R2. Interleukin-10 merangsang fosforilasi tirosin dan aktivasi faktor transkripsi laten STAT3, STAT1 dan sel non-makrofag bersama dengan STAT5. Makrofag pada tikus Jak1^{-/-} tidak merespons IL-10, hal ini menunjukkan bahwa Jak1 berperan penting dalam pensinyalan IL-10³³. Penghambatan IL-10 pada transkripsi gen yang diinduksi IFN pada monosit manusia dikaitkan dengan penghambatan IL-10 pada aktivasi yang diinduksi IFN dan dengan fosforilasi tirosin STAT1³⁴. Penghambatan ini mengurangi kadar IFN lebih dari IL-10, menunjukkan adanya persaingan atau interaksi antara IL-10 dan IFN yang disebabkan oleh mekanisme intraseluler. Konsisten dengan kemampuannya menghambat aktivasi makrofag dan produksi monokin, IL-10 juga menghambat aktivasi NF- κ B. Penghambatan aktivasi NF- κ B pada sel T CD3⁺ juga telah dilaporkan, meskipun terjadi secara tidak langsung melalui sel penyaji antigen. Berdasarkan data in vitro yang

berkorelasi dengan pengamatan in vivo dari penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa penghambatan aktivasi NF- κ B oleh IL-10 terjadi melalui setidaknya 2 jalur yang berbeda, khususnya kemungkinan dengan menghambat aktivasi I κ B kinase dan dengan menghambat NF- κ B aktivitas. IL-10 juga dilaporkan mengaktifkan AP-1 dan NF- κ B dalam sel T CD8+. Temuan ini berbanding terbalik dengan pengaruh IL-10 terhadap makrofag dan sel T CD4+ dimana IL-10 mempunyai kemampuan untuk menstimulasi diferensiasi dan aktivitas sitotoksik pada sel T CD8+ dan sel T. Sel NK yang menunjukkan perbedaan bermakna pada sel T CD4+ dan sel T CD4+ tanggapannya CD4+ dan sel CD8+ menjadi IL-10^{32,35}.



Gambar 2.1 Jalur mekanisme Interleukin 10

2.2. STAT 3

2.2.1 Definisi

STAT3 adalah faktor transkripsi yang dikodekan oleh gen STAT3 yang diaktifkan sebagai respons terhadap stimulasi IL-10. Aktivasi STAT3 diperlukan untuk pembaharuan diri sel punca embrionik oleh karena itu LIF dibutuhkan untuk mempertahankan status non diferensiasi dari sel punca. Sisi lain STAT 3 juga esensial untuk diferensiasi sel TH17 yang berimplikasi pada penyakit autoimun³⁶. Aktivasi STAT3 diperlukan untuk beberapa proses, antara lain sebagai respon anti-inflamasi berupa IL-10 yang memiliki efek anti-inflamasi pada makrofag, yang bermanifestasi sebagai penghambatan transkripsi sekitar 20% gen yang diinduksi lipopolisakarida (LPS). Respons antiinflamasi yang dimediasi IL-10/STAT3 adalah mekanisme penting untuk mengatur inflamasi. Ekspresi gen yang diinduksi IL-10 yaitu berupa STAT3 terlibat dalam ekspresi gen yang diinduksi IL-10. Stimulasi dengan IL-27 menginduksi IL-10 melalui STAT3 dan STAT5. Blokade STAT3 memiliki efek yang lebih nyata pada ekspresi IL-10 dibandingkan dengan blokade STAT5. STAT 3 diperlukan dalam proses toleransi imun yaitu dengan sumbu IL-10/STAT3 berkontribusi terhadap toleransi imun oleh timus dan sel T pengatur yang diturunkan dari perifer. Mutasi pada IL-10 atau reseptornya (IL-10RA), menyebabkan gangguan aktivasi STAT3, menyebabkan patologi autoinflamasi yang parah, contoh seperti pada penyakit kolitis. Singkatnya, aktivasi STAT3 diperlukan untuk respons anti-inflamasi,

ekspresi gen yang diinduksi IL-10, toleransi imun, dan penghambatan aktivasi dan proliferasi makrofag sebagai respons terhadap stimulasi IL-10³⁶.

2.2.2 Mekanisme Jalur STAT 3

Pensinyalan JAK/STAT memainkan peran penting dalam proliferasi sel, pemeliharaan sel induk, diferensiasi dan regulasi sistem kekebalan tubuh. *Janus Kinases* (JAKs) adalah protein yang terkait dengan domain sitoplasma dari beragam reseptor transmembran, terutama reseptor sitokin. Perubahan konformasi yang dipicu oleh pengikatan ligan-reseptor mengaktifkan JAK. Setelah diaktifkan, JAK memfosforilasi residu tirosin pada reseptor, menciptakan situs pengikatan untuk perekrutan STAT. Setelah berikatan dengan reseptor, STAT juga difosforilasi oleh JAK, fosforilasi ini memicu aktivasi STAT dan dimerisasi selanjutnya. Dimer STAT bertranslokasi ke nukleus di mana mereka bertindak sebagai faktor transkripsi gen target yang berbeda seperti CCND1, BIRC5 atau Mcl-1³⁶. Jalur JAK/STAT diatur di berbagai tingkatan: (1) tirosin fosfatase SHP1 dan SHP2 yang dapat melakukan defosforilasi JAK dan membatasi sinyal hilir (2) penekan pensinyalan sitokin (SOCS) dapat bersaing dengan STAT untuk mendapatkan tempat pengikatan pada reseptor dan mengganggu aktivitas JAK atau dapat menargetkan protein untuk degradasi proteasomal (3) penghambat STAT teraktivasi yang dapat mengganggu kemampuan pengikatan DNA STAT³⁷. LIF mengikat LIFR yang

kemudian mengaktifasi jalur sinyal transduksi JAK. JAK yang teraktivasi akan melakukan fosforilasi merekrut *signal transducer and activator of transcription* (STAT 3). STAT 3 translokasi menuju nukleus yang berperan sebagai faktor transkripsi pluripoten. LIF termasuk soluble molecule yang dapat mengikat reseptor LIFR, sehingga mengaktifasi STAT3 dan kemudian translokasi menuju nukleus untuk mentranskripsi gen terkait pembaharuan diri yang diperkuat dengan hambatan jalur MAPK^{36,38}. Aktivasi STAT3 selama perbaikan jaringan telah dipelajari secara luas karena peran pentingnya setelah cedera jaringan. STAT3 diaktifkan oleh respon inflamasi sebagai langkah pertama dalam penyembuhan luka. Selain itu, telah terbukti terlibat dalam langkah-langkah perbaikan luka selanjutnya, seperti yang terlihat pada penghapusan STAT3 spesifik epidermis, yang menghambat perbaikan epitel setelah cedera, menunjukkan bahwa STAT3 penting dalam epitelisasi ulang yang terjadi selama perbaikan luka. Diketahui bahwa dalam kondisi normal, STAT3 berperan aktif dalam kelangsungan hidup dan proliferasi sel. Namun, ia memiliki efek merugikan bila terus diaktifkan, berkontribusi terhadap banyak kondisi patologis. Demikian pula, proses penyembuhan dan perbaikan jaringan yang diatur dengan baik diperlukan untuk kelangsungan hidup banyak organisme multiseluler. Namun jika proses ini terus berlanjut maka akan menimbulkan fibrosis. Mengingat perannya yang terdokumentasi dengan baik dalam kerusakan dan perbaikan jaringan, tidak mengherankan bahwa aktivasi STAT3 yang

berkelanjutan mungkin memainkan peran penting dalam fibrosis. Aktivasi STAT3 telah terdeteksi di banyak jaringan fibrotik. Namun, mekanisme molekuler yang menjelaskan peran STAT3 dalam inisiasi dan perkembangan fibrosis belum sepenuhnya dipahami³⁹. Peran STAT3 dalam fibrosis umumnya mencerminkan perannya dalam kondisi patologis lain yang mengaktifkannya secara terus-menerus. Misalnya dalam karsinogenesis, STAT3 berperan penting dalam proliferasi sel, pencegahan apoptosis, induksi angiogenesis, dan peran dalam plastisitas sel, yang kesemuanya merupakan proses sel yang terlibat dalam perkembangan dan perkembangan fibrosis⁴⁰.

2.3. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2.3.1. Definisi

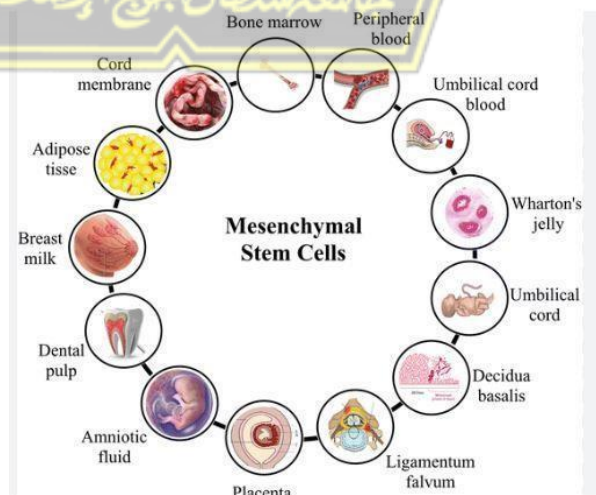
Sel induk mesenkim (MSCs) adalah sel berpotensi majemuk yang dapat berdiferensiasi menjadi sel matang lainnya seperti sel tulang, sel lemak, dan sel saraf. Sel induk mesenkim dapat diisolasi dari sejumlah jaringan, termasuk jaringan adiposa, folikel rambut, dan jeli Wharton dari tali pusat³⁸. Secara umum, MSCs didefinisikan sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan menyerupai fibroblas

atau sel berbentuk jarum. Secara fenotip, MSCs diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa penanda spesifik, termasuk CD44 dan CD29, tetapi mengekspresikan penanda CD31 dan CD45 bersifat osteogenik^{41,42}

2.3.2 Sumber dan Karakteristik

Pada awalnya sumber MSCs dianggap hanya dari beberapa jaringan seperti darah, epitel usus, tulang, kulit. Namun sekarang dapat ditemukan di jaringan tubuh manapun seperti pulpa gigi, cairan ketuban, tali plasenta. Saat ini, sumber utama MSCs adalah sumsum tulang dan jaringan adiposa³⁸.

Beberapa karakteristik yang dimiliki MSC termasuk kemampuan untuk meregenerasi diri sendiri dan kemampuan untuk mengubah jenis sel dewasa seperti miosit, adiposit, kondrosit, tenosit, dan osteoblas. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresikan beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit.



Gambar 2.2 Sumber mesenchymal stem cell (MSCs)

Sel Punca memiliki karakteristik sebagai berikut :

1. Memiliki kemampuan berdiferensiasi (untuk membedakan)

Sel induk dapat berkembang menjadi berbagai jenis sel dewasa, seperti neuron, kardiomyosit, sel otot rangka, sel pankreas, dll.

2. Kemampuan memperbaharui atau menciptakan kembali diri sendiri (self- regenerasi/self-renewal). Dalam hal ini, sel induk memiliki kemampuan untuk membuat salinan sel yang identik dengan dirinya melalui proses pembelahan sel.

Berdasarkan kemampuannya berdiferensiasi, Sel punca dapat dikelompokkan menjadi:

1. *Totipotent*. Sel induk, yang merupakan sel embrio awal yang dapat membentuk berbagai jenis sel, memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi semua jenis sel. Zigot dan morula adalah komponen sel punca yang memiliki sifat totipotensi
2. *Pluripotent*. Sel induk dapat berubah menjadi ektoderm, mesoderm, dan endoderm, tiga lapisan utama embrio, tetapi mereka tidak dapat berkembang menjadi jaringan ekstra-embriyonik seperti plasenta atau tali pusat. Sel induk embrionik yang dipisahkan dari massa sel bagian dalam dapat membedakan berbagai jenis sel somatik in vitro. Sel induk embrionik ini termasuk dalam kategori sel induk berpotensi majemuk.
3. *Multipotent*. Sel induk dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Misalnya, sel induk hematopoietik yang terdapat di sumsum tulang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel darah seperti sel darah merah, sel darah putih, dan trombosit. Contoh

lainnya adalah sel induk saraf yang memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi neuron dan sel glial. Pada jaringan dewasa, sel induk berpotensi majemuk hadir di jaringan dan organ untuk menggantikan sel yang hilang atau rusak.

4. *Unipotent*. Sel induk hanya dapat menghasilkan satu jenis sel. Namun berbeda dengan non-stem cell, sel punca unipotent mempunyai sifat mampu memperbaharui diri atau self-renew (self-regenerasi/self-renewal)³⁸.

Sel punca dibagi menjadi dua jenis berdasarkan sumbernya: sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Setiap jenis memiliki tujuan dan karakter yang berbeda.

1. *Embryonic stem cell*. Embryonic stem cell berasal dari inner cell mass pada blastokista, yaitu tahap embrio yang terdiri dari 50-150 sel, sekitar hari kelima pasca pembuahan. Sel punca embrionik ini biasanya diperoleh dari embrio yang tidak digunakan selama proses fertilisasi in vitro (IVF). Penelitian menggunakan sel punca embrionik masih terbatas karena isu etika. Namun, saat ini telah dikembangkan teknik pengambilan embryonic stem cell yang tidak membahayakan embrio, sehingga embrio tersebut dapat terus hidup dan tumbuh. Pendekatan ini berpotensi mengurangi kontroversi etis terkait penggunaan sel punca embrionik

2. *Adult stem cell*. Berasal dari jaringan dewasa, termasuk:

Sumsum tulang manusia, yang mengandung dua kategori sel punca: sel stem hematopoietik dan sel punca darah. Hematopoietic stem cell dapat diperoleh dari darah tepi, darah tali pusat, serta sumsum tulang.

Stromal stem cell, yang juga dikenal sebagai mesenchymal stem cell.

Selain itu, sel punca dewasa dapat ditemukan dalam berbagai jaringan lain seperti pankreas, sistem saraf pusat, adiposit (jaringan lemak), otot rangka, dan pankreas. Dengan sifat plastisitasnya, adult stem cells dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel dari jaringan lain selain jaringan asalnya. Misalnya, sel stem dari otak dapat berubah menjadi sel darah, sementara stromal stem cell dari sumsum tulang dapat berdiferensiasi menjadi sel otot jantung, dan sebagainya³⁸.

2.4 Sekretom MSCs

Sel punca mesenkim didefinisikan sebagai sel non-hematopoietik yang melekat dan mengekspresikan penanda permukaan CD90, CD105, CD73 dan serta kurangnya ekspresi CD14, CD34, dan CD45. Selain itu, Sel-sel ini memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi adiposit, kondrosit, dan osteosit secara *in vitro*. Meskipun studi awal pada akhir 1960-an, sel punca mesenkim pertama kali ditemukan di sumsum tulang, tetapi studi terbaru menunjukkan bahwa sel-sel ini dapat dimurnikan dari berbagai jaringan, termasuk jaringan adiposa, jantung, Wharton's *jelly*, pulpa gigi, darah tepi, darah tali pusat, darah menstruasi, dan vili korioni.

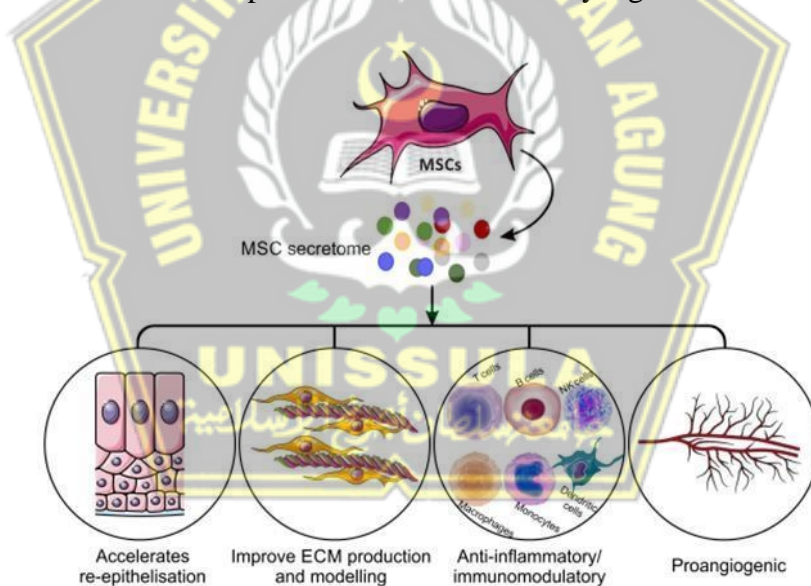
Sekresi sel punca memiliki efek anti-inflamasi dan mengurangi ukuran infark miokard. Hal ini didukung oleh fakta bahwa sel punca mesenkimal di paru-paru terlihat beku dan hanya sejumlah kecil sel yang bermigrasi ke area infark miokard. Model sumsum tulang belakang tikus, yang ditutup dan dibedah dengan lem fibrin yang mengandung sel punca mesenkimal tali pusat manusia, menunjukkan contoh lain yang diyakini semata-mata karena efek

sekresi MSC. Sumsum tulang belakang dapat dipulihkan setelah intervensi. Selain diferensiasi sel induk mesenchymal, ditemukan bahwa antigen sel induk mesenchymal pada manusia tidak tumpang tindih dengan pewarnaan neuron, oligodendrosit, atau astrosit. Studi oleh Song et al. menunjukkan bahwa, pada model tikus dengan kandung kemih yang terlalu aktif, sel punca mesenchymal tidak tertanam di kandung kemih yang rusak, tetapi meningkatkan ekspresi gen seluler, menunjukkan efek parakrin dari sel punca mesenchymal. Identifikasi faktor-faktor yang disekresikan meningkatkan pemahaman kita tentang aktivitas terapeutik⁴³.

Aktivitas terapeutik sel punca mesenchymal dipicu oleh kondisi fisiologis dalam kultur standar, di mana sel-sel ini tumbuh dalam lapisan tunggal dan mengeluarkan sitokin, mikroRNA (miRNA), eksosom, dan mikrovesikel. Konsep teoretis bahwa sel punca mesenchymal berfungsi sebagai "sel perbaikan" tubuh menyiratkan bahwa mereka tidak hanya melepaskan faktor regeneratif tetapi juga berbagai faktor yang dipengaruhi oleh stimulus tertentu. Penambahan rangsangan tertentu ke media kultur, seperti hipoksia prakondisi, stimulasi inflamasi, dan pertumbuhan sel dalam susunan tiga dimensi, dapat merangsang sekresi faktor terapeutik sesuai harapan.

Mekanisme kerja sekresi sel punca mesenchymal (MSC) perlu dipahami secara mendalam sebelum dapat diterapkan secara luas dalam klinik sebagai terapi baru yang potensial. Kemajuan terbaru dalam biologi sel dan molekuler telah memberikan wawasan tentang berbagai mekanisme ini dan mengindikasikan bahwa sekresi MSC dapat berperan dalam penyembuhan

luka. Analisis sekresi MSC mengungkapkan adanya sejumlah besar protein yang diketahui berperan dalam peradangan kulit, hemostasis, dan penyembuhan luka. Jalur biokimia dan mekanisme kerja protein-protein ini telah diidentifikasi sebelumnya⁴⁴. Sekresi sel punca mesenkim (MSC) adalah campuran kompleks dari berbagai faktor bioaktif dan telah terbukti memiliki efek menguntungkan yang signifikan dalam pengobatan penyakit inflamasi pada sistem saraf, kardiovaskular, sistem pernapasan, dan kerangka. Meskipun efek anti-inflamasi MSC mungkin bergantung pada interaksi langsung antar sel, beberapa penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara MSC dan sel imun dapat dimediasi oleh sitokin yang disekresikan oleh MSC.



Gambar 2.3 Secretom mesenchymal stem cell (MSCs)

2.5 Hypoxia

Hipoksia adalah suatu kondisi di mana tidak ada pasokan oksigen ke jaringan. Hipoksia memiliki kemampuan untuk menghancurkan berbagai jenis sel dan, dalam kondisi hipoksia jangka panjang, dapat menyebabkan apoptosis

sel. Namun, menurut beberapa penelitian, hipoksia dapat meningkatkan proliferasi, pembaruan diri, dan kemampuan melekatkan MSC. Kondisi hipoksia terhadap MSCs menunjukkan beberapa respon biologis terhadap penipisan oksigen. Hipoksia secara nyata sangat mempengaruhi sifat utama MSCs termasuk viabilitas sel, kapasitas proliferasi, diferensiasi, pola migrasi dan metabolisme^{12,45}. MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepas berbagai molekul pro-regenerasi.⁴⁶



Gambar 2.4. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs³⁹

2.6. Sediaan Gel

Beberapa bentuk sediaan topikal antara lain berupa gel, krim, pasta, dan salep. Bentuk sediaan gel yang terdiri dari suspensi semi padat yang terdiri dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar yang dapat ditembus cairan, adalah jenis sediaan yang nyaman untuk digunakan secara topikal. Sifat tiksotropik sediaan gel membuatnya mudah menyebar dan tidak mudah mengalir ke permukaan kulit karena viskositas dan daya rekatnya yang tinggi. Selain itu, tidak meninggalkan bekas dan hanya membentuk lapisan tipis seperti film. Gel meresap lebih dalam dari krim

dan terasa segar saat dipakai. Bisa digunakan pada kulit yang berambut dan membuatnya tampak lebih baik. Jika terkena air, juga cepat larut^{47,48}.

Pektin gom tragakan, karagen, asam alginat, agar, dan bahan semisintetis dan sintetis seperti hidroksi etil selulosa, metil selulosa, karboksi metil selulosa, dan karbopol, polimer vinil sintetis dengan gugus karboksil yang terionisasi, adalah polimer-polimer yang sering digunakan untuk membuat gel farmasetik. Gel dibuat melalui proses peleburan atau memerlukan prosedur khusus untuk sifat mengembangnya. Bahan yang digunakan untuk membentuk gel idealnya harus inert, aman, tidak mengalami perubahan viskositas selama penyimpanan normal, dan tidak bereaksi dengan bahan-bahan lain dalam formula.

Konsistensi gel disebabkan oleh fakta bahwa bahan pembentuk gel akan membentuk struktur tiga dimensi setelah mengabsorpsi air. Gel menyerap larutan dan mengembang, meningkatkan volumenya. Pengembangan, fase memasuki matriks gel dari luar, memicu interaksi antara pembentuk gel dan solven. Ini adalah fase pertama disperse. Gel terbentuk sebagai interaksi di antara unit fase koloidal senyawa anorganik dan organik yang tidak terpisah dari fase luar, membentuk ketebalan struktur. Karakteristik gel harus disesuaikan dengan tujuan penggunaan gel. Misalnya, tidak boleh terlalu liat pada gel topikal. Selain itu, konsentrasi dan berat molekul bahan pembentuk gel yang digunakan tidak boleh terlalu tinggi, karena ini dapat menyebabkan gel sulit didispersikan dan dioleskan^{49,50}.

Dalam proses pembuatan gel, karakter gel yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh basis yang dipilih. Basis gel terdiri dari basis hidrofilik dan hidrofobik. Basis hidrofilik bertahan lama di permukaan kulit karena sifatnya yang memperlambat pengeringan. Jika dibandingkan dengan gel hidrofobik, gel hidrofilik lebih mudah dibuat dan memiliki sistem koloid yang lebih stabil. Dasar gel hidrofobik dan fase pendispersinya hanya berinteraksi sedikit. Bahan hidrofobik tidak secara spontan menyebar⁵¹.

Karakteristik cairan gel adalah gel hidrofilik dan gel hidrofobik

- a. Gel hidrofilik, yang memiliki basis yang terdiri dari molekul organik yang besar, memiliki fase pendispersi. Gel hidrofilik mengandung bahan pengembang, penahan lembab, air, dan pengawet, dan memiliki sistem koloid yang lebih stabil dan mudah dibuat dibandingkan gel hidrofobik. Gel hidrofilik memiliki aliran tiksotropik yang sesuai dengan beberapa eksipien, tidak lengket, larut dalam air, mudah menyebar, dan mudah dibersihkan.
- b. Gel hidrofobik terdiri dari minyak lemak atau polietilen, parafin cair, dan bahan pembentuk gel koloidal silika, zink sabun, atau aluminium. Partikel anorganik dalam gel ini berinteraksi dengan basis gel ketika ditambahkan ke fase pendispersi. Gel hidrofobik tidak menyebar secara spontan^{51,52}.

Kontrol kualitas sediaan gel, meliputi:

- a. Organoleptis diamati secara makroskopis dan terdiri dari warna, bentuk, bau, dan kejernihan sediaan gel.
- b. Homogenitas, Sediaan gel harus dicampur secara merata untuk memastikan homogenitas. Dengan bantuan cahaya, homogenitas gel dapat dilihat di atas kaca objek untuk mengujinya.
- c. Daya sebar, berkaitan dengan kenyamanan pada pemakaian, mudah dioles tanpa perlu penekanan yang berlebih. Sediaan topikal diharapkan memiliki daya sebar yang baik.
- d. Daya lekat, adalah kemampuan menempel pada lapisan epidermis, pengujiannya untuk mengetahui kemampuan melekat atau waktu retensi yang dihasilkan saat digunakan.
- e. Viskositas mempengaruhi sifat sediaan dalam campuran dan sifat alirnya selama proses produksi dan pengemasan. Ini juga mempengaruhi sifat penting saat pemakaian, seperti daya sebar, konsistensi atau bentuk, dan kelembaban. Viskositas juga dapat memengaruhi stabilitas fisik dan bioavailabilitas. Daya lekatnya meningkat dengan viskositas, tetapi daya sebar berkurang dengan viskositas. Penambahan polimer dapat meningkatkan viskositas sediaan.

- f. pH, diukur segera pada saat sediaan telah selesai dibuat diharapkan nilai pHnya sama dengan nilai pH tempat pemakaian atau kulit untuk mencegah terjadi iritasi. Kulit manusia memiliki pH normal antara 4,5-6,5⁵³.

2.7 Farmakinetik Obat Topikal

Proses di mana zat aktif dioleskan pada kulit dalam konsentrasi tertentu, diserap melalui lapisan kulit, dan kemudian tersebar secara sistemik dikenal sebagai farmakokinetik sediaan topikal. Ini penting saat memilih obat topikal untuk pengobatan. Setelah digunakan, obat topikal biasanya terbagi menjadi tiga bagian: permukaan kulit, stratum korneum, dan jaringan sehat. Obat disimpan di stratum korneum, tempat di mana mereka bersentuhan dengan permukaan kulit. Meskipun obat bersentuhan dengan kulit, tidak dapat dikeluarkan meskipun dilap dengan pakaian atau digosok⁵⁴.

Beberapa sediaan obat dapat menyebabkan bahan aktif menembus langsung ke lapisan hipodermis atau lapisan subcutan. Pemakaian topikal mengandung bahan yang dapat menguap, sehingga bahan aktif kemudian berikatan dengan lapisan yang dilaluinya, misalnya epidermis, dermis, kemudian bahan aktif tersebut diserap oleh pembuluh darah dermis dan lapisan subkutan kulit^{54,55}.

2.7.1 Jalur Penetrasi sediaan Topikal

a. Penetrasi transepidermal

Penetrasi transepidermal melalui jalur interseluler dan intraseluler. Jalur penetrasi yang utama melalui interseluler, menembus lapisan stratum korneum melewati ruang antar sel korneosit yang dikelilingi lapisan lipid, berdifusi pada matriks lipid protein stratum korneum, kemudian akan menembus epidermis di bawahnya, dan berdifusi ke pembuluh kapiler⁴⁸. Jalur penetrasi intraseluler, obat berdifusi menembus dinding sel korneosit dan melewati matriks lipid protein stratum korneum, kemudian menuju sel di lapisan bawahnya sampai ke pembuluh kapiler di bawah stratum basal epidermis dan berdifusi ke kapiler.

b. Penetrasi transfolikular

Penetrasi folikel telah dibuktikan dalam percobaan in vivo. Ada molekul kecil seperti kafein yang masuk melalui folikel, bukan melalui sel korneum. Difusi obat melewati celah folikel rambut dan kelenjar sebaceous dan kemudian berdifusi ke dalam kapiler⁵⁶.

2.7.2 Absorpsi sediaan topikal secara umum

Absorpsi sediaan topikal yang dioleskan ke kulit, melalui beberapa fase:

- a. *Lag phase*, fase ini saat sediaan dioleskan ke kulit dan belum menembus stratum korneum, sehingga bahan aktif obat pada fase ini belum ada dalam pembuluh darah.

- b. *Rising phase*, sebagian sediaan sudah mulai menembus stratum korneum kulit, dan masuk pembuluh kapiler dermis, sehingga obat sudah ditemukan di pembuluh darah.
- c. *Falling phase*, adalah fase dimana bahan aktif obat dilepaskan dari permukaan kulit dan dibawa ke pembuluh kapiler lapisan dermis.

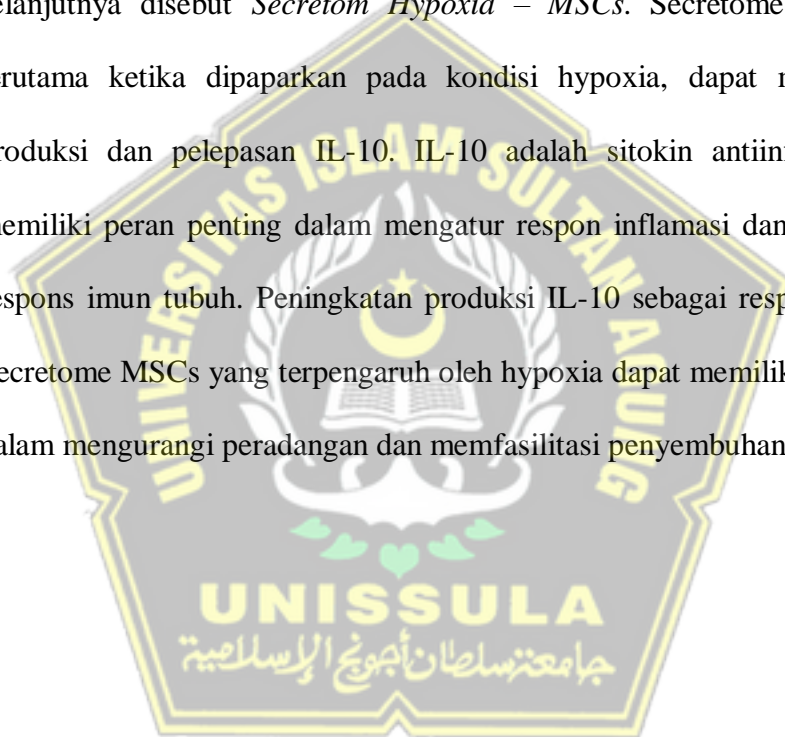
Gel mampu berpenetrasi menembus lapisan hipodermis, serta mampu membentuk lapisan absorpsi yang menyebabkan difusi secara transfolikulernya juga baik, sehingga banyak digunakan pada sediaan gel analgetik yang memerlukan penetrasi yang baik⁴⁸

2.8 Hubungan Secretom Hypoxia MSCs Terhadap IL-10 dan STAT-3

Aktivitas imunomodulator MSC, dan khususnya kemampuannya untuk mengurangi aktivasi sistem kekebalan tubuh, dapat menekan produksi autoantibodi terhadap sel β pankreas, sehingga mencegah degenerasinya. Perawatan pengkondisian hipoksia pada MSC dapat meningkatkan tingkat produksi IL-10, yang berperan dalam meningkatkan viabilitas sel⁴⁸. Sebuah studi mengungkapkan bahwa MSC bersifat anti inflamasi dan mempunyai kemampuan mengatur sel imun dengan cara menghambat makrofag dan mengaktifkan sel T, serta menginduksi diferensiasi limfositik terhadap populasi limfosit Treg, serta makrofag. menargetkan subset makrofag M2 dengan sifat anti-inflamasi⁵⁷.

MSC mengeluarkan mediator dan faktor pertumbuhan yang mendukung regenerasi kulit, termasuk sitokin anti-inflamasi (IL-10), faktor pertumbuhan

endotel vaskular (VEGF), trombosit (PDGF), faktor nekrosis tumor alfa (TNF- α), dan fibroblas. evolusi. (FGF), transforming growth factor (TGF β 1), angiopoietin, IL-1, IL-6 dan IFN γ akan merangsang pembentukan kolagen dan mempercepat regenerasi kulit. Kondisi hipoksia selanjutnya akan menginduksi MSC untuk mengeluarkan molekul larut yang mengandung berbagai mediator anti inflamasi dan faktor pertumbuhan^{12,19}. Yang kemudian selanjutnya disebut *Secretom Hypoxia – MSCs*. Secretome dari MSCs, terutama ketika dipaparkan pada kondisi hypoxia, dapat meningkatkan produksi dan pelepasan IL-10. IL-10 adalah sitokin antiinflamasi yang memiliki peran penting dalam mengatur respon inflamasi dan memodulasi respons imun tubuh. Peningkatan produksi IL-10 sebagai respons terhadap Secretome MSCs yang terpengaruh oleh hypoxia dapat memiliki efek positif dalam mengurangi peradangan dan memfasilitasi penyembuhan jaringan.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

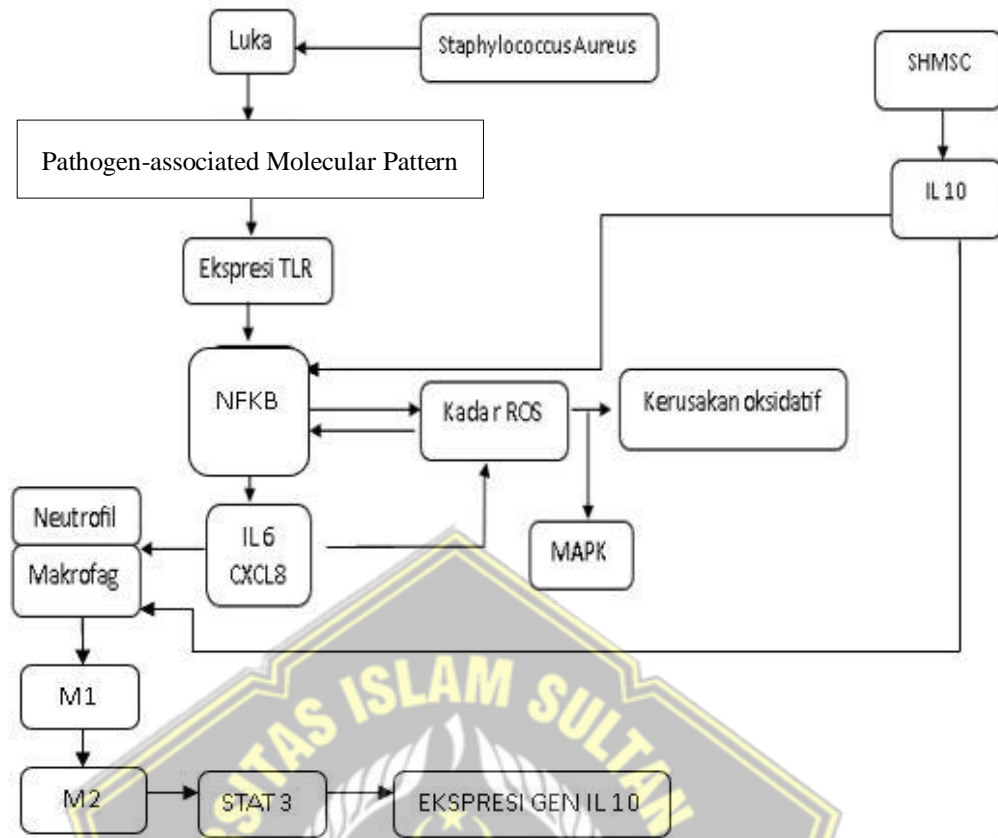
Infeksi luka superfisial sangat berhubungan dengan kondisi inflamasi berkepanjangan, yaitu dengan adanya penurunan ekspresi gen IL-10 dan STAT-3. Ekspresi IL-10 dan STAT-3 menurun ketika peradangan dan infeksi terjadi, sehingga menyebabkan terhambatnya penutupan dan penyembuhan luka⁵⁸.

Aktivasi reseptor molekul pro inflamasi yang disebabkan oleh lipopolisakarida bakteri menyebabkan disosiasi kompleks IKK, mempengaruhi pengangkutan NF- κ B ke dalam nukleus⁵⁹. Mekanisme ini melibatkan fosforilasi salah satu protein yang membentuk kompleks IKK, khususnya I κ B, yang menyebabkan ubiquitinasi dan degradasi I κ B oleh proteasome. Transfer NF κ B ke gen target menginduksi aktivasi dan ekspresi berbagai molekul pro inflamasi yang mempengaruhi aktivitas sel imun yang berlebihan⁶⁰.

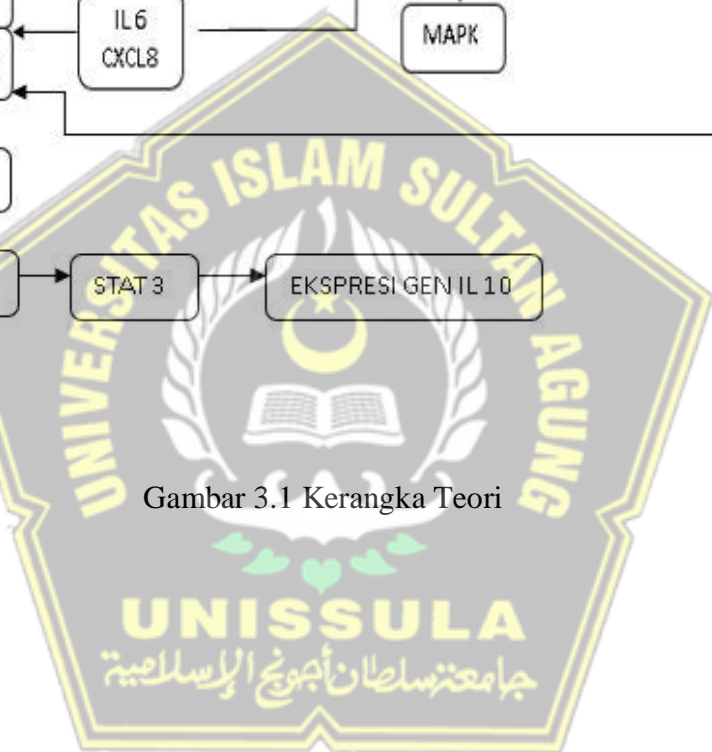
Prekondisi hipoksia mempunyai efek meningkatkan kelangsungan hidup dan proliferasi MSC. MSC yang hipoksia akan mengekspresikan molekul yang lebih larut dalam bentuk sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan dibandingkan dengan kondisi normoksik. Banyak sitokin dan mediator yang muncul sebagai respons terhadap MSC yang hipoksia, termasuk IL-10 dan TGF- β . Sitokin yang berbeda ini diekspresikan dalam

media filtrasi menggunakan TFF, yang selanjutnya dikatakan sebagai *Secretom Hypoxia-MSC (SH-MSCs)*⁶¹.

IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur STAT3 dengan menggerakkan JAK-1 dari membrane intraseluler ke sitoplasma. Ini mengubah fosforilasi jalur STAT3, yang menyebabkannya bergerak ke nukleus. Sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, dan IL-12 adalah beberapa molekul pro-inflamasi yang dapat ditekan oleh IL-10 melalui translokasi STAT3 ke nukleus, yang mengaktifkan gen SOCS3 untuk disintesis menjadi protein yang dilepaskan ke sitoplasma. Ekspresi SOCS3 pada sitoplasma menghambat jalur pensinyalan intraseluler NF- κ B, yang mencegah translokasi NF- κ B ke nukleus dan mencegah ekspresi gen pro-inflamasi^{62,63}. Sitokin proinflamasi yang berlebihan menyebabkan kegagalan transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi, yang pada akhirnya menyebabkan luka kronis yang tidak dapat disembuhkan. Dengan demikian, penghambat sitokin proinflamasi mungkin efektif dalam pengobatan luka kronis⁶⁴. Dengan adanya peningkatan IL 10 dan STAT3 maka mempercepat penyembuhan luka.



Gambar 3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Pemberian gel *Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) akan mempengaruhi ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

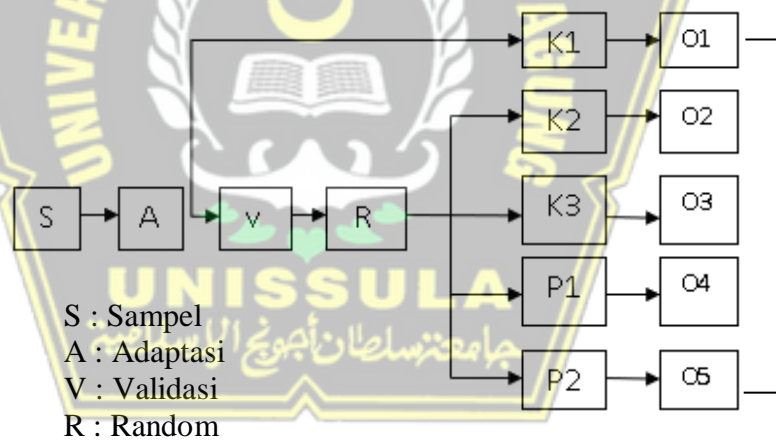


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Studi ini melakukan eksperimen *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan lima kelompok, masing-masing menerima perlakuan dan intervensi; satu kelompok yang tidak menerima intervensi (kontrol negatif); satu kelompok yang diberi gentamisin salep (kontrol positif); dan satu kelompok tikus yang sehat. Data diukur setelah intervensi.



Gambar 4.1. Gambar rancangan penelitian

1. Kelompok K1: Tikus Sehat,
2. Kelompok K2: Kontrol Negatif (Tikus model Infeksi Superfisial dengan perlakuan 100 mg base gel)
3. Kelompok K3 : Kontrol Positif (Tikus model Infeksi Superfisial dengan perlakuan pemberian gentamicin topical)
4. Kelompok: P1 (Tikus model Infeksi Superfisial dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 25%)
5. Kelompok: P2 (Tikus model Infeksi Superfisial dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 50%)

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.2.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel SH-MSCs

4.2.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen IL 10 dan STAT 3

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Gel SH-MSCs MSCs

Gel SH-MSCs adalah gel yang mengandung molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSC. Gel sekretom dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu kelompok P1 mendapat SH- MSC dosis 25% dan kelompok

P2 mendapat SH-MSD dosis 50%. Gel dioleskan pada luka infeksi superfisial sekali sehari selama 3 hari. Skala: Ordinal

4.2.2.2. Ekspresi gen IL 10

Ekspresi gen IL 10 dianalisis dari jaringan kulit diarea luka yang diambil pada hari ke 4 dan dilakukan dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase. Skala : Rasio

4.2.2.3. Ekspresi gen STAT 3

Ekspresi gen STAT 3 dianalisis dari jaringan kulit diarea luka yang diambil pada hari ke 4 dan dilakukan dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala : Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 250 ± 10 g yang dinyatakan sehat yang dihilangkan bulu bagian dorsal nya. Punggung tikus diberi garis batas dengan ukuran 2x2 cm kemudian dijepit memakai pinset lalu menggunakan scapel dilukai hingga kedalaman 1mm sesaat setelah dilukai langsung diberikan bakteri *Staphylococcus*

aureus 5×10^7 CFU serta yang dinyatakan sehat dan layak digunakan oleh dokter hewan untuk penelitian. Yang diperoleh dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory, SCCR.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

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

1. Umur 2-3 bulan.
2. Bobot badan 250 gram \pm 10g
3. Tikus kondisi Luka Infeksi Superficial yang divalidasi adanya populasi bakteri pada area luka dengan pengecatan gram.

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Tikus yang tidak mengalami luka superfisial yang terinfeksi

4.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

1. Tikus yang mati selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 5 kelompok yaitu dengan rincian sebagai berikut: perlakuan K1 (tikus sehat), K2 (tikus diinduksi luka superfisial dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan diberi base gel 100 mg),

K3 (tikus diinduksi luka superfisial dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan diberi gentamicin topikal), P1 (Pemberian gel SH-MSCs dosis 25%), dan P2 (Pemberian gel SH-MSCs dosis 50%).

4.3.4. Besar Sampel

Penentuan besar sampel ditentukan berdasarkan pedoman WHO tentang penggunaan hewan coba untuk eksperimental. Tiap kelompok perlakuan minimal 5 dengan menambahkan kontrol satu (WHO,1993). Berdasarkan ketentuan tersebut diperoleh besar sampel tiap kelompok perlakuan minimal 6 ekor. Jumlah sampel yang digunakan minimal 30 ekor. Penelitian ini dilakukan pada 5 kelompok perlakuan, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor, sehingga penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 6 ekor sampel per kelompok.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. 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. Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk

membuat hewan model antara lain, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah vacutainer, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm biopsy punch, sentrifus, mikropipet, 1000 uL mikropipet tip, dan vial tube 1,5 mL. Selain itu penelitian ini juga menggunakan peralatan berupa steril swab untuk mengoleskan gel S-MSCs. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi gen IL 10 dan STAT 3.

4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alcohol 70%, PBS, Ketamin, dan Xylasine.

4.5 Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Seluruh proses dilakukan di ruang *biosafety* level 2, menggunakan peralatan steril dan dilakukan dengan teknik aseptik tinggi.

1. Tikus betina dalam kondisi hamil, pada usia kehamilan 19 hari di anestesi. melakukannya dengan disinfeksi terlebih dulu

menggunakan usapan kapas alkohol di bagian perut kiri bawah tikus, lalu suntik dengan campuran *ketamine* (60mg/kgbb) dan *xylazine* (20mg/kgbb) pada intraperitoneal tikus.

2. Bulu pada bagian perut tikus dilakukan pencukuran hingga bersih, kemudian disinfeksi dengan kassa *povidine iodine*.
3. Lakukan pembedahan lalu *abdomen* tikus dibuka
4. Janin tikus hingga plasentanya diambil seluruhnya kemudian dipindahkan dalam wadah steril yang mengandung media transport berupa NaCl 0.9% kemudian dibawa ke laboratorium kultur sel untuk di proses.
5. *Umbilical cord* diletakkan ke petri dish dengan menggunakan pinset, lalu cuci *umbilical cord* sampai bersih dengan PBS. Kemudian pisahkan antara pembuluh darah dan *umbilical cord*. *Umbilical cord* dipotong kurang lebih sepanjang 3-5 cm dengan pisau steril.
6. Potongan *umbilical* dihancurkan dengan gunting mata tajam atau bisturi menjadi potongan-potongan kecil sebesar 1 mm.
7. Hasil potongan kecil *umbilical* diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
8. Medium komplit (DMEM yang ditambahkan dengan fungizon, penstrep, dan FBS) secara pelan pelan dibersihkan sebanyak 2-3 ml

atau hingga menutupi jaringan. Inkubasi dalam incubator dengan suhu 37C dan 5% CO₂.

10. Tiap 24 jam diamati, untuk melihat ada sel yang keluar dari spot penanaman explant (kira-kira 14 hari akan muncul sel dari explant).
11. Medium diganti tiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dengan menggunakan micropipette diganti dengan *fresh medium* komplet sebanyak yang dibuang.
12. Setelah sel muncul dari explant, tambahkan medium komplet menjadi 5 ml.
13. Setelah 24-72 jam dari munculnya sel explant, sel yang mengapung dipindahkan ke cawan petri jaringan yang baru dengan cara:
 - Semua medium diambil dan masukkan ke conical tube 15 ml
 - Sentrifugasi 2000 rpm selama 10 menit
 - Supernatant dibuang.
 - Pellet diresuspendi dengan medium komplet.
14. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel/ml di dalam BD PharmingenTM Stain

Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS) *buffer*.

Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel ke dalam masing masing tabung *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS) dan kemudian baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam flow cytometry

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC mouse anti-human CD29	5 μ l
2	PE mouse anti-human CD90	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5 μ l
4	APC Mouse anti-human CD31	5 μ l
5	Kosong	-
6	hMSC positive isotype control cocktail	20 μ l
	hMSC negative isotype control cocktail	20 μ l
7	hMSC positive cocktail	20 μ l
	PE hMSC negative cocktail	20 μ l

4.5.4. Proses Hipoksia dan Filtrasi SH-MSCs

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 indicator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SH MSCs yang selanjutnya disesuaikan dengan P1 dan P2.
7. Kemudian dilakukan validasi kandungan VEGF, PDGF, FGF, TGF- β , IL-10 pada SH-MSC dengan ELISA ASSAY

4.5.5. Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel SH-MSCs dilakukan dengan cara mencampurkan SH-MSC dengan gel sehingga konsentrasi gel SH-MSCs mempunyai kandungan dosis 25% (P1) dan 50% (P2).

2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.5.6. Pembuatan Luka Infeksi Superfisial dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 7 hari di sedasi, melakukan nya dengan disinfeksi terlebih dulu menggunakan usapan kapas alkohol di bagian perut kiri bawah tikus, lalu suntik dengan campuran *ketamine* (60mg/kgbb) dan *xylazine* (20mg/kgbb) pada intraperitoneal tikus
2. Sesudah tikus dalam keadaan tenang atau mengantuk, rambut pada bagian punggung tikus dilakukan pencukuran hingga bersih, kemudian disinfeksi pada daerah yang akan dilukai dengan kassa *povidine iodine*
3. Punggung tikus diberi garis batas dengan ukuran 2x2 cm kemudian dijepit memakai pinset lalu menggunakan scapel dilukai hingga kedalaman 1mm (hanya di lapisan epidermis)
4. Segera setelah dilukai diberikan bakteri *Staphylococos aureus* 5×10^7 CFU sebanyak 100 μ L memakai mikropipet dan spatula untuk meratakan nya
5. Setelah pemberian bakteri *Staphylococcus Aureus*, tunggu sekitar 1- 2 jam agar sedasi pada tikus hilang atau tikus bangun.
6. Semua tikus diletakkan kedalam kandang berdasarkan kelompok

7. Pemberian sediaan gel topikal yang mengandung SH-MSCs 25 % dan 50% selama 3 hari dilakukan satu kali sehari sebanyak 100mg. Dimulai satu hari setelah pembuatan luka. Pengamatan dilakukan pada hari berikutnya setelah pembuatan luka selama 3 hari. Tikus sehat tidak di berikan perlakuan apapun, sedangkan tikus kontrol diberikan perlakuan basis gel 100 mg (K2) dan diberikan perlakuan gentamisin topical (K3), P1 (Pemberian gel SH-MSCs dosis 25%), dan P2 (Pemberian gel SH-MSCs dosis 50%).
8. Sampel kulit pada semua kelompok diambil untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan gram.
9. Sampel kulit tikus pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%
10. Sampel kulit dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif.
11. Sampel kulit dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk proses dehidrasi.
12. Sampel kulit dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam.
13. Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C dengan cara memasukkan sampel kulit ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Sampel kulit dimasukkan ke dalam parafin

murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit.

14. Embedding, sampel kulit dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras.

15. Sampel kulit dalam blok paraffin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 μm menggunakan mikrotom.

16. Irisan sampel jaringan ditempelkan pada gelas benda dengan cara mengoleskan Mayer's albumin dan ditetesi sedikit aquades lalu dipanaskan di atas hot plate hingga irisan menempel dengan sempurna.

17. Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam.

18. Staining (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna gram.

19. 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.

20. Preparat yang telah selesai ditutup kaca penutup, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan untuk pengamatan lebih lanjut.

4.5.7. Terminasi dan pengambilan jaringan

1. Terminasi tikus dilakukan di hari ke 4 dengan menggunakan cocktail dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan 10 mL cocktail digunakan *Ketamine* 50 mg/kgBB, *Xylazine* 10 mg/kgBB dan *Acepromazine* 2 mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuskular.
2. Setelah tikus mati, dilakukan koleksi organ kulit kemudian disimpan dalam cryotube yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

4.5.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel kulit sebanyak 100 mg diambil dari RNA later kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
2. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi RNAIso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
3. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta

disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40C 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.

4. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanolol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
5. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40⁰C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
6. 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 40C.
7. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 µm. Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
8. 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.

9. 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.

4.5.9. Pembacaan IL 10 dan STAT 3 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

1. Ekspresi mRNA dari IL 10 dan STAT 3 dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 µl cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and MgCl₂) sebanyak 12,5 µl, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 µl untuk primer forward dan reverse dan 8,3 µl Nuclease Free Water.
3. Primer IL-10 yang digunakan adalah F : 5'- TAA GCT CCA AGA CAA AGG GTG -3' dan R : 5'- GTC CTC CAG TCC AGT AGA TG -3'. Primer STAT3 yang digunakan : F 5'- TTC TTT GAG TTC GGT GGG GTC -3' dan R : 5'- TGC ATA TTT GTT TGG GGC AGG -3
4. PCR dilakukan menggunakan variasi suhu 95 C (5 menit) , 95 C (15 menit), 60 C (1 menit) selama 40 siklus
5. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine.

6. Peningkatan ekspresi gen di analisis dalam ratio peningkatan terhadap housekeeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.5.1. Tempat Penelitian

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

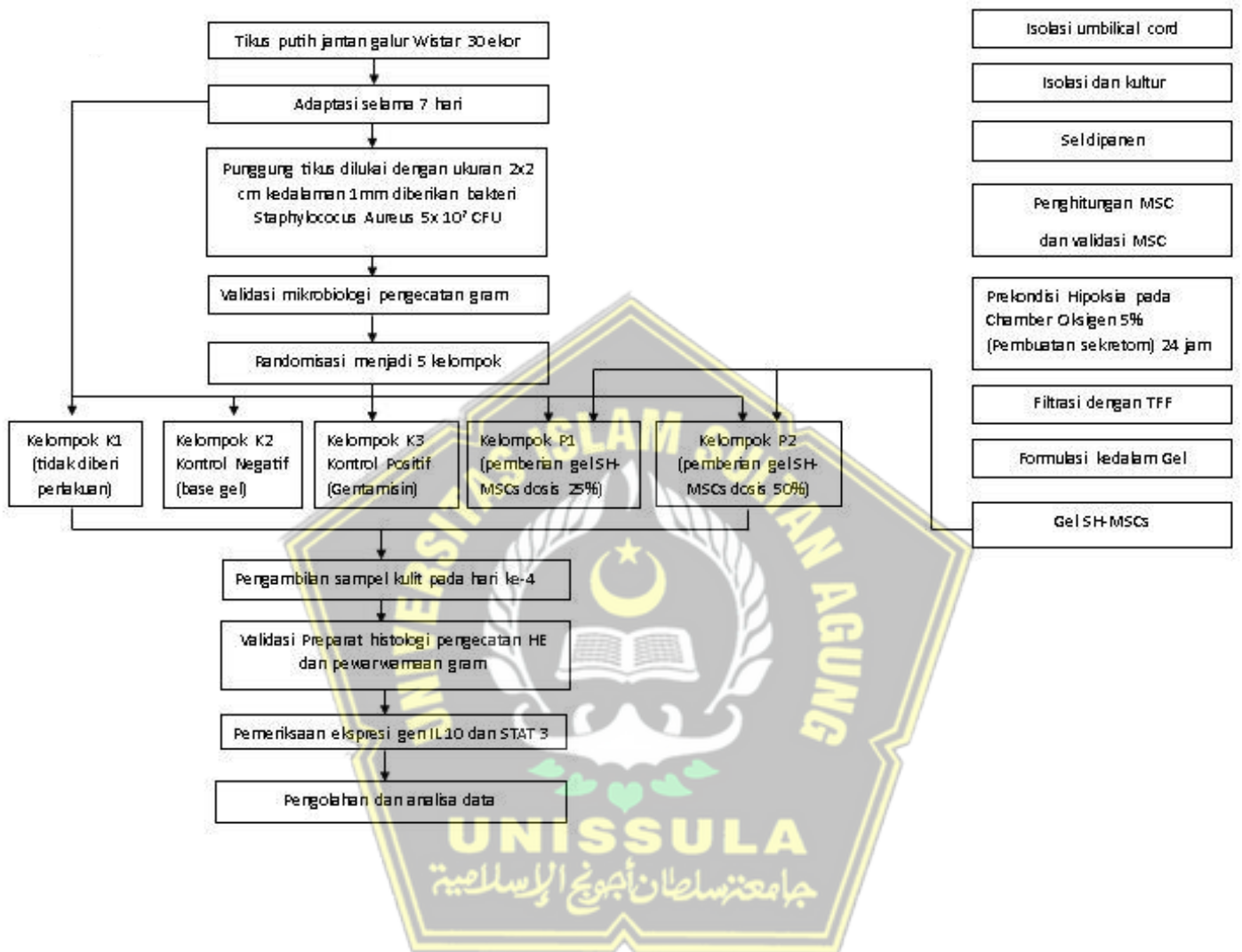
4.5.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari -Februari 2024

4.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya diproses, disunting dan ditabulasi selanjutnya dilakukan uji deskriptif meliputi variabel bebas dan terikat yang menggunakan skala data rasio. Setelah dilakukan uji deskriptif kemudian dilakukan uji normalitas distribusi dari suatu variabel dengan menggunakan uji Shapiro Wilk dan uji homogenitas varians antar kelompok menggunakan uji Levene's Test. Didapatkan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), kemudian dilakukan uji Kruskal Wallis. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji Kruskal Wallis, 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 menggunakan aplikasi dekstop SPSS 23.0 for Windows.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh dari pemberian *Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs)* terhadap tingkat ekspresi gen IL-10 dan STAT-3 pada luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini merupakan studi eksperimental yang dilaksanakan pada periode Januari sampai Februari 2024 di laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia, yang berlokasi di Semarang.

Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 30 ekor tikus sesuai kriteria WHO. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok sehat, kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok pemberian gel SH-MSCs dosis 25% dan kelompok pemberian gel SH-MSCs dosis 50%.

MSCs yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Umbilical Cord* tikus usia kehamilan 19 hari. Validasi MSCs dilakukan menggunakan analisis kemampuan differensiasi osteogenic, adipogenik serta analisis fenotip sel menggunakan flowcytometri. Sel yang telah tervalidasi kemudian di inkubasi pada kondisi hipoksia

5.1 HASIL PENELITIAN

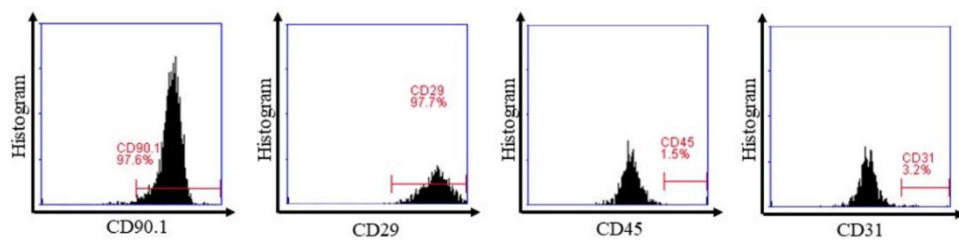
5.1.1 Isolasi Sekretom Hipoksia *Mesenchymal Stem Cells*

MSCs diisolasi di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia, Semarang, menggunakan *umbilical cord* dari tikus betina yang berusia 19 hari. Selanjutnya, hasil isolasi ditanam dalam flask plastik yang berisi medium khusus untuk dikultur. Setelah melewati lima kali pasase, MSCs menunjukkan gambaran sel yang menempel pada dasar flask dengan morfologi yang menyerupai sel berbentuk spindle saat diamati di bawah mikroskop.



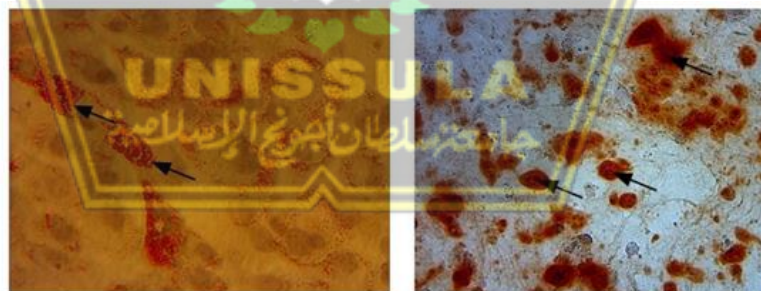
Gambar 5.1. Isolasi MSCs dengan sel berbentuk spindle like (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x

Hasil isolasi sel punca mesenkimal diperiksa melalui flow cytometry untuk menilai kemampuan MSCs dalam menunjukkan berbagai marker permukaan yang spesifik. Penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (97,60%) dan CD29 (97,70%), sementara hanya sedikit mengekspresikan CD45 (1,50%) dan CD31 (3,20%) (lihat Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

Penelitian ini juga mengevaluasi kemampuan MSCs untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa (matur). MSCs diberi perlakuan dengan medium khusus agar dapat berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit secara terpisah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MSCs berhasil berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit, yang ditandai dengan endapan kalsium dan lemak yang tampak merah pada pewarnaan alizarin red dan oil red dye pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik (lihat Gambar 5.3)



A

B

Gambar 5.3 Droplet lipid dan deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red Dye (A) dan warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red (B)

MSCs yang telah diisolasi kemudian ditempatkan dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi oksigen sebesar 5% selama periode 24 jam menggunakan chamber hipoksia. Medium kultur sel punca mesenkimal yang berisi sekretom kemudian dikumpulkan dan disaring menggunakan metode *tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan berat molekul tertentu untuk memperoleh molekul dengan ukuran 10-50 kDa yang mengandung sitokin interleukin-10 (IL-10) dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). IL-10 merupakan molekul antiinflamasi monomer dengan ukuran sekitar 18 kDa yang berperan dominan dalam proses immunosupresi dan dapat diproduksi oleh sel MSCs dalam kondisi hipoksia. TGF- β merupakan molekul faktor pertumbuhan dimer dengan ukuran 25 kDa yang berperan dalam menghambat peradangan untuk berlangsung lebih lama.



Gambar 5.4. Morfologi MSCs sebelum dan setelah kondisi hipoksia

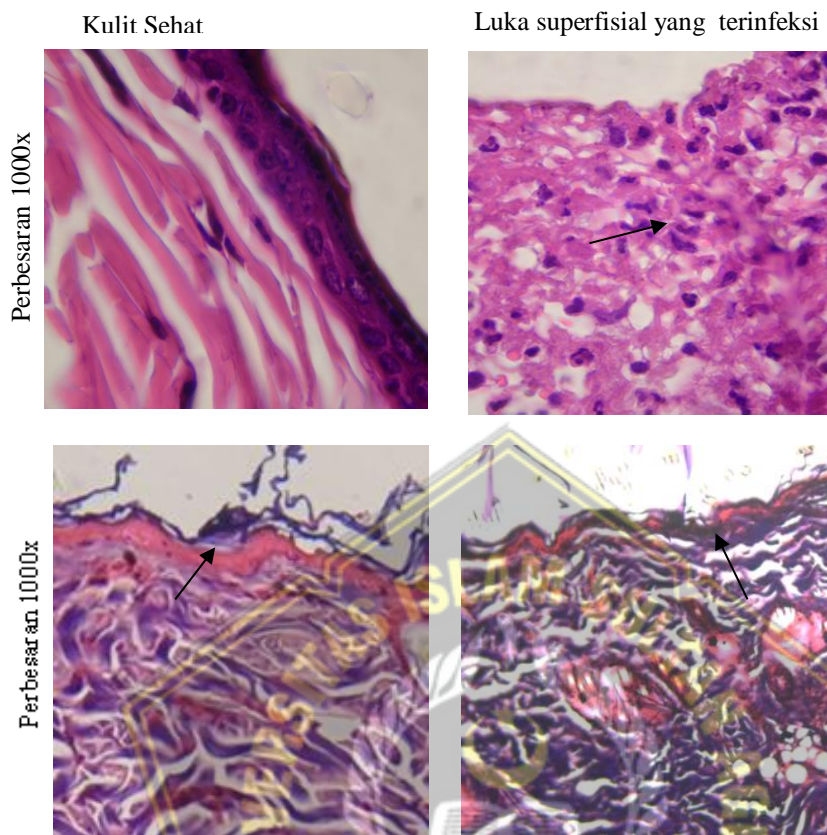
Medium kultur Mesenchymal Stem Cells (MSCs) yang mengandung sekretom kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode Tangential flow filtration (TFF) berdasarkan molekular *weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10- 50kDa yang mengandung sitokin interleukin-10 atau IL-10 dan Transforming growth factor - β . Hasil analisis konsentasi sekretom ditampilkan dalam tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil analisis konsentrasi sekretom

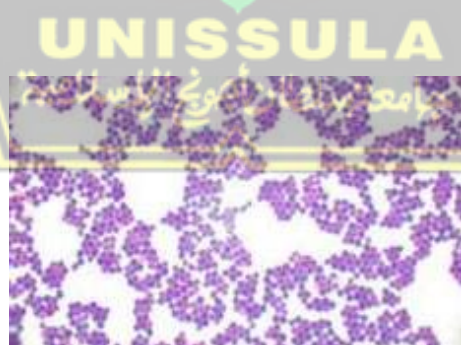
Molecules	SH-MSCs Value \pm SE (pg/mL)
VEGF	1017.16 \pm 40.31
PDGF	1047.23 \pm 38.73
bFGF	975.14 \pm 34.89
IL-10	545.17 \pm 13.54
TGF-β	272.13 \pm 10.58

5.1.2 Validasi model luka infeksi superfisial

Penelitian ini menggunakan model luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Hewan model diinduksi luka dengan sayatan hingga bagian epidermis dan diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* untuk menyebabkan infeksi. Validasi luka infeksi superfisial pada pemeriksaan mikrobiologi dengan pengecatan gram terlihat dengan hasil pewarnaan yang berwarna ungu dan berbentuk kokus dibawah pengamatan pada mikroskop (Gambar 5.5) dan pada pewarnaan HE terlihat bahwa kelompok luka infeksi superfisial mengalami inflamasi, hal ini terkonfirmasi dari banyaknya neutrophil yang terbentuk (tanda panah hitam pada perbesaran 1000x) (Gambar 5.6). Pada pewarnaan gram terlihat koloni berwarna biru di area epidermis (panah hitam) jika dibandingkan pada kelompok sehat yang tidak muncul warna biru pada daerah epidermis. Hal ini menunjukkan bahwa hewan model terkonfirmasi mengalami luka infeksi superfisial.



Gambar 5.6. Pengujian luka infeksi superfisial menggunakan metode pewarnaan Hematoxylin and Eosin (HE) serta pewarnaan gram untuk memvalidasi keberadaan infeksi bakteri ditandai oleh panah hitam



Gambar 5.5 Hasil pewarnaan gram Staphylococcus aureus ditandai dengan hasil pewarnaan berwarna ungu dan berbentuk kokus dibawah pengamatan pada mikroskop

5.1.3 Efek pemberian gel SH-MSCs dosis 25% dan 50% terhadap ekspresi gen IL 10 dan STAT 3

Peneliti mendapatkan hasil bahwa gel SH-MCs mampu meningkatkan ekspresi IL 10 dan STAT 3 (Tabel 5.2; Gambar 5.6; Gambar 5.7).

Tabel 5.2. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen IL 10 dan STAT 3

Variabel	Kelompok					P Value
	K1	K2	K3	P1	P2	
	Mean ± SD n = 6	Mean ± SD n = 6	Mean ± SD n = 6	Mean ± SD n = 6	Mean ± SD n = 6	
Ekspresi Gen IL-10 (%) <i>Saphiro Wilk</i> <i>Levene's Test</i> <i>Kruskal Wallis</i>	1,00±0,00	0,45±0,21 0,549	0,73±0,19 0,034	0,90±0,32 0,718	1,99±0,44 0,747	0,044 0,000*
Ekspresi Gen STAT 3 (%) <i>Saphiro Wilk</i> <i>Levene's Test</i> <i>Kruskal Wallis</i>	1,00±0,000	0,45±0,14 0,580	0,21±0,12 0,635	1,78±0,72 0,960	2,41±1,12 0,392	0,000 0,000*

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.2. Rerata ekspresi gen IL-10 pada P2 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen IL-10 kelompok K1. Selanjutnya rerata ekspresi gen IL-10 kelompok P1 dan rerata ekspresi gen IL-10 kelompok K3 dan yang terendah pada kelompok K2. Data ekspresi gen IL-10 terdapat kelompok (K3) yang tidak berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p < 0,05$. Pada uji homogenitas data menggunakan *Levene's Test* didapatkan hasil sebesar $p < 0,05$ yang artinya data tidak homogen, sehingga dilanjutkan dengan Uji *Kruskal Wallis*. Distribusi dan varian data ekspresi gen IL-10 yang tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen IL-

10 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat dosis dosis gel SH-MCs yang paling berpengaruh.

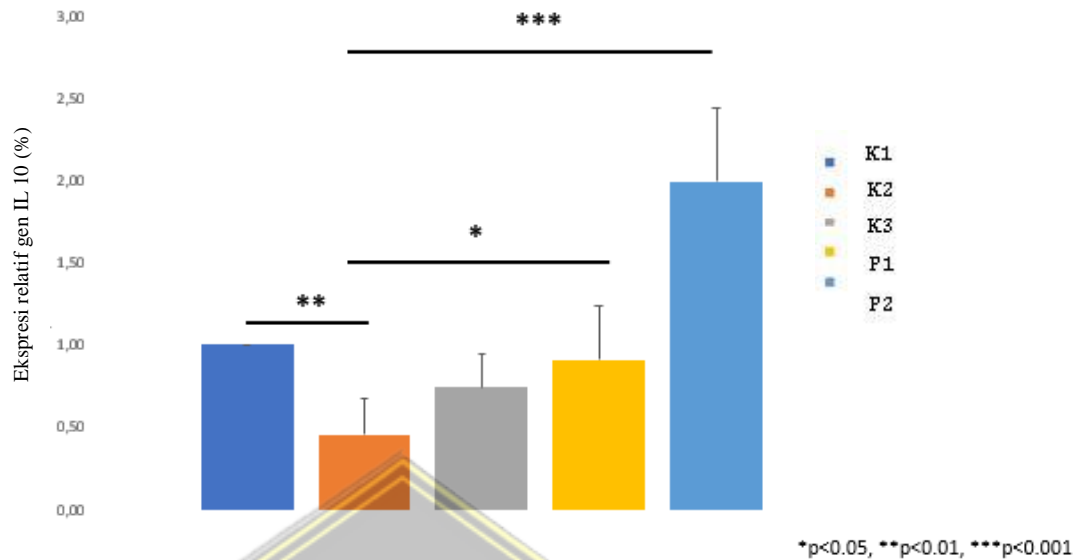
Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.2. Rerata ekspresi gen STAT3 di P2 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen STAT3 kelompok P1. Selanjutnya rerata ekspresi gen STAT3 kelompok K1 dan rerata ekspresi gen STAT3 kelompok K2 dan yang terendah pada kelompok K3. Data ekspresi gen STAT3 kelima kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$. Pada uji homogenitas data menggunakan *Levene's Test* didapatkan hasil sebesar $p < 0,05$ yang artinya data tidak homogen, sehingga dilanjutkan dengan Uji *Kruskal Wallis*. Distribusi dan varian data ekspresi gen STAT3 yang tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen STAT3 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat dosis gel dosis gel SH-MCs yang paling berpengaruh.

Tabel 5.3. Uji *Mann Whitney* Ekspresi Gen IL 10 dan STAT 3

	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
IL-10	K1	K2	0,004*
		K3	0,100
		P1	0,348
		P2	0,122
	K2	K3	0,205
		P1	0,048*
		P2	0,000
	K3	P1	0,479
		P2	0,001*
	P1	P2	0,013*
STAT3		K1	K2

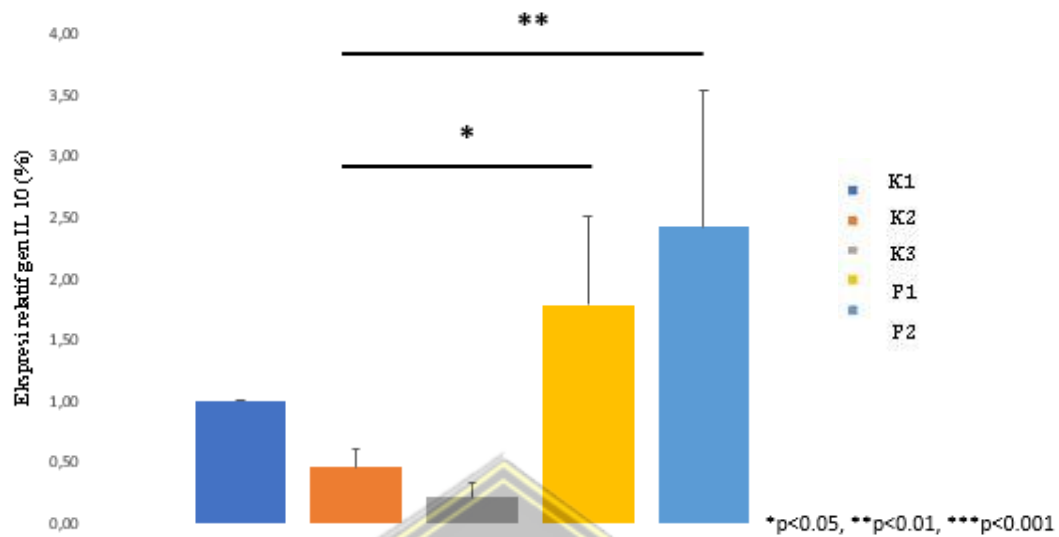
	K3	0,007*
	P1	0,357
	P2	0,147
K2	K3	0,307
	P1	0,010*
	P2	0,002*
K3	P1	0,000*
	P2	0,000*
P1	P2	0,598

Uji *Mann Whitney* diperoleh nilai $p < 0,05$ untuk perbandingan rerata ekspresi gen IL-10 antara K1 dengan K2 (0,004) terdapat perbedaan. Rerata K2 dengan P1 (0,048) ada perbedaan yang bermakna, K3 dan P2 (0,001) terdapat perbedaan yang bermakna. Pada P1 dan P2 (0,013) ada perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Hasil uji *Mann Whitney* pada data ekspresi gen IL-10 menunjukkan bahwa dosis gel SH-MCs 25% dan 50 % dapat meningkatkan ekspresi gen IL-10 pada tikus jantan galur wistar yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus Aureus*. Meskipun kedua pemberian dosis mampu meningkatkan ekspresi gen IL-10, perlakuan P2 memiliki pengaruh yang signifikan dibandingkan perlakuan P1.



Gambar 5.6 Ekspresi Gen IL-10

Uji *Mann Whitney* diperoleh nilai $p < 0,05$ untuk perbandingan rerata ekspresi gen STAT3 antara K1 dengan K3 (0,007) terdapat perbedaan. Rerata K3 dengan P1 (0,000) ada perbedaan yang bermakna, K2 dan P1 (0,010) terdapat perbedaan yang bermakna. Rerata K3 dengan P2 (0,000) ada perbedaan yang bermakna, K2 dan P2 (0,002) ada perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Hasil uji *Mann Whitney* pada data ekspresi gen STAT3 menunjukkan bahwa dosis gel SH-MCs 25% dan 50 % dapat meningkatkan ekspresi gen STAT3 pada tikus jantan galur wistar yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus Aureus*. Meskipun kedua pemberian dosis mampu meningkatkan ekspresi gen IL-10, perlakuan P1 dan P2 memiliki pengaruh yang signifikan dibandingkan perlakuan K3.



Gambar 5.7 Ekspresi Gen STAT3

5.2 PEMBAHASAN

Staphylococcus aureus dapat menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat respon stres oksidatif. ROS dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka, baik secara positif maupun negatif⁷. Kelebihan ROS memicu transduksi sinyal dan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), sebuah mediator inflamasi. Aktivasi pensinyalan NF- κ B mengarah pada produksi berbagai sitokin inflamasi, kemokin, faktor transkripsi, yang memulai dan memodulasi reaksi inflamasi, dan mengatur respon host terhadap kerusakan jaringan^{8,9}. NF- κ B menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), *interleukin 1* (IL-1), dan *interleukin-6* (IL-6) yang menyebabkan inflamasi kulit. Aktivasi *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT 3) dapat dipicu oleh berbagai faktor, seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan IL-6. Aktivasi faktor ini dapat memicu produksi sitokin pro-inflamasi, yang

meningkatkan respons inflamasi⁹. Ketika IL-10 dan STAT 3 diaktifkan, mereka bekerja bersama untuk menghambat peradangan dengan mengurangi produksi sitokin proinflamasi, menghambat aktivasi sel imun, dan mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam respons imun¹⁰.

IL-10 dapat menghentikan inflamasi dengan menghambat aktivasi NF- κ B melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah menghambat aktivasi I κ B kinase (IKK), yang merupakan langkah awal dalam aktivasi NF- κ B⁶⁵. 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- κ B yang disebabkan oleh reseptor TLR⁶⁶. IL-10 juga dapat menghambat aktivitas Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6), yang merupakan mediator penting dalam aktivasi NF- κ B. IL-10 dapat menghambat aktivasi TRAF6, yang mengurangi aktivasi NF- κ B yang diinduksi oleh sinyal TRAF6.

IL-10 yang terkandung dalam SH-MSCs yang memiliki fungsi sebagai antiinflamasi mengaktifkan STAT 3 yang terlihat dari peningkatan secara signifikan pada P1 dan P2. Faktor transkripsi STAT 3 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 pada luka tikus. STAT 3 berperan penting dalam regulasi fungsi sel T regulator (Treg), yang memiliki peran kunci dalam meredakan peradangan dan menjaga toleransi imunologis. Aktivasi STAT 3 dalam Treg dapat meningkatkan kemampuan mereka untuk menghambat respon imun

berlebihan dan meredakan peradangan. Selain itu STAT 3 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^{67,68}.

Pada penelitian lain menunjukkan bahwa terjadi penurunan inflamasi melalui aktivasi jalur IL-10 dan STAT 3 pathways. IL-10 akan berikatan dengan IL-10R menghasilkan aktivasi dari JAK 1 yang menginduksi fosforilasi STAT 3. Protein STAT 3 masuk ke nukleus dan mengaktivasi sekuens mRNA SOCS3 yang kemudian akan diekspresikan secara intraseluler dan dapat menekan jalur pensinyalan proinflamasi, yaitu NF-κB. Penekanan pada jalur NF-κB akan menyebabkan penurunan sekresi sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-6^{69,70}. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa MSC memiliki hubungan langsung aktivitas antimikroba in vitro terhadap *E. coli* dan *S. aureus*⁷¹. Penelitian lainnya menunjukkan bahwa MSC pada manusia mengeluarkan faktor yang membunuh bakteri dengan mendepolarisasi membran sel bakteri. MSC menunjukkan efek antimikroba, terutama melalui sekresi antimikroba peptida (AMPs). Akibatnya, faktor yang disekresi MSC mengobati luka kulit yang terinfeksi bakteri pada manusia⁷². 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-10⁶¹. 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 STAT 3 melalui translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma^{26,73}. Hal ini berdampak pada fosforilasi STAT 3 yang berujung pada translokasinya menuju nukleus. Translokasi STAT 3 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 STAT 3 secara signifikan pada kelompok P2 (gel SH-MSCs) dibandingkan kelompok tikus K2 menunjukkan bahwa gel SH-MSCs dapat mengontrol inflamasi. Dalam penelitian ini tingginya ekspresi STAT3 pada kelompok yang diberi SH-MSCs (P1 dan P2) menunjukkan bahwa gel ini secara efektif mengaktifkan jalur anti-inflamasi yang penting untuk penyembuhan luka. Meskipun ini memiliki banyak manfaat dalam mengurangi inflamasi dan mempercepat proses penyembuhan, ada juga potensi risiko yang perlu dipertimbangkan, seperti perubahan dalam respon imun dan risiko proliferasi sel yang tidak terkontrol. Oleh karena itu, penting untuk memonitor dan mengoptimalkan dosis serta durasi penggunaan SH-MSCs dalam terapi luka untuk memaksimalkan manfaatnya sambil meminimalkan potensi efek samping.

BAB VI

KESIMPULAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Gel SH-MSCs dapat meningkatkan ekspresi gen IL-10 dan STAT3 pada tikus galur Wistar dengan luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Pemberian gel SH-MSCs dosis 50% terbukti secara bermakna berpengaruh dibandingkan dosis 25% μ l dibandingkan kelompok kontrol negatif terhadap peningkatan kadar IL-10 pada tikus galur Wistar dengan luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.
3. Pemberian gel SH-MSCs dosis 25% dan 50% terbukti secara bermakna menyebabkan peningkatan dibandingkan kelompok kontrol positif terhadap peningkatan ekspresi gen STAT 3 pada tikus galur Wistar dengan luka superfisial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

6.2. Saran

Saran dari peneliti untuk penelitian selanjutnya pemberian secretom pada luka yang terinfeksi dapat membantu mengatur respons imun tubuh, memodulasi aktivitas makrofag menuju fenotipe antiinflamasi, dan mengurangi aktivasi berlebihan dari sistem komplemen. Hal ini dapat membantu mempercepat proses penyembuhan luka dan mengurangi risiko komplikasi yang terkait dengan peradangan berlebihan. Namun, akan lebih baik penelitian selanjutnya diperlukan untuk memahami mekanisme yang terlibat dan efek secretom secara

menyeluruh pada respons imun tubuh dalam konteks luka terinfeksi. Dengan kombinasi pemberian antibiotik untuk mengontrol infeksi bakteri dan secretom (SH-MSCs) untuk mengontrol inflamasi dapat menjadi strategi yang efektif dalam memfasilitasi penyembuhan luka yang optimal. Selain itu perlu dilakukan analisis pengaruh pemberian SH- MSCs terhadap ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF alpha pada tikus galur Wistar dengan luka superficial yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*



DAFTAR PUSTAKA

1. Widasari Sri Gitarja. Pelatihan Perawatan luka Bagi Praktisi Kesehatan di Fasilitas Pelayanan Kesehatan. (2021).
2. Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E. & Pisani, S. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. (2020).
3. Metcalf, D. G. & Bowler, P. G. Clinician perceptions of wound biofilm. *Int. Wound J.* **13**, 717–725 (2016).
4. Jurado, R. & Walker., H. K. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Chapter 74 Cerebrospinal Fluid. *J. Pharm.* **74** (2020) doi:doi:10.3390/ph13040060.
5. Cristina, A. & Gonzalez, D. O. Wound healing - A literature review *. *An. Bras. Dermatol.* **614–620** (2016) doi:http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741 Abstract:
6. Spellberg, B. *et al.* Combating antimicrobial resistance: Policy recommendations to save lives. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 397–428 (2011).
7. Wang, G. *et al.* The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. *Biomed. Pharmacother.* **157**, 114004 (2023).
8. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1–15** (2009).
9. Su, C. M., Wang, L. & Yoo, D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).
10. Iyer, S. S. & Cheng, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 23–63 (2012).
11. Su, V. Y. F., Lin, C. S., Hung, S. C. & Yang, K. Y. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ b pathway in endotoxin- induced acute lung injury. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
12. Trisnadi, S., Muhar, A. M., Putra, A. & Kustiyah, A. R. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β inhibition. *Universa Med.* **39**, 97–104 (2020).
13. Alderden, J., Rondinelli, J., Pepper, G., Cummins, M. & Whitney, J. A. Risk factors for pressure injuries among critical care patients: A systematic review. *Int. J. Nurs. Stud.* **71**, 97–114 (2017).
14. Haagsma, J. A. *et al.* The global burden of injury: Incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the global burden of disease study 2013. *Inj. Prev.* **22**, 3–18 (2016).
15. Múzes, G. & Sipos, F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells* **11**, (2022).

16. Putra, A. *et al.* The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **6**, 1779–1783 (2018).
17. Chen, E. *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.* **32**, 4917–4929 (2018).
18. Li, M. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars. *Int. Wound J.* **14**, 64–73 (2017).
19. Yustianingsih, V., Sumarawati, T. & Putra, A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. **38**, 164–171 (2019).
20. Novalia K., Edi D., Chodidjah, Nasihun T., P. A. Pengaruh Medium Conditional MSC yang Diaktivasi TNF- α terhadap kadar PDGF dan Jumlah Fibroblas.pdf.
21. Ramadhanti, O. W. *et al.* Perbandingan Pemberian Mesenchymal Stem Cell Hipoksia dan Normoksia Terhadap Ekspresi IL-10 pada Tikus Model Luka Eksisi. *JMHS J. Midwifery Heal. Sci. Sultan Agung* **1**, 20–27 (2021).
22. Putra, A. *et al.* Topical gel of mesenchymal stem cells-conditioned medium under TNF- α precondition accelerates wound closure healing in full-thickness skin defect animal model. *J. Med. Life* **15**, 214–221 (2022).
23. King, A., Balaji, S., Le, L. D., Crombleholme, T. M. & Keswani, S. G. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv. Wound Care* **3**, 315–323 (2014).
24. Rojas, J. M., Avia, M., Martín, V. & Sevilla, N. IL-10: A multifunctional cytokine in viral infections. *J. Immunol. Res.* **2017**, (2017).
25. Ouyang, W. & O'Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* **50**, 871–891 (2019).
26. Chang, C. C. *et al.* Targeting of interleukin-10 receptor by a potential human interleukin-10 peptide efficiently blocks interleukin-10 pathway-dependent cell proliferation. *Tzu Chi Med. J.* **32**, 245–253 (2020).
27. Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 2563–2582 (2014).
28. Li, D. & Wu, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 1–24 (2021).
29. Ma, X. *et al.* Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research* **4**, 1–13 (2015).
30. Bare, Y., Marhendra, A. P. W., Sasase, T. & Fatchiyah, F. Differential expression of IL-10 gene and protein in target tissues of rattus norvegicus strain wistar model type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Acta Inform. Medica* **26**, 87–92 (2018).
31. Kubo, M. & Motomura, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front. Immunol.* **3**,

- 1–9 (2012).
32. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, (2017).
 33. Gaddis, D. E., Maynard, C. L., Weaver, C. T., Michalek, S. M. & Katz, J. Role of TLR2-dependent IL-10 production in the inhibition of the initial IFN- γ T cell response to *Porphyromonas gingivalis*. *J. Leukoc. Biol.* **93**, 21–31 (2013).
 34. Short, W. D. *et al.* IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3. *FASEB J.* **36**, (2022).
 35. Saraiva, M. *et al.* Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* **217**, 1–19 (2020).
 36. Hutchins, A. P., Diez, D. & Miranda-Saavedra, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges. *Brief. Funct. Genomics* **12**, 489–498 (2013).
 37. Böhmer, F.-D. & Friedrich, K. Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *Jak-Stat* **3**, e28087 (2014).
 38. Putra, A. *Basic Molecular Stem Cell. Unissula Press* vol. 1 (2019).
 39. He, G. & Karin, M. NF- κ B and STAT3- key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* **21**, 159–168 (2011).
 40. Steen, E. H. *et al.* The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv. Wound Care* **9**, 184–198 (2020).
 41. Margono, A. Potensi Sel Punca Mesenkhim Asal Jaringan Lemak dengan Produk Plasma untuk Regenerasi Sel Odontoblas Jaringan Pulpa In Vitro. *Progr. Dr. Ilmu Kedokt. Gigi* (2012).
 42. Varaa, N., Azandeh, S., Khodabandeh, Z. & Gharravi, A. M. Wharton's Jelly mesenchymal stem cell: Various protocols for isolation and differentiation of hepatocyte-like cells; narrative review. *Iran. J. Med. Sci.* **44**, 437–448 (2019).
 43. Song, M. *et al.* The paracrine effects of mesenchymal stem cells stimulate the regeneration capacity of endogenous stem cells in the repair of a bladder-outlet-obstruction- induced overactive bladder. *Stem Cells Dev.* **23**, 654–663 (2014).
 44. Ahangar, P., Mills, S. J. & Cowin, A. J. Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–15 (2020).
 45. Ejtehadifar, M. *et al.* The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Adv. Pharm. Bull.* **5**, 141–149 (2015).
 46. Madrigal, M., Rao, K. S. & Riordan, N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med.* **12**, 1–14 (2014).
 47. Berlian, M. A. *et al.* Topical Gel of Mesenchymal Stem Cell- Conditioned Medium-induced Serum Injury Accelerates Wound Healing in Skin Excision Tissue. 10–17 (2022).

48. Shoma Suresh, K., Bhat, S., Guru, B. R., Muttigi, M. S. & Seetharam, R. N. A nanocomposite hydrogel delivery system for mesenchymal stromal cell secretome. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 1–14 (2020).
49. Putri, R. S. Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Telang terhadap Ekspresi Gen GPx dan Gen PDGF. (2022).
50. Allan, Y., Kevin, K. & Sandeep, K. Gel Strength Measurement for Drilling Fluid - Reform of Gel Microstructure. *Am. Assoc. Drill. Eng.* 2–6 (2015).
51. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* **6**, 105–121 (2015).
52. Shakeel, A. *et al.* Key characteristics and modelling of bigels systems: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **97**, 932–953 (2019).
53. Cabral, M. E. S. *et al.* Formulation and quality control of semi-solid containing harmless bacteria by-products: Chronic wounds pro-healing activity. *Pharm. Dev. Technol.* **20**, 911–918 (2015).
54. Nair, A., Jacob, S., Al-Dhubiab, B., Attimarad, M. & Harsha, S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **49**, 423–434 (2013).
55. Raina, N., Rani, R., Thakur, V. K. & Gupta, M. New Insights in Topical Drug Delivery for Skin Disorders: From a Nanotechnological Perspective. *ACS Omega* **8**, 19145–19167 (2023).
56. Xie, W. J. *et al.* The effect and mechanism of transdermal penetration enhancement of Fu's cupping therapy: New physical penetration technology for transdermal administration with Traditional Chinese Medicine (TCM) characteristics. *Molecules* **22**, (2017).
57. Sharma, A., Chakraborty, A. & Jaganathan, B. G. Review of the potential of mesenchymal stem cells for the treatment of infectious diseases. *World J. Stem Cells* **13**, 568–593 (2021).
58. McFarland-Mancini, M. M. *et al.* Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor. *J. Immunol.* **184**, 7219–7228 (2010).
59. Hanke, J. © 2017 Jennifer Hanke ALL RIGHTS RESERVED. *Role NFκB BCL-2 IGFBP-3 Mediat. Intrinsic Apoptosis* (2017).
60. Giridharan, S. & Srinivasan, M. Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J. Inflamm. Res.* **11**, 407–419 (2018).
61. Ferreira, J. R. *et al.* Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front. Immunol.* **9**, 1–17 (2018).
62. Porro, C., Cianciulli, A. & Panaro, M. A. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules* **10**, 1–15 (2020).
63. Valle-Mendiola, A., Gutiérrez-Hoya, A. & Soto-Cruz, I. JAK/STAT Signaling and Cervical Cancer: From the Cell Surface to the Nucleus. *Genes (Basel)*. **14**, (2023).
64. Xiao, T., Yan, Z., Xiao, S. & Xia, Y. Proinflammatory cytokines regulate

- epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 1–9 (2020).
65. Ono, Y. *et al.* CD11c⁺ M1-like macrophages (MΦs) but not CD206⁺ M2-like MΦ are involved in folliculogenesis in mice ovary. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
 66. Altındağ, F. Silymarin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by downregulating TNF- α and NF-kB and by upregulating IL-10. *J. Exp. Clin. Med.* **39**, 216–220 (2022).
 67. Yan, S. *et al.* MSC-ACE2 Ameliorates Streptococcus uberis-Induced Inflammatory Injury in Mammary Epithelial Cells by Upregulating the IL-10/STAT3/SOCS3 Pathway. *Front. Immunol.* **13**, 1–13 (2022).
 68. He, Y. *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve the function of liver in rats with acute-on-chronic liver failure via downregulating Notch and Stat1/Stat3 signaling. *Stem Cell Res. Ther.* **12**, 1–19 (2021).
 69. Saraiva, M. & O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 170–181 (2010).
 70. Mühl, H. *et al.* IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Front. Immunol.* / www.frontiersin.org **1**, 1267 (2019).
 71. Yagi, H. *et al.* Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells against Staphylococcus aureus. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 1–12 (2020).
 72. Marx, C., Gardner, S., Harman, R. M. & Van de Walle, G. R. The mesenchymal stromal cell secretome impairs methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms via cysteine protease activity in the equine model. *Stem Cells Transl. Med.* **9**, 746–757 (2020).
 73. Tan, W., Zou, J. L., Yoshida, S., Jiang, B. & Zhou, Y. Di. Increased vitreal levels of interleukin-10 in diabetic retinopathy: A Meta-analysis. *Int. J. Ophthalmol.* **13**, 1477–1483 (2020).