

**PENGARUH FISIOLOGI PEMBERIAN *HYPOXIC
PRECONDITIONED UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STEM CELLS (HUC-MSCs)*
TERHADAP KADAR IFN- γ DAN IL-10
(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Model Stroke)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Rakha Fahreza

MBK2324010463

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

2025

TESIS

PENGARUH FISILOGI PEMBERIAN *HYPOXIC PRECONDITIONED UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS (HUC-MSCs)* TERHADAP KADAR IFN- γ DAN IL-10
(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Model Stroke)

Disusun Oleh:

Rakha Fahreza

MBK2324010463

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS

NIK : 210113160

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

NIK. 210199049

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS

NIK : 210113160

PERNYATAAN

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

Semarang, 14 Agustus 2025



Rakha Fahreza

MBK2324010463



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Rakha Fahreza
Tempat / tanggal lahir : Salatiga, 07 April 1995
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

TK : Lulus tahun 2001
SD Islamic Center : Lulus tahun 2007
SMP Hj Isriati : Lulus tahun 2010
SMAN 6 Semarang : Lulus tahun 2013
S1 FK UNISSULA : Lulus tahun 2018
Profesi Dokter UNISSULA : Lulus tahun
Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2024 – sekarang)

C. Riwayat keluarga

Nama Istri : Vallencia Anggie Ariesta
Nama Anak : 1. Rakhayla Ceisya Jinan
2. Rakhasya Xavier Alghaisana
3. Rakhasya Kafeel Alhazen

D. Riwayat pekerjaan

1. Dokter umum di *Stem Cell Cancer and Research Semarang*

KATA PENGANTAR

Kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan proposal tesis dengan judul **“Pengaruh Fisiologi Pemberian *Hypoxic Preconditioned Mesenchymal Stem Cell* Terhadap Kadar *IFN- γ* dan *IL-10* (Studi Eksperimental In Vivo Tikus Model Stroke)”**. Pada penyusunan proposal tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan seluruh wakil Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang, serta selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang, serta dosen pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proses tesis ini.

4. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes, Dr.dr.Joko Wahyu Wibowo, M.Kes dan Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dewan penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang membangun agar penelitian ini menjadi lebih baik
5. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
6. Segenap staff SCCR (*Stem Cell Cancer Research*) yang sudah seperti keluarga kedua saya.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis berharap kritik dan saran demi perbaikan. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta bagi pihak – pihak lain yang berkepentingan.

Semarang, 14 Agustus 2025

Penulis,

Rakha Fahreza

MBK2324010463

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT.....	xvi
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.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.4.2. Manfaat Praktis.....	6
1.5. Originalitas Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Interferon- γ (IFN- γ).....	10
2.2. Interleukin-10 (IL-10).....	11
2.3. <i>Hypoxic Preconditioned Mesenchymal Stem Cells</i> (Hypoxic-MSD)...	12
2.4. Stroke.....	15
2.4.1. Definisi Stroke Iskemik	15
2.4.2. Patogenesis Stroke Iskemik	16

2.5. Hubungan antara HUC-MSCs Terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada kasus Inflamasi	18
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	20
3.1. Kerangka Teori	20
3.2. Kerangka Konsep	23
3.3. Hipotesis	23
BAB IV METODE PENELITIAN	24
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	24
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	25
4.2.1. Variabel Penelitian.....	25
4.2.2. Definisi Operasional	26
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	28
4.3.1. Subjek Penelitian	28
4.3.2. Sampel Penelitian	28
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel.....	29
4.3.4. Besar Sampel	29
4.4. Alat dan Bahan	30
4.4.1. Alat	30
4.4.2. Bahan	30
4.5. Prosedur Pelaksanaan Penelitian.....	32
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	32
4.5.2. Isolasi MSC dari <i>Umbilical Cord</i> (UC).....	32
4.5.3. Validasi MSC.....	33
4.5.4. Prosedur Hipoksia MSC	34
4.5.5. Induksi Tikus Model Stroke	35
4.5.6. Pemberian HUC-MSCs	36
4.5.7. Uji Kadar IFN- γ dan IL-10	37
4.6. Analisis Data.....	38
4.7. Alur Penelitian.....	39
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
5.1. Hasil Penelitian.....	41

5.2. Pembahasan	50
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	56
6.1. Kesimpulan	56
6.2. Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	64



DAFTAR SINGKATAN

ADMSCs	: <i>adipose tissue-derived mesenchymal stem cells</i>
APC	: <i>antigen-presenting cell</i>
BM-MSC	: <i>bone marrow-mesenchymal stem cell</i>
CSIF	: <i>cytokine synthesis inhibitory factor</i>
DAMP	: <i>damage-associated molecular pattern toll-like receptor 4</i>
ESC	: <i>Embryonic Stem Cells</i>
HIF-1	: <i>hypoxia-inducible factor 1</i>
hNSC	: <i>human neural stem cells</i>
HUC-MSCs	: <i>hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell</i>
ICAM-1	: <i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	: <i>interferon-γ</i>
IFN- γ R	: <i>interferon-γ receptor</i>
IL-1	: <i>interleukin-1</i>
IL-10	: <i>interleukin-10</i>
iNOS	: <i>nitric oxide synthase</i>
IRF-1	: <i>interferon regulatory factor 1</i>
MCP-1	: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	: <i>histocompatibility complex</i>
mLDL	: <i>modified LDL</i>
mNSS	: <i>modified Neurologic Severity Score</i>
MPTP	: <i>mitochondrial permeability transition pore</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NF- κ B	: <i>nuclear factor κB</i>
PAF	: <i>platelet-activating factor</i>
sel NK	: <i>natural killer cell</i>
STAT	: <i>signal transducers and activators of transcription</i>
TLR4	: <i>toll-like receptor 4</i>

TNF- α	: <i>tumor necrosis factor</i>
TRIF	: <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
UC-MSCs	: <i>umbilical cord mesenchymal stem cells</i>
VCAM-1	: <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VCAM-3	: <i>vascular cell adhesion molecule-3</i>
VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>
WJ-MSCs	: <i>umbilical cord wharton jelly mesenchymal stem cells</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	7
Tabel 5.1. Hasil Analisis Statistik Kadar IFN- γ	46
Tabel 5.2. Hasil Post-Hoc LSD Kadar IFN- γ	46
Tabel 5.3. Hasil Analisis Statistik Kadar IL-10.....	49
Tabel 5.4. Hasil Post-Hoc Tamhane T2 Kadar IL-10.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Mekanisme terkait dengan sel punca yang berasal dari berbagai sumber dalam pengobatan stroke iskemik.....	13
Gambar 2.2.	Mekanisme terapi MSC untuk stroke iskemik.	14
Gambar 2.3.	Skema peran IFN- γ dalam aterogenesis dan pembentukan lesi aterosklerotik pada pathogenesis stroke iskemik.	18
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	22
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep Penelitian	23
Gambar 4.1.	Alur Rancangan Penelitian	25
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	39
Gambar 5.1.	Karakter morfologi sel hasil Isolasi.....	42
Gambar 5.2.	Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi.....	43
Gambar 5.3.	Kemampuan differensiasi sel hasil isolasi.....	43
Gambar 5.4.	Hasil pewarnaan TTC pada kelompok sehat dan MCAO.....	45
Gambar 5.5.	Kadar protein IFN- γ pada jaringan otak tikus stroke iskemik pada semua kelompok.....	48
Gambar 5.5.	Kadar protein IL-10 pada jaringan otak tikus stroke iskemik pada semua kelompok.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	65
Lampiran 2. Data Statistik.....	66
Lampiran 3. Foto Kegiatan.....	70
Lampiran 2. Data Statistik.....	71



ABSTRAK

Pendahuluan: Stroke iskemik merupakan salah satu penyebab utama kecacatan dan kematian di seluruh dunia. Inflamasi memegang peran sentral dalam patogenesisnya, yang ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamasi seperti IFN- γ dan penurunan sitokin antiinflamasi seperti IL-10. Mesenchymal stem cell (MSC), khususnya yang berasal dari umbilical cord, menunjukkan potensi imunomodulator yang lebih kuat ketika diberi kondisi hipoksia. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek pemberian HUC-MSC dengan preconditioning hipoksia terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada model tikus stroke iskemik. **Metode:** Penelitian eksperimental in vivo ini menggunakan rancangan randomized post-test only control group dengan lima kelompok tikus Wistar jantan ($n=5$ tiap kelompok), mulai dari kontrol sehat hingga kelompok induksi stroke yang diberi terapi MSC hipoksia pada dosis berbeda ($1,5 \times 10^6$ dan 3×10^6). Kadar IFN- γ dan IL-10 pada jaringan otak diukur menggunakan metode ELISA. **Hasil:** Terjadi penurunan signifikan kadar IFN- γ pada kelompok yang mendapat terapi HUC-MSC (K3 $603,3 \pm 151,4$ pg/mL dan K4 $485,3 \pm 103,6$ pg/mL) dibandingkan Kontrol Negatif (K2 $918,7 \pm 178,1$ pg/mL), dan peningkatan IL-10 pada kelompok yang mendapat terapi HUC-MSC (K3 $131,0 \pm 15,3$ pg/mL dan K4 $186,6 \pm 25,2$ pg/mL) dibandingkan Kontrol Negatif (K2 $97,4 \pm 11,1$ pg/mL). **Kesimpulan:** HUC-MSC mampu menurunkan inflamasi pasca stroke dengan menurunkan kadar IFN- γ dan meningkatkan IL-10, sehingga menunjukkan potensi imunomodulator yang menjanjikan.

Kata kunci: stroke iskemik, HUC-MSC, hipoksia, IFN- γ , IL-10

ABSTRACT

Introduction: Ischemic stroke is a major global cause of disability and mortality. Inflammation plays a central role in its pathogenesis, marked by elevated pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and reduced anti-inflammatory cytokines like IL-10. Mesenchymal stem cells (MSCs), especially umbilical cord-derived, exhibit enhanced immunomodulatory potential when hypoxia-conditioned (HUC-MSCs). This study aims to evaluate the effect of HUC-MSCs administration on IFN- γ and IL-10 levels in an ischemic stroke rat model. **Methods:** This in vivo experimental study employed a randomized post-test only control group design with five groups of male Wistar rats ($n=5$), ranging from healthy controls to stroke-induced groups treated with hypoxic MSCs at different doses (1.5×10^6 and 3×10^6). IFN- γ and IL-10 levels in brain tissue of each group were measured via ELISA. **Results:** A significant decrease in IFN- γ levels was observed in the groups treated with HUC-MSCs (K3: 603.3 ± 151.4 pg/mL and K4: 485.3 ± 103.6 pg/mL) compared to the Negative Control (K2: 918.7 ± 178.1 pg/mL). Conversely, IL-10 levels were increased in the HUC-MSC-treated groups (K3: 131.0 ± 15.3 pg/mL and K4: 186.6 ± 25.2 pg/mL) compared to the Negative Control (K2: 97.4 ± 11.1 pg/mL). **Conclusion:** HUC-MSCs reduce inflammation post-stroke by lowering IFN- γ and enhancing IL-10, indicating promising immunomodulatory potential.

Keywords: ischemic stroke, HUC-MSCs, hypoxia, IFN- γ , IL-10

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Stroke didefinisikan sebagai suatu keadaan darurat medis kritis yang ditandai dengan timbulnya defisit neurologis fokal secara tiba-tiba yang berasal dari gangguan serebrovaskular.^{1,2} Stroke iskemik merupakan gangguan aliran darah ke otak menyebabkan hipoksia dan hipoglikemia yang berujung pada infark jaringan otak sehingga dan menyebabkan kerusakan sel lebih lanjut.^{3,4} Perbaikan pembuluh darah (perisit, sel otot polos, dan sel endotel) serta oligodendrosit, neuron, dan astrosit merupakan hal yang sangat penting.^{4,5} Dalam beberapa tahun terakhir, dokter telah menggunakan obat-obatan kimia dan pembedahan untuk mengobati stroke iskemik.⁵ Terapi tersebut hanya untuk mencegah terjadinya penggumpalan darah guna mencegah kerusakan sistem saraf, sehingga dibutuhkan terapi yang bersifat restoratif untuk manfaat jangka panjang.⁵ Pemberian *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) telah dipertimbangkan dalam bidang penelitian sebagai terapi regeneratif yang lebih menjanjikan untuk kerusakan otak akibat stroke dengan mencegah apoptosis sel, memodulasi respon inflamasi dan meningkatkan mekanisme perbaikan endogen seperti neurogenesis dan angiogenesis.^{5,6}

Aterosklerosis adalah peradangan kronis pada pembuluh darah akibat kerusakan endotel oleh kolesterol dan radikal bebas.^{7,8} Kolesterol

mengaktivasi makrofag melalui TLR4 dan mendorong rekrutmen monosit yang berubah menjadi foam cell setelah mengambil LDL teroksidasi. Aktivasi makrofag dipicu oleh IFN- γ yang meningkatkan ekspresi *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1 dan VCAM-3), memfasilitasi adhesi sel imun dan pembentukan plak^{8,9}. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa IL-10 sebagai sitokin anti-inflamasi dapat menurunkan volume infark pada model iskemia otak, menandakan potensi efek neuroprotektifnya. Dalam studi eksperimental sebelumnya, kerusakan jaringan iskemik dapat diterapi dengan agen anti-inflamasi salah satunya sitokin anti-inflamasi *interleukin-10* (IL-10).¹⁰ Pemberian IL-10 pada model iskemia otak fokal eksperimental menghasilkan penurunan volume infark, yang menunjukkan potensi efek neuroprotektif.¹⁰

Insidensi dan prevalensi stroke iskemik makin bertambah setiap tahunnya.² Secara umum, stroke iskemik mencakup sekitar 80% kasus stroke.³ Pada tahun 2016, kejadian stroke iskemik adalah 9,5 juta sedangkan pada tahun 2017, ada terdapat 2,7 juta kematian akibat stroke iskemik.² Berdasarkan data Survei Kesehatan Indonesia pada tahun 2023, prevalensi stroke di Indonesia mencapai 8,3 per 1.000 penduduk.¹¹ Stroke juga merupakan salah satu penyakit dengan pembiayaan tertinggi ketiga setelah penyakit jantung dan kanker, yaitu mencapai Rp5,2 triliun pada 2023.¹¹ Hal ini menjadikan stroke sebagai penyakit dengan kecacatan nomor satu dan kematian nomor dua di dunia.^{2,11} Tatalaksana stroke iskemik saat ini sangat terbatas hanya untuk mempertahankan jaringan di area dimana perfusi

menurun dan cukup untuk mencegah kerusakan lebih lanjut.^{1,12} Oleh karena itu, terdapat harapan besar terhadap terapi regeneratif untuk meningkatkan perbaikan dan meminimalisir kecacatan setelah stroke iskemik.¹² Dalam beberapa tahun terakhir, penelitian telah membuktikan bahwa MSC terutama yang telah dikondisikan hipoksia direkrut ke area kerusakan jaringan, peluang ini memberi peran MSC dalam terapi stroke iskemik.^{13,14}

Studi sebelumnya menunjukkan pemberian *bone marrow-mesenchymal stem cell* (BM-MSC) tikus yang dikondisikan hipoksia secara intravena ke dalam tikus model iskemia serebral terbukti menghambat aktivitas mikroglia di otak dan mendorong pemulihan stroke yang lebih baik dibandingkan MSC normoksik.¹⁵ Pada penelitian ini, hewan model stroke diinduksi dengan metode *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) yang pemilihannya didasarkan pada kemiripannya dengan patofisiologi stroke iskemik pada manusia, khususnya pada sumbatan arteri serebri media yang merupakan lokasi tersering terjadinya stroke. Metode ini memungkinkan kontrol terhadap durasi oklusi serta luas area infark, sehingga relevan untuk mengevaluasi efektivitas terapi neuroprotektif dan inflamasi pasca stroke. Hal ini dikarenakan MSC Hipoksia bertindak sebagai imunomodulator dengan melepaskan sitokin IL-10.^{5,13} Namun, sampai saat ini belum ada studi mengenai MSC hipoksia terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke. Penelitian ini berfokus pada pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10. Parameter IFN- γ dan IL-10 dipilih

berdasarkan pada peran pentingnya dalam respons imun pasca stroke: IFN- γ sebagai penanda utama inflamasi yang memperburuk kerusakan jaringan saraf, sedangkan IL-10 berfungsi sebagai sitokin anti-inflamasi yang berperan penting dalam resolusi inflamasi dan neuroproteksi. Dengan mengevaluasi kedua parameter ini, diharapkan dapat memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai potensi imunomodulator HUC-MSCs dalam memperbaiki kondisi pasca stroke melalui mekanisme pengaturan keseimbangan pro dan anti-inflamasi.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap penurunan kadar IFN- γ dibanding kelompok kontrol.

2. Membuktikan pengaruh *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap peningkatan kadar IL-10 dibanding kelompok kontrol.



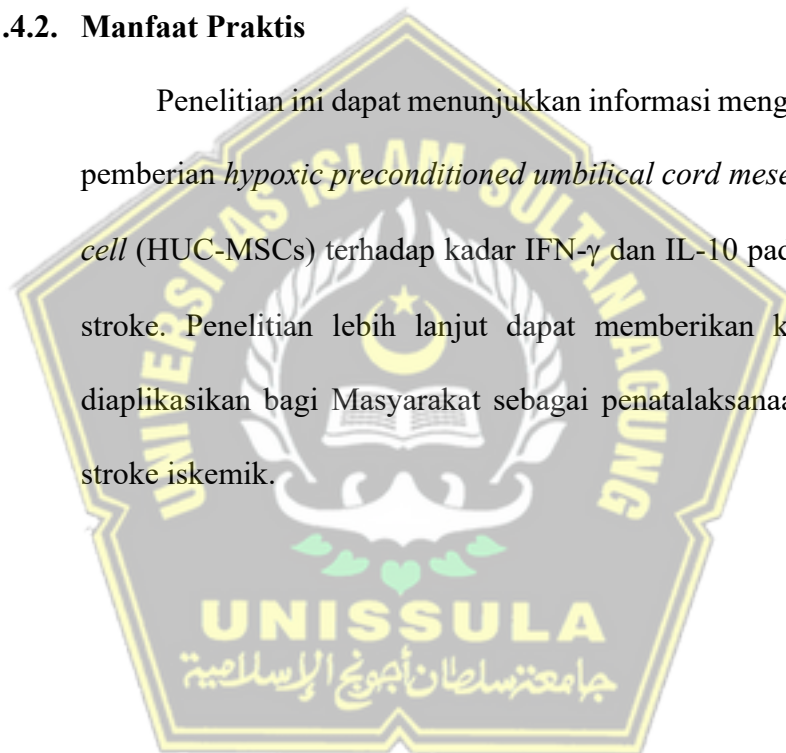
1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan pengetahuan baru mengenai pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat menunjukkan informasi mengenai pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke. Penelitian lebih lanjut dapat memberikan kontribusi dan diaplikasikan bagi Masyarakat sebagai penatalaksanaan pada kasus stroke iskemik.



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Cunningham, C.J., Wong, R., Barrington, J. <i>et al.</i> (2020). <i>Stem Cell Res Ther</i> 11, 32. ¹²	<i>Systemic conditioned medium treatment from interleukin-1 primed mesenchymal stem cells promotes recovery after stroke.</i>	Experimental in vivo	Pemberian <i>conditioned medium</i> secara sistemik dari MSC dengan <i>priming</i> IL-1 α mendorong peningkatan pemulihan pada model tikus yang mengalami serebral iskemia. Meskipun di perlukan penelitian lebih lanjut untuk menjelaskan mekanisme kerja dan menentukan <i>priming</i> yang optimal dalam mendorong perbaikan, sekretom IL-1-MSC memiliki potensi besar sebagai terapi aselular untuk pengobatan stroke iskemik.
2	Wei, L., Fraser, J. L., Lu, Z.-Y., Hu, X., & Yu, S. P. (2012). <i>Neurobiology of Disease</i> , 46(3), 635–645. ¹⁵	<i>Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats.</i>	Experimental in vivo	Transplantasi <i>hypoxia preconditioned bone marrow MSC</i> dapat meningkatkan angiogenesis dan neurogenesis setelah iskemia serebral pada tikus.
3	Ryu S, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. (2016). <i>Neural Regen Res.</i> Feb;11(2):298-304. ¹⁶	<i>Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain.</i>	Experimental in vivo	Dalam studi ini menunjukkan peningkatan skor perilaku yang signifikan antara tikus yang diberi transplantasi <i>human neural stem cells</i> (hNSC) dengan kelompok tikus kontrol positif model iskemia serebral menggunakan <i>tes modified Neurologic Severity Score</i>

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
				(mNSS). Transplantasi hNSC mendorong proliferasi sel induk saraf endogen dan meningkatkan angiogenesis.
4	Mu J, Bakreen A, Juntunen M, Korhonen P, Oinonen E, Cui L, Myllyniemi M, Zhao S, Miettinen S, Jolkkonen J. (2019). Front Neurol. March 26;10:235. ¹⁷	<i>Combined Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy and Rehabilitation in Experimental Stroke.</i>	Experimental in vivo	Pemberian <i>adipose tissue-derived mesenchymal stem cells</i> (ADMSCs) secara intravena dibuktikan aman dan dapat menginduksi angiogenesis namun tidak memberikan hasil yang signifikan pada ukuran infark. Sehingga dibutuhkan kombinasi beberapa perawatan regeneratif untuk meningkatkan pemulihan stroke.
5	Zhang, B., Joseph, B., Saatman, K. E., & Chen, L. (2020).(160) ¹⁸ .	<i>Intra-Arterial Delivery of Neural Stem Cells to the Rat and Mouse Brain: Application to Cerebral Ischemia. Journal of Visualized Experiments,</i>	Experimental in vivo and in vitro	Peneliti mengamati diferensiasi dari pemberian GPF-NSC secara intra-arterial pada lesi infark cerebral sampai 30 hari setelah injeksi. Terlihat diferensiasi NSC menjadi neuron matur dan astrosit.

Berbeda dengan penelitian-penelitian sebelumnya, studi ini secara khusus mengevaluasi pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada model tikus stroke iskemik. Beberapa penelitian terdahulu seperti oleh Cunningham et al. (2020) berfokus pada penggunaan *conditioned medium* dari MSC yang di-*priming* dengan IL-1 α dan menilai pemulihan fungsional

secara umum tanpa mengevaluasi parameter imun spesifik. Wei et al. (2012) dan Ryu et al. (2016) meneliti efek MSC atau neural stem cells (NSC) yang dikondisikan hipoksia terhadap angiogenesis, neurogenesis, dan regenerasi sel saraf, namun tidak menelaah aspek imunologis secara spesifik seperti kadar sitokin pro- dan anti-inflamasi. Penelitian Mu et al. (2019) menekankan pada kombinasi terapi sel punca adiposa dengan rehabilitasi, tetapi hasilnya tidak menunjukkan pengaruh signifikan pada ukuran infark, dan juga tidak menyentuh aspek molekuler sistem imun. Sementara itu, Zhang et al. (2020) lebih menyoroti distribusi dan diferensiasi NSC yang diberikan secara intra-arterial, tanpa mengevaluasi efek imunologis pasca stroke. Oleh karena itu, belum ada penelitian yang secara spesifik meneliti efek pemberian HUC-MSCs yang dikondisikan hipoksia terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke, sehingga penelitian ini memiliki nilai kebaruan dalam menelusuri potensi imunomodulasi MSC sebagai strategi terapi pada stroke iskemik. Namun belum ada yang mempelajari mengenai pemberian *wharton jelly*-MSC yang dikondisikan hipoksia pada kasus stroke iskemik terutama dengan menilai mekanisme kerja MSC sebagai imunomodulator. Hal ini penting karena stroke iskemik sebagian besar diakibatkan oleh proses peradangan yang menjadikan terbentuknya plak aterosklerosis. Maka itu, penelitian ini akan mempelajari lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interferon- γ (IFN- γ)

Interferon- γ (IFN- γ) atau interferon tipe 2 adalah sitokin yang berperan penting dalam menginduksi dan memodulasi serangkaian respon imun.¹⁹ IFN- γ disekresi oleh sel T yang telah teraktivasi, limfosit B, *antigen-presenting cell* (APC) serta *natural killer cell* (sel NK), dan dapat meningkatkan aktivasi makrofag, meningkatkan presentasi antigen, mengatur aktivasi sistem imun bawaan, mengatur keseimbangan sel Th1/ Th2, mengontrol proliferasi dan apoptosis sel.^{19,20} Respon seluler terhadap IFN- γ dimediasi oleh reseptor permukaan sel heterodimerik disebut dengan *interferon- γ receptor* (IFN- γ R), yang mengaktifkan kaskade transduksi sinyal yang pada akhirnya mengarah pada regulasi ekspresi gen.¹⁹

IFN- γ , yang berikatan sebagai dimer pada kompleks IFNGR yang terdiri dari dua subunit IFNGR1 dan dua subunit IFNGR2.²¹ Aktivasi reseptor tersebut menginduksi fosforilasi JAK1 dan JAK2, yang kemudian terjadi rekrutmen sinyal transduser dan aktivator transkripsi (STAT), menghasilkan fosforilasi.^{21,22} STAT terfosforilasi membentuk homodimer STAT1. Pasangan STAT1 yang direkrut reseptor mengalami fosforilasi, homodimerisasi, dan translokasi ke nukleus, yang mengikat elemen GAS dalam promotor ISG.^{21,22} Produksi IFN- γ sebagian besar terbatas pada sel hematopoietik.²¹ Sedangkan IFNGR tersebar pada hampir semua jenis sel. Secara keseluruhan, IFN- γ berperan penting dalam mengatur fungsi

kekebalan tubuh, termasuk mempolarisasi respons sel T dan mengaktifkan sel myeloid, serta menjembatani respons imun bawaan dan adaptif.^{8,21}

Pada kasus stroke iskemik, plak aterosklerosis menjadi penyebab paling umum.³ Patogenesis aterosklerosis melibatkan interaksi antara kolesterol dan sekresi sitokin seluler, yang utama adalah sitokin IFN- γ .⁸ Stimulasi sel endotel oleh IFN- γ meningkatkan ekspresi molekul adhesi.⁸ Aktivasi makrofag oleh IFN- γ menyebabkan produksi sitokin proinflamasi lainnya seperti *tumor necrosis factor* (TNF)- α dan interleukin IL-6, dan radikal bebas.²³ IFN- γ telah terdeteksi berkoloni dengan makrofag aktif yang mengekspresikan *histocompatibility complex* (MHC)-II pada lesi aterosklerotik manusia.²³

2.2. Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin 10 (IL-10) adalah sitokin bersifat anti-inflamasi yang kuat yang memainkan peran utama dalam membatasi respons imun terhadap patogen, sehingga mencegah kerusakan dan menjaga homeostasis jaringan normal.²⁴ IL-10 pertama kali digambarkan sebagai sitokin turunan Th2, namun, telah diterima secara luas bahwa IL-10 diproduksi pada Sebagian besar leukosit.²⁴ Secara *in vivo*, sumber utama IL-10 meliputi sel T helper, monosit, makrofag, dan sel dendritik.^{24,25} Selain itu, tipe efektor non-imun seperti sel epitel dan keratinosit juga mampu memproduksi IL-10 sebagai respons terhadap infeksi atau kerusakan jaringan serta sel tumor.²⁵ Protein IL-10 digambarkan sebagai *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF) yang

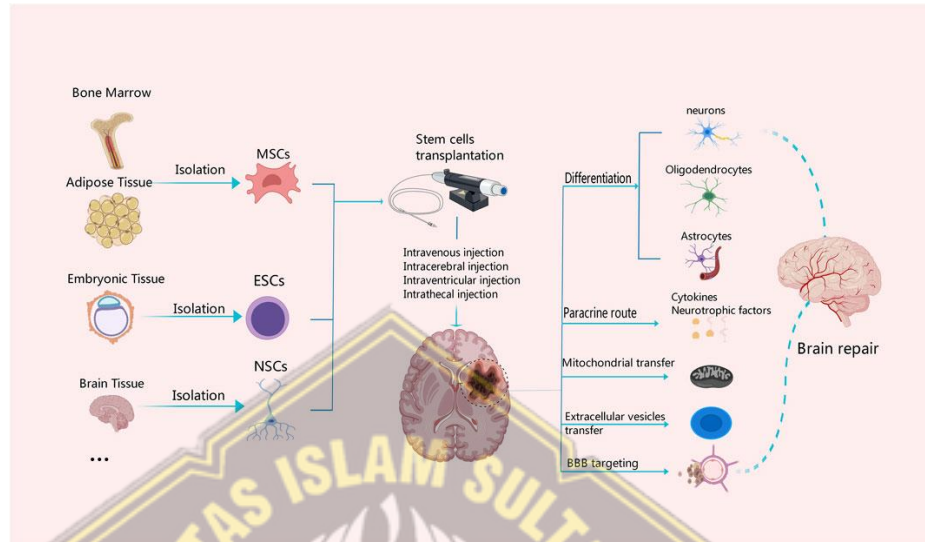
disekresikan dari sel Th2 karena menghambat produksi dari beberapa sitokin, seperti IFN- γ .²⁵

Inflamasi dan radikal bebas merupakan mekanisme patofisiologi yang terlibat pada stroke iskemik.²⁶ Produksi sitokin pro-inflamasi secara berlebihan dan jangka panjang berhubungan dengan luaran yang lebih buruk serta peningkatan resiko kematian setelah stroke.²⁶ Mekanisme kerja sitokin anti-inflamasi dapat menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan menjadi alternatif dalam perbaikan stroke.^{26,27} Studi sebelumnya mengungkapkan bahwa kerusakan jaringan iskemik dapat berkurang dalam model eksperimental dengan berbagai agen anti-inflamasi seperti penghambat sitokin pro-inflamasi, dan sitokin anti-inflamasi salah satunya IL-10.²⁷ IL-10 dapat memberikan mekanisme umpan balik negatif untuk membatasi produksi sitokin proinflamasi pada stroke iskemik.²⁷

2.3. *Hypoxic Preconditioned Mesenchymal Stem Cells* (Hypoxic-MS C)

Sel punca atau disebut juga *stem cells* (SC) memiliki karakteristik unik karena mampu memperbaharui diri sehingga dapat menghasilkan sel dewasa.²⁸ Kemampuan ini memungkinkan SC sebagai terapi yang efektif dalam mengobati stroke iskemik dalam beberapa tahun terakhir.²⁸ Berdasarkan sumbernya, SC dibagi menjadi *Mesenchymal Stem Cells* (MSC), *Embryonic Stem Cells* (ESC), dan *Neural Stem Cells* (NSC) adalah tiga jenis SC utama yang digunakan dalam terapi stroke.^{28,29} MSC lebih unggul dibandingkan tipe sel lainnya karena ESC dan NSC dianggap sebagai sumber

yang penerapannya terbatas dipertimbangkan dari terbatasnya ketersediaan, resiko pembentukan teratoma, dan permasalahan etika.^{28,29}

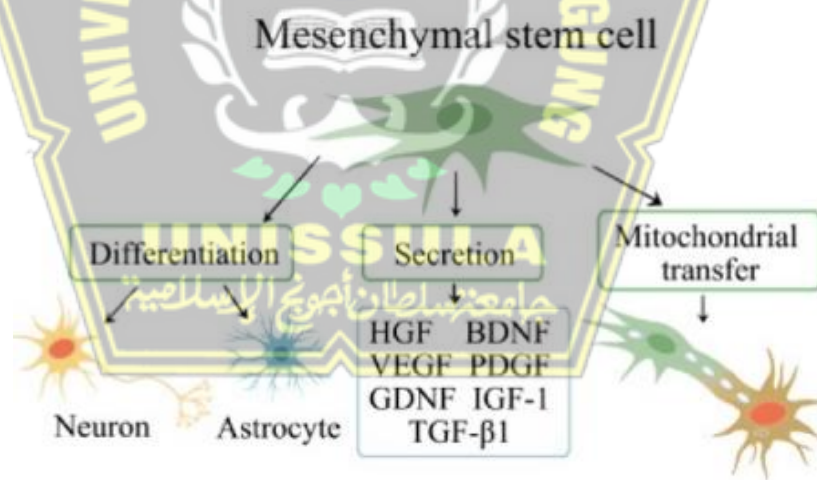


Gambar 2.1. Mekanisme terkait dengan sel punca yang berasal dari berbagai sumber dalam pengobatan stroke iskemik.²⁹

MSC dapat dengan mudah diisolasi dari sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat, serta dapat dengan mudah dibiakkan.^{28,29} MSC telah dipelajari memiliki potensi neuroprotektif sehingga penerapan MSC telah menjadi pilihan terapi yang menarik dalam kasus stroke iskemik terutama *umbilical cord mesenchymal stem cells* (UC-MSCs).^{29,30} Penelitian sebelumnya transplantasi *umbilical cord wharton jelly mesenchymal stem cells* (WJ-MSCs) pada tikus model stroke iskemia menunjukkan peningkatan fungsi neurologi, penurunan neuroinflamasi dan penurunan luas area infark secara signifikan.³¹ Pemberian WJ-MSCs dapat diberikan dengan berbagai cara, studi lain menunjukkan pemberian WJ-MSCs baik secara intraserebral

dan intravena dapat meningkatkan pemulihan fungsi neurologis melalui neurodiferensiasi, supresi apoptosis, hingga mengurangi atrofi vaskular.³¹

MSC dapat melepaskan zat anti-inflamasi yang dimediasi melalui keterlibatan mekanisme pensinyalan *vascular endothelial growth factor* (VEGF), penurunan ekspresi TNF- α , interleukin, dan berbagai faktor pertumbuhan lainnya untuk mengatur fungsi sistem kekebalan tubuh setelah stroke iskemik, dan memainkan peran anti-inflamasi melalui jalur PL3K/AKT dengan menghambat piroptosis.^{5,32} Studi *in vivo* menunjukkan bahwa injeksi MSC pada tikus setelah stroke iskemik dikaitkan dengan ekspresi IL-10 secara signifikan meningkatkan mitofag dan autofagi dengan mengurangi penanda peradangan saraf dan kematian sel.⁵



Gambar 2.2. Mekanisme terapi MSC untuk stroke iskemik.³²

Belakangan ini, banyak perlakuan yang dapat diterapkan untuk meningkatkan kemampuan MSC dalam meregenerasi salah satunya dengan kondisi hipoksia.¹⁴ Peningkatan potensi proliferasi MSC yang dikultur dalam

tekanan oksigen rendah sekitar 1% sampai 5% telah dilaporkan pada sebagian besar penelitian serta jika dibandingkan dengan normosia, pengkondisian hipoksia dapat meningkatkan kelangsungan hidup MSC dan meningkatkan angiogenesis pada jaringan iskemik, berkontribusi terhadap pemulihan yang optimal dalam berbagai model iskemik.^{14,15} HUC-MSCs memiliki kemampuan migrasi dan parakrin faktor pertumbuhan yang lebih efektif pada lesi infark mamun paparan hipoksia yang berkepanjangan menyebabkan disfungsi mitokondria dan aktivasi *Caspase-3*, yang merupakan faktor dalam pensinyalan apoptosis.¹³

2.4. Stroke

2.4.1. Definisi Stroke Iskemik

Stroke iskemik didefinisikan sebagai infark pada otak dan mewakili sekitar 71% dari semua stroke secara global.² Stroke iskemik terutama disebabkan oleh gangguan aliran darah otak, yang menyebabkan cedera saraf parah, dan merupakan salah satu penyebab utama kematian dan kecacatan di seluruh dunia.^{3,4} Meningkatnya beban stroke oleh rendahnya pengetahuan masyarakat mengenai faktor risiko stroke dan tanda serta gejala awal stroke.³ Beberapa faktor risiko telah terlibat dalam patogenesis stroke iskemik, termasuk diabetes, merokok, hiperlipidemia, hipertensi penyakit kardiovaskular, gaya hidup yang tidak sehat, fibrilasi atrium, dan konsumsi alkohol.^{3,33} Faktor risiko lain yang tidak dapat dimodifikasi

relatif sedikit dan mencakup faktor-faktor seperti usia dan jenis kelamin.^{3,33}

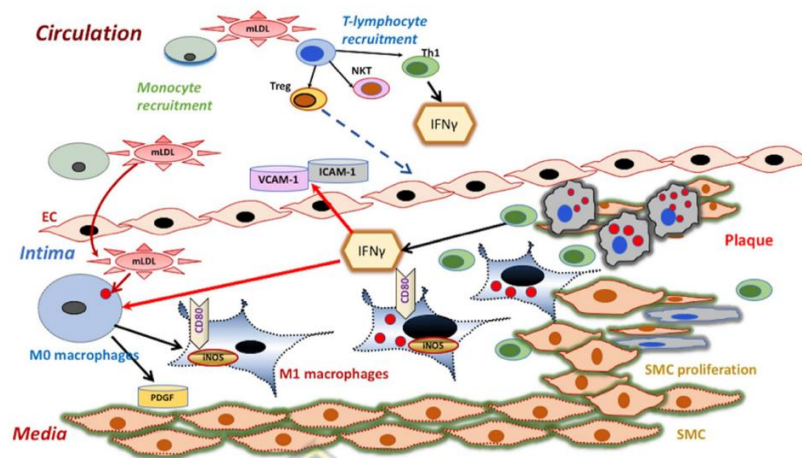
2.4.2. Patogenesis Stroke Iskemik

Pada pathogenesis stroke iskemik, terjadi gangguan pada aliran darah serebral yang menyebabkan berkurangnya ketersediaan oksigen dan glukosa pada sel otak.^{2,33} Hal ini memicu terjadinya disfungsi mitokondria disertai defisiensi energi.^{2,33} Disfungsi mitokondria menyebabkan terjadinya gangguan sintesis ATP sehingga terjadi insuffisiensi ATP yang mencetuskan depolarisasi membran mitokondria.³³ Depolarisasi terjadi ketika influx natrium yang berlebihan yang selanjutnya terjadi pembukaan *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) dan pelepasan sitokrom c.^{4,33} Terjadinya disfungsi mitokondria dan defisiensi energi pada serebral iskemik menyebabkan stress oksidatif sehingga muncul radikal bebas seperti *nitric oxide synthase* (iNOS) mencetuskan *damage-associated molecule pattern* (DAMP).^{10,33}

Induksi radikal bebas pada DAMP yang berikatan dengan toll-like receptor (TLR) meningkatkan ekspresi dari sitokin inflamasi seperti *nuclear factor κB* (NF-κB). Aktivasi NF-κB diperlukan untuk produksi sitokin inflamasi pada mikroglia yang mewakili sel imun utama di otak pemain utama. Mikroglia merupakan sel pertama yang direkrut untuk mengeluarkan sitokin pro-inflamasi dalam keadaan

aktif, seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α , *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) menginduksi kebocoran sawar darah-otak, dan *interferon regulatory factor 1* (IRF-1) menstimulasi IFN- γ untuk aktivasi makrofag.^{10,33} Sel lain yang direkrut yaitu neutrofil dan monosit, lalu berinteraksi untuk mengangkat jaringan mati dan meningkatkan resolusi.³⁴ Sitokin proinflamasi yang dilepaskan dalam proses ini juga tidak dapat secara langsung merusak sel saraf yang utuh tetapi juga memicu infiltrasi sel NK dan T, yang pada akhirnya berkontribusi terhadap kerusakan sel.³⁴

Pada level seluler, selain mengaktivasi makrofag, IFN- γ menginduksi pelepasan molekul adhesi seperti ICAM-1 dan VCAM-1, meningkatkan produksi *platelet-activating factor* (PAF), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), and *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) melalui *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-1 atau 3.^{10,33,35} Ekspresi molekul tersebut mendorong pembentukan sel busa dengan meningkatkan *modified LDL* (mLDL) oleh makrofag M1.³⁵ IFN- γ adalah moderator penting dari sekresi molekul adhesi tersebut oleh sel endotel dan sel otot polos pembuluh darah.^{33,35} IFN- γ meningkatkan sekresi sitokin Th1 lainnya seperti TNF- α dan IL-12, dan menginduksi polarisasi makrofag menjadi fenotip M1 inflamasi dan pro-aterogenik.^{8,35} Pada lesi aterosklerotik, dominasi makrofag M1, TNF- α , dan iNOS dianggap sebagai kontributor signifikan terhadap perkembangan lesi infark.^{8,35}



Gambar 2.3. Skema peran IFN- γ dalam aterogenesis dan pembentukan lesi aterosklerotik pada pathogenesis stroke iskemik.

2.5. Hubungan antara HUC-MSCs Terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada kasus Inflamasi

Sel punca mesenkimal hipoksia dari tali pusat (HUC-MSCs) telah terbukti memiliki kemampuan proliferasi dan diferensiasi yang sangat baik, imunogenisitas rendah, mudah diperoleh serta berperan besar sebagai imunomodulator, hal ini dikarenakan tingkat reseptor IFN- γ dan reseptor CXCR3 yang lebih rendah dibandingkan dengan BM-MSC.^{30,31} Hal tersebut dipelajari kembali bahwa UC-MSC dalam prakondisi hipoksia dengan oksigen 0,5% selama 24 jam dapat meningkatkan ekspresi faktor prosurvival, faktoranti-inflamasi seperti IL-10 dan proangiogenik termasuk faktor yang *hypoxia-inducible factor 1*, *angiopoietin-1*, dan VEGF.^{13,36} Kondisi hipoksia meningkatkan proliferasi sel, sehingga kultur di bawah hipoksia dapat menjadi pendekatan alternatif tanpa memerlukan bahan tambahan untuk

merangsang kultur primer dan ekspansi lebih lanjut, sehingga menghasilkan pasase sel yang cukup.³⁶

Stres oksidatif merupakan mekanisme penting dalam patogenesis stroke iskemik karena dapat menyebabkan akumulasi radikal bebas pada sel otak, sehingga menyebabkan cedera dan inflamasi serebrovaskular.³² Selama stroke iskemik, neutrofil terakumulasi di otak menghambat mikrosirkulasi. Penyumbatan ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan lebih lanjut dan dapat mencetuskan ikatan DAMP-TLR untuk aktivasi sinyal inflamasi.⁴ Sel imun lainnya seperti makrofag, sel T, dan sel B menjalankan fungsi pengaturan penting dalam proses ini dengan menghasilkan faktor proinflamasi dan sitokin seperti IFN- γ .²⁹ Makrofag dan sel dendritik (DC) merupakan *Antigen Presenting Cell* (APC) utama dalam *cascade* inflamasi.³⁷ Suatu penelitian melaporkan bahwa MSC menghambat diferensiasi DC dan inflamasi dengan mengekspresikan IL-10 melalui jalur JAK-STAT untuk menekan aktivasi sinyal MAPK dan NF-kB serta sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 dan IFN- γ .^{35,37,38}

BAB III

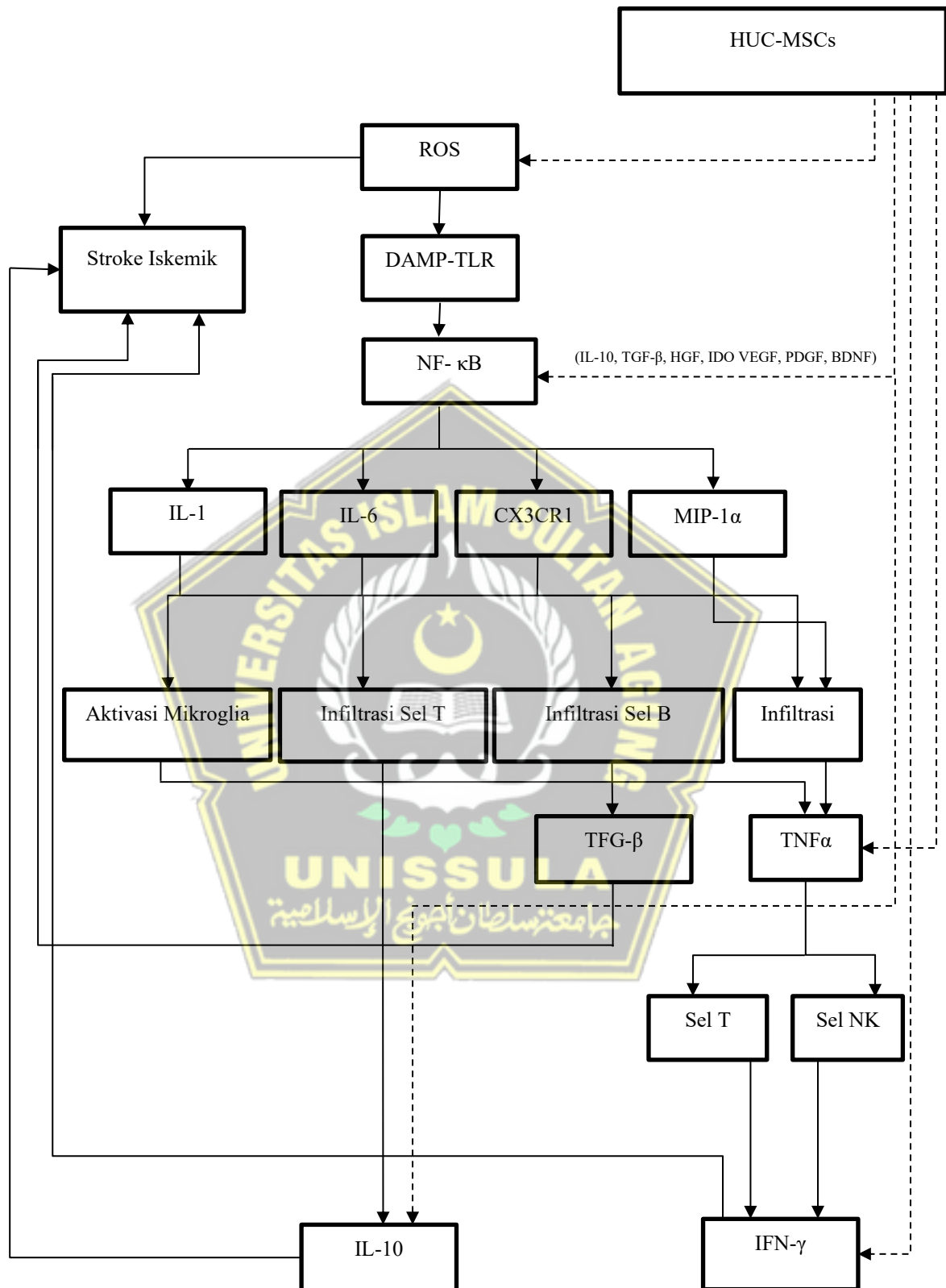
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Inflamasi adalah komponen kunci dari patologi stroke iskemik.³³ Pada tahap stroke iskemik, inflamasi dimulai oleh pelepasan DAMP dari sel yang mengalami cedera atau mati.^{4,33} Cedera atau kematian sel ini disebabkan oleh eksitotoksitas, stres oksidatif, dan disfungsi mitokondria pada stroke iskemik sehingga ikatan DAMP-TLR dapat menginduksi berbagai kaskade sinyal seluler, menyebabkan sel-sel saraf mengalami kematian terprogram atau tidak terprogram.³³ Aktivasi TLR menstimulasi mikroglia melalui *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) dan *nuclear factor- κ B* (NF- κ B).³⁹ Infiltrasi monosit, sel T dan B regulator selama respon inflamasi akut pada tikus oleh *CX3CR1*+.⁴⁰ Sel T dan sel B regulator dapat melemahkan respon inflamasi melalui sekresi IL-10 dan *TFG- β* pada fase akut dan berkontribusi terhadap regenerasi pada fase kronis setelah stroke.³⁴ Namun, respons sel T dan B spesifik antigen secara autoreaktif berdampak negatif pada hasil jangka panjang setelah stroke.³⁴

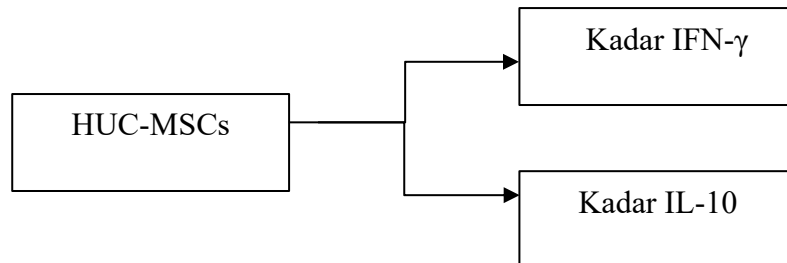
Rekrutmen sel T terutama CD4+ oleh IL-12 mencetuskan terjadi polarisasi Th1.¹⁹ Th1 menginduksi IFN- γ lalu mengaktifkan makrofag sehingga terpolarisasi menjadi fenotip proinflamasi (M1) melalui ikatan IFN- γ dengan IFN- γ R1 dan IFN- γ R2 yang secara konstitutif telah diasosiasikan dengan JAK1 dan JAK2.^{22,39} IFN- γ juga menghambat produksi kolagen sel otot polos yang akibatnya membuatnya rentan menyebabkan kemungkinan

besar komplikasi trombotik atau stroke berulang.³⁵ HUC-MSC berperan sebagai imunomodulator dengan melepas berbagai sitokin anti-inflamasi seperti TGF- β , HGF, dan IDO sehingga menstimulasi peningkatan ekspresi gen dan sekresi protein IL-10 untuk menekan peradangan via polarisasi fenotipe makrofag M1 menuju M2 dan inhibisi IFN- γ . Dibandingkan dengan secretome atau eksosom, HUC-MSC memiliki beberapa keunggulan, yaitu kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel untuk menggantikan jaringan yang rusak, kemampuan melepaskan sitokin dan faktor pertumbuhan secara berkelanjutan, serta potensi *homing* ke lokasi cedera. Keunggulan-keunggulan ini menjadikan efek terapi HUC-MSC tidak hanya bersifat sementara atau terbatas pada pengaruh parakrin, seperti pada secretome atau eksosom, tetapi juga memungkinkan perbaikan jaringan secara langsung dan berkelanjutan. Oleh karena itu, penggunaan sel HUC-MSC memberikan potensi penyembuhan yang lebih komprehensif, terutama pada kondisi yang melibatkan kerusakan struktural jaringan dan proses inflamasi kronis.^{28,37} HUC-MSC terbukti dapat menjalankan fungsinya sebagai antioksidan dan meningkatkan differensiasi sel saraf melalui pelepasan faktor pertumbuhan seperti VEGF, PDGF, BDNF serta menginduksi proliferasi sel punca endogen.^{29,31,37}



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) terhadap kadar IFN- γ dan IL-10 pada tikus model stroke.

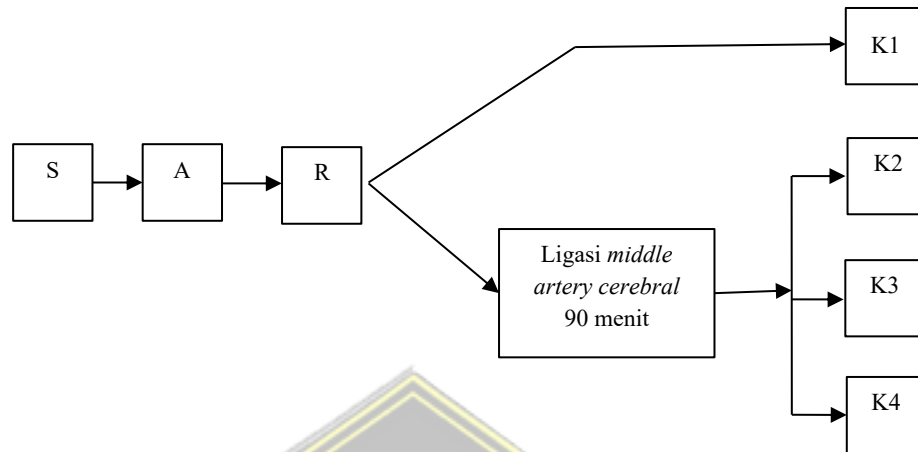
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian uji eksperimental *in vivo* menggunakan desain penelitian berupa *randomized post test only control group*. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok penelitian, masing-masing dengan rincian sebagai berikut:

1. Kelompok 1 (K1, tikus sehat dan tidak diberikan terapi)
2. Kelompok 2 (K2, tikus model stroke iskemi diberikan normal saline)
3. Kelompok 3 (K3, tikus model stroke iskemik dengan terapi *hypoxic* MSC (HUC-MSCs) dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel per tikus)
4. Kelompok 4 (K4, tikus model stroke iskemik dengan terapi *hypoxic* MSC (HUC-MSCs) dengan dosis 3×10^6 sel per tikus)



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sampel

A : Adaptasi

R : Randomisasi

K1 : Tikus sehat

K2 : Kontrol negatif (normal saline)

K4 : Pemberian terapi HUC-MSCs dengan dosis $1,5 \times 10^6$ per tikus

K5 : Pemberian terapi HUC-MSCs dengan dosis 3×10^6 per tikus

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah HUC-MSCs.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel penelitian ini adalah kadar IFN- γ dan IL-10.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. HUC-MSCs

Hypoxia umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) adalah sel induk dewasa multipoten dengan kemampuan berdiferensiasi dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel dan 3×10^6 sel per tikus. Morfologi sel mirip fibroblas yang serupa dapat diisolasi baik dari berbagai sumber seperti tali pusat, jaringan adiposa, kulit, pulpa gigi, dan hati. Sel-sel ini positif fenotip molekul permukaan yang spesifik untuk ekspresi CD105, CD73, dan CD29 dan negatif untuk ekspresi CD31, CD34, CD45, CD14 dan *human leucocyte antigen* (HLA), sesuai dengan kriteria yang diajukan oleh *the International Society for Cellular Therapy* (ISCT). MSC selanjutnya terbukti memiliki potensi pembaharuan diri dan berdiferensiasi menjadi beberapa garis keturunan sel mesodermal dalam kondisi eksperimental dan fisiologis tertentu, yang menjadikannya sumber alternatif dalam perbaikan jaringan dan pengobatan regeneratif. Selain diferensiasi, efek parakrin HUC-MSCs sering kali berkorelasi dengan manfaat terapeutik.

Skala: Nominal

4.2.2.2. IFN- γ

Kadar IFN- γ mewakili konsentrasi protein IFN- γ , salah satu modulator utama sistem kekebalan tubuh yang terlibat dalam langkah pertama respons terhadap banyak patogen. IFN- γ dapat memodulasi sistem kekebalan tubuh dengan merangsang ekspresi molekul MHC kelas I dan II melalui sel T dan makrofag, proses ini mendorong proses presentasi antigen. IFN- γ dapat berikatan reseptor heterodimerik (IFN- γ R) yang terletak di permukaan sel memediasi respons seluler terhadap IFN- γ yang mengaktifkan kaskade transduksi sinyal hilir. Kadar IFN- γ diperiksa dari sampel jaringan otak setelah perlakuan menggunakan metode ELISA dengan satuan hasil pg/mL.

Skala: Rasio

4.2.2.3. IL-10

Kadar Interleukin (IL-10) merupakan konsentrasi protein IL-10, sitokin anti inflamasi esensial yang berperan penting sebagai regulator negatif respon imun. Aktivitas immunosupresif IL-10 dimediasi oleh reseptor IL-10 heterodimerik (IL-10R1, IL-10R2). Penurunan kadar IL-10 dalam serum berhubungan secara independen dengan tingkat

keparahan klinis dan prognosis fungsional yang buruk pada pasien stroke iskemik, hal ini menunjukkan bahwa sitokin anti-inflamasi IL-10 merupakan penentu prognostik yang penting. Kadar IL-10 diperiksa dari sampel jaringan otak setelah perlakuan menggunakan metode ELISA dengan satuan hasil pg/mL.

Skala: Rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar yang dinyatakan layak digunakan sebagai subyek penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House* di *Laboratorium Semarang Cancer Center and Research (SCCR)*.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang memiliki kriteria sebagai berikut:

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Umur 6-8 minggu
2. Kondisi sehat
3. Bobot badan 180-200 g
4. Tikus yang tervalidasi stroke setelah induksi

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang sakit atau mati sebelum penelitian
2. Tikus yang gagal mengalami stroke setelah induksi

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Kriteria *drop out* sampel penelitian adalah tikus putih jantan galur Wistar yang mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel menggunakan teknik *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok K1 (tidak diberikan intervensi), K2 (Tikus model stroke yang diberikan terapi NaCl), K3 (tikus model stroke iskemik dengan terapi HUC-MSCs dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel), dan K4 (tikus model stroke iskemik dengan terapi HUC-MSCs dengan dosis 3×10^6 sel).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan rumus *Federer* yaitu sebanyak 6 ekor sampel dan 1 ekor cadangan tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok, sehingga total 28 ekor tikus putih jantan galur Wistar.

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan (termasuk kontrol)

n = jumlah hewan per kelompok

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

1. *Mesenchymal Stem Cells*
2. DMSO 1% dalam HCl 0,1 N
3. Aquades
4. SDS 10% dalam 0,1 N HCl
5. Etanol 96%
6. Media DMEM
7. FBS 10%
8. Penislin-streptomisin
9. *PBS (phosphate buffer salin)*
10. Tikus jantan galur Wistar
11. *Allophycocyanin (APC)*
12. *Phycocythrin (PE)*
13. Antibodi CD73, CD90, CD105
14. Ketamine 90%
15. ELISA Kit

4.4.2. Bahan

1. *Micropipette with tip (yellow tip, blue tip, pink tip)*

2. *Pipette filler*
3. *Conical tube* (15 ml dan 50 ml)
4. *Cryotube* 1 ml
5. *Inverted microscope*
6. Gunting steril
7. Pinset
8. Scalpel
9. Bisturi
10. Thermositometer
11. Aluminium foil
12. *Dish*
13. *Flask*
14. Tabung nitrogen
15. *Biosafety Cabinet class 2*
16. Heparin tube
17. *Cell counter*
18. *24 well plate*
19. Pipet kapiler
20. *Sentrifuge tube*
21. *Freezer*
22. Kapas
23. *Punch biopsy* 6 mm
24. Timbangan digital

25. Pipet tetes
26. Mortir
27. Stemper
28. Kertas label
29. *Flow cytometry*
30. *Hypoxic chamber*
31. Oksigenmeter
32. *Sentrifuge* (Sarvall MC 12 V)
33. ELISA reader

4.5. Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.5.2. Isolasi MSC dari *Umbilical Cord* (UC)

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

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset steril, *umbilical cord* diletakkan ke petri dish dan dicuci secara hati-hati sampai bersih menggunakan PBS

3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan ksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
6. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
7. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara
8. membuang sebagian medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

4.5.3. Validasi MSC

Validasi MSC dilakukan dengan menganalisis ekspresi marker *cluster of differentiation* (CD) menggunakan prosedur sebagai berikut:

1. Lepaskan sel dari flask dengan menggunakan BDTM *accutaseTM cell detachment solution* (cat No. 561527) atau *detachment soluution* 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* 5 ml yang berisi reagen *flowcytometry*
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel ke dalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar dalam ruang gelap.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan PBS dan resuspensi dengan 300-500 μ l PBS atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flowcytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk set up (sebagai kompensasi).

4.5.4. Prosedur Hipoksia MSC

1. *Hypoxic chamber* disiapkan
2. *Well* yang berisi MSC dimasukkan ke dalam chamber
3. Oksigenmeter diletakkan ke dalam chamber guna memastikan konsentrasi oksigen

4. Chamber dipastikan tertutup rapat
5. Nitrogen dialirkan melalui selang yang sudah terhubung ke chamber secara merata
6. Penambahan nitrogen perlahan hingga oksigen meter hingga oksigenmeter diamati sampai 5%
7. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Pemantauan oksigenmeter agar konsentrasi oksigen tetap 5%.

4.5.5. Induksi Tikus Model Stroke

Satu hari sebelum operasi, hewan dipuasakan 8 jam. Selama 1 minggu setelah operasi, hewan diberi makan dengan makanan tumbuk basah dilantai. Hewan dipantau setiap hari untuk memastikan kelangsungan hidup dan kondisi. Untuk mencegah infeksi bakteri, hewan diberikan antibiotik floroquinolon, enrofloxacin 2,5 µg/g berat badan secara intraperitoneal 1 kali per hari, untuk mengurangi rasa sakit diberikan analgetik parasetamol 18,9 mg intraperitoneal 2 kali per hari, pemberian obat antibiotik dan analgetik tersebut selama 7 hari setelah dilakukan operasi.

Hewan coba di anestesi menggunakan ketamin 1% 30 mg/kgBB secara intraperitoneal, suhu rektal dipertahankan pada 37°C, dilakukan induksi stroke iskemik dengan metode *Middle*

Cerebral Artery Occlusion (MCAO). MCAO dilakukan dengan cara memotong bulu tikus pada bagian kepalanya, lalu diolesi alkohol. Kemudian insersi kulit bagian kepala sampai sutura terlihat. Buka batok kepala dan cari *middle artery cerebral*. Setelah menemukan, ikat menggunakan benang selama 90 menit. Setelah selesai buka ikatan. Jahit kembali kulit dengan menggunakan benang. Beri betadine yang berguna untuk antiseptik.

4.5.6. Pemberian HUC-MSCs

Pada kelompok perlakuan HUC-MSCs diberikan secara intravena melalui vena ekor, 6 jam setelah MCAO, dosis HUC-MSCs yang diberikan sebanyak $1,5 \times 10^6$ per tikus (K4) dan 3×10^6 per tikus (K5). Sedangkan pada kelompok K2 diberikan normal saline 300 μ L secara intravena pada vena ekor, 6 jam setelah MCAO. Setelah 3 hari pemberian terapi, tikus diterminasi untuk pengambilan sampe. Sebelum dilakukan terminasi, hewan coba terlebih dahulu dianestesi untuk menghindari rasa nyeri dan stres. Anestesi yang umum digunakan adalah kombinasi ketamin (75–100 mg/kg BB) dan xylazine (5–10 mg/kg BB) yang diberikan secara intraperitoneal. Dosis disesuaikan dengan berat badan hewan dan tingkat respons terhadap anestesi. Setelah prosedur selesai,

hewan coba diterminasi dengan cara yang sesuai etika dan tidak menimbulkan penderitaan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah overdosis anestesi (misalnya ketamin dosis tinggi >200 mg/kg BB intraperitoneal) hingga hewan tidak menunjukkan tanda-tanda kehidupan seperti napas atau denyut jantung.

4.5.7. Uji Kadar IFN- γ dan IL-10

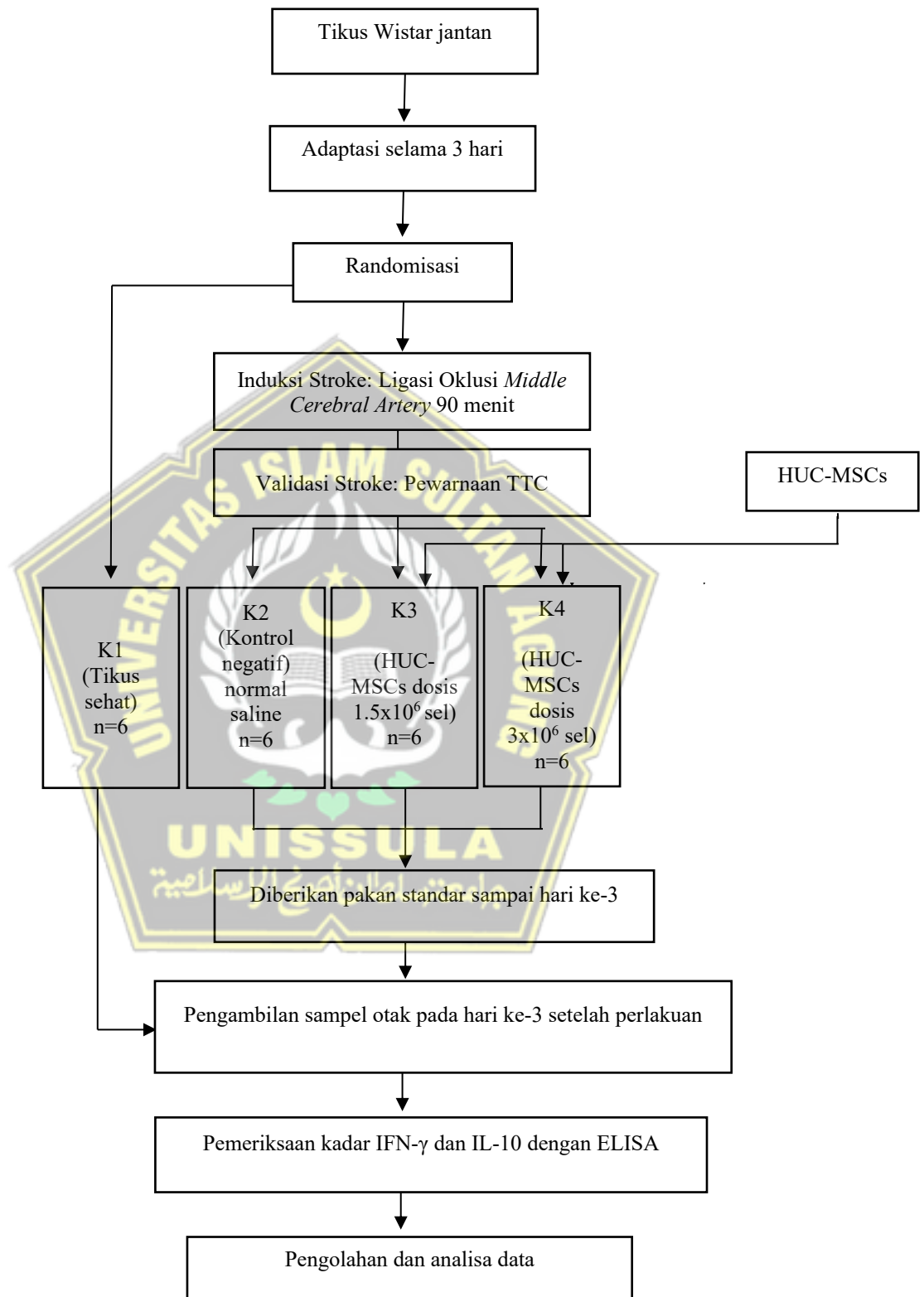
Lisat protein sampel dimasukkan dalam mikrotube dan kemudian dihomogenisasi menggunakan ultrasonikator dan diisolasi proteinnya menggunakan ELISA sesuai protokol pabrikan (Elabscience, TX, USA). Larutan standar dibuat dengan melakukan metode pengenceran menggunakan protein *lyophilized* dan buffer sesuai seri konsentrasi yang ditetapkan protokol. Medium kultur dan larutan standar sesuai seri konsentrasi kemudian dimasukkan ke dalam *well plate* 96. ELISA yang mengandung antibodi dan diinkubasi selama 1 jam. Sampel kemudian dibuang dan antibodi primer ditambahkan pada sampel dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Sampel kemudian dicuci tiga kali menggunakan PBS. HRP *Conjugate* kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan ruang gelap. Sampel kemudian dicuci lima kali menggunakan PBS. Reagen substrat kemudian ditambahkan dan diinkubasi selama

15 menit pada suhu 37°C pada ruang gelap. *Stop solution* kemudian ditambahkan dan sampel dianalisis menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm (Qiao *et al.* 2020).

4.6. Analisis Data

Data dikumpulkan, diproses, disunting, ditabulasi, dan dianalisis secara deskriptif. Uji normalitas dilakukan dengan Shapiro-Wilk, sedangkan uji homogenitas dilakukan dengan Levene Test. Sebaran data normal ($p > 0,05$) dan varian homogen ($p > 0,05$) dianalisis menggunakan uji beda One Way ANOVA. Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada uji One Way ANOVA dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD. Sebaran data normal ($p > 0,05$) dan varian tidak homogen ($p < 0,05$) dianalisis menggunakan uji beda One Way ANOVA dan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tamhane. Seluruh pengolahan dan analisis data dilakukan menggunakan SPSS 22.0 for Windows.

4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh Pengaruh Fisiologi Pemberian *Hypoxic Preconditioned Mesenchymal Stem Cell* (HUC-MSCs) Terhadap Kadar *IFN- γ* dan *IL-10* (Studi Eksperimental In Vivo Tikus Model Stroke). Penelitian ini merupakan penelitian *Eksperimental In Vivo* yang dilakukan pada bulan Juli-Agustus 2025 bertempat di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Semarang. Subyek penelitian menggunakan tikus jantan galur Wistar sehat serta yang tervalidasi memiliki sindrom metabolik, dengan total 24 tikus yang dipilih sesuai dengan kriteria Federer. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi empat kelompok: K1 (tikus sehat), K2 (tikus stroke dengan perlakuan 300 μ L NaCl), K3 (tikus stroke dengan pemberian HUC-MSCs dosis $1,5 \times 10^6$ /tikus), K4 (tikus stroke dengan pemberian HUC-MSCs dosis 3×10^6 /tikus).

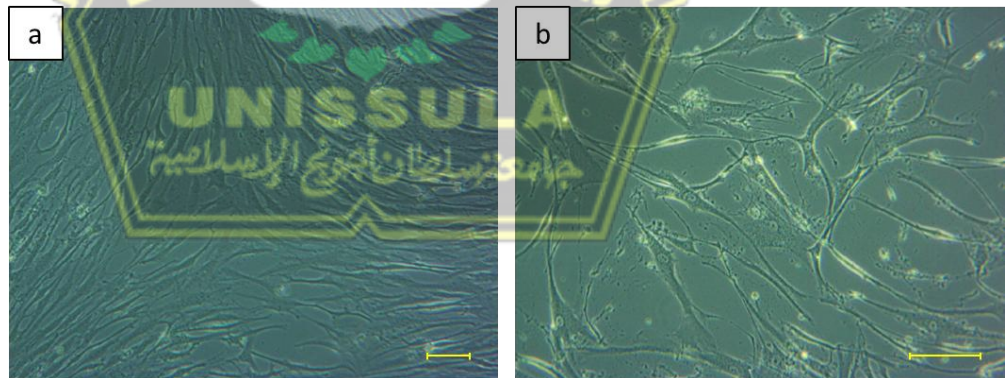
Hypoxia UC-MS (*Mesenchymal Stem Cells*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh melalui isolasi dari tali pusat (*umbilical cord*) tikus Wistar betina bunting dengan usia kehamilan 19 hari. Validasi *MSC* dilakukan dengan menggunakan teknik pewarnaan *Oil Red O* dan *Alizarin Red* untuk menilai kemampuan differensiasi adipogenik dan osteogenik. Validasi juga melibatkan penggunaan *flow cytometry* dan pengamatan mikroskop inverted untuk menganalisis *surface marker* dan morfologi sel. Setelah sel berhasil

divalidasi, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan kondisi hypoxia 5% oksigen dan suhu 37°C.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Karakterisasi *Hypoxic Preconditioned Mesenchymal Stem Cell* (HUC-MSCs)

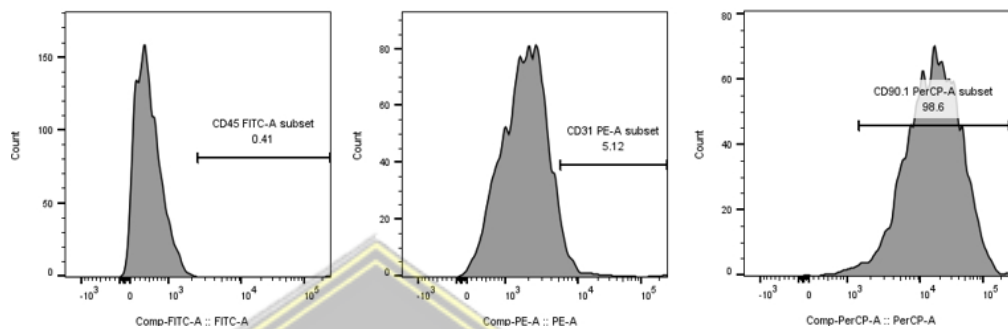
MSC diisolasi dari umbilical cord tikus Wistar betina bunting dengan usia kehamilan 19 hari dan dikultur hingga mencapai passage ke-5. Validasi kultur MSC dilakukan berdasarkan karakter morfologi, ekspresi *surface marker* dan kemampuan differensiasinya. Berdasarkan pengamatan mikroskop, morfologi sel kultur hasil isolasi memiliki bentuk lonjong, panjang, inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol yang menyerupai fibroblast dan melekat pada dasar flask plastik (*plastic adherent*) (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti MSC yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (*fibroblas-like*) dengan perbesaran mikroskop 100x (a) dan perbesaran 200x (b). Scale bar: 50µm.

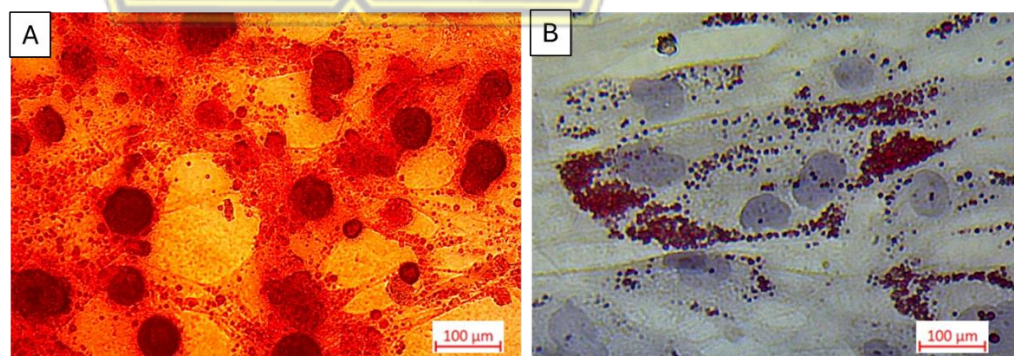
Ekspresi protein permukaan sel (*surface marker*) MSC dilakukan menggunakan *flow cytometry* dengan antibodi CD90.1, CD29, CD45 dan

CD31. Hasil analisis mengindikasikan bahwa sel kultur hasil isolasi memiliki ekspresi CD90.1 yang tinggi yaitu 98,6%, dan sedikit mengekspresikan CD45 0,41% serta CD31 5,12% (Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi. Sel hasil Isolasi memiliki ekspresi CD90.1 yang tinggi serta ekspresi CD45 dan CD31 yang rendah.

Kemampuan *MSC* dalam berdiferensiasi menjadi *osteocyte* dan *adipocyte* diamati dari hasil pewarnaan *Alizarin red* (pewarnaan kalsium) dan *Oil Red O* (pewarnaan lipid)⁴¹. Hasil menunjukkan bahwa sel kultur hasil isolasi mampu berdiferensiasi menjadi osteosit (A) dan adipositas (B), yang dapat teridentifikasi melalui endapan lemak dan kalsium pada kultur adipogenik dan osteogenik masing-masing (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Kemampuan differensiasi sel hasil isolasi. (A) Sel hasil Isolasi mampu berdiferensiasi menjadi *osteocyte* pada pengamatan pewarnaan *Alizarin red* pada pembesaran 100x dan (B)

berdiferensiasi menjadi *adipocyte* pada pengamatan pewarnaan *Oil Red dye*.

Berdasarkan karakter-karakter tersebut, sel kultur hasil isolasi dapat diindikasikan sebagai *mesenchymal stem cell (MSC)*. *MSC* selanjutnya diinkubasi dalam kondisi hypoxia (konsentrasi O₂ sebesar 5%) selama 24 jam, menggunakan hypoxic chamber. *MSC* hasil pre-kondisi ini yang disebut hypoxia UC-*MSC* dan selanjutnya digunakan untuk treatment hewan uji.

5.1.2. Hasil Validasi Model Hewan Stroke Iskemik dengan Pewarnaan TTC

Validasi model hewan stroke iskemik dilakukan dengan prosedur oklusi arteri serebri media (Middle Cerebral Artery Occlusion/MCAO) selama 90 menit, diikuti dengan pewarnaan otak menggunakan TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride). Hasil pewarnaan menunjukkan perbedaan yang jelas antara jaringan otak yang sehat dan jaringan yang mengalami infark (Gambar 5.8). Pada kelompok kontrol sehat (A), seluruh area otak terwarnai merah merata, yang menandakan jaringan masih vital dan memiliki aktivitas enzim mitokondria yang normal. Sebaliknya, pada kelompok hewan yang mengalami MCAO (B), tampak adanya area pucat atau putih pada beberapa irisan otak, khususnya di hemisfer ipsilateral terhadap oklusi. Area putih ini menunjukkan daerah yang mengalami infark atau nekrosis akibat iskemia, di mana sel-sel otak sudah kehilangan aktivitas metaboliknya sehingga tidak mampu mereduksi TTC menjadi

formazan berwarna merah. Pola distribusi infark sesuai dengan wilayah yang disuplai oleh arteri serebri media, yaitu meliputi sebagian besar korteks lateral dan ganglia basal. Hasil ini menunjukkan bahwa prosedur MCAO berhasil menginduksi kerusakan iskemik secara fokal dan konsisten, yang sesuai dengan karakteristik klinis stroke iskemik pada manusia. Oleh karena itu, model ini dapat dikatakan valid dan layak digunakan untuk penelitian lebih lanjut mengenai patofisiologi stroke maupun pengujian terapi potensial.



Gambar 5.4. Hasil pewarnaan TTC pada kelompok sehat dan MCAO. (A) Potongan otak tikus dengan pewarnaan TTC memperlihatkan pewarnaan homogen merah merata tanpa area pucat, menunjukkan jaringan otak viabel dan tidak terdapat tanda nekrosis iskemik. **(B)** Potongan otak tikus dengan pewarnaan TTC menunjukkan irisan otak tikus pasca-induksi stroke iskemik. Terlihat adanya area pucat. Daerah pucat ini merepresentasikan infark, akibat kematian jaringan saraf karena iskemia. Pada pemeriksaan makroskopis, area infark tampak lebih terang, konsistensinya lunak, dan berbeda dari jaringan normal.

5.1.2. Hasil Analisis Statistik kadar IFN- γ

Berdasarkan Tabel 5.1, kadar IFN- γ pada kelompok kontrol sehat (K1) adalah $289,2 \pm 87,7$ pg/mL. Pada kelompok tikus model stroke yang diberi 300 μ L NaCl (K2), kadar IFN- γ meningkat signifikan sebesar 3,18 kali lipat menjadi $918,7 \pm 178,1$ pg/mL dibanding K1 ($p = 0,05$). Pemberian terapi HUC-MSCs dosis $1,5 \times 10^6$ sel/tikus (K3) menurunkan kadar IFN- γ menjadi $603,3 \pm 151,4$ pg/mL, meskipun tidak berbeda signifikan dibanding K2 ($p = 0,194$). Sementara itu, pemberian dosis 3×10^6 sel/tikus (K4) menurunkan kadar IFN- γ lebih lanjut menjadi $485,3 \pm 103,6$ pg/mL, dengan penurunan signifikan dibanding K2 ($p < 0,001$) dan K3 ($p < 0,001$).

Tabel 5.1. Hasil Analisis Statistik Kadar IFN- γ (pg/mL)

Parameter	Kelompok				<i>p</i> -value
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ SD D (n=5)	Rerata $\pm$ SD (n=5)	Rerata $\pm$ SD (n=5)	Rerata $\pm$ SD (n=5)	
Kadar IFN- γ	289,2 $\pm$ 87,7	918,7 $\pm$ 178,1	603,3 $\pm$ 151,4	485,3 $\pm$ 103,6	
Uji <i>Saphiro Wilk</i>	7	1	4		0,05*
Uji <i>Lavene</i>					0,194**
Uji <i>one-way ANOVA</i>					0,000***

Keterangan:

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

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

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

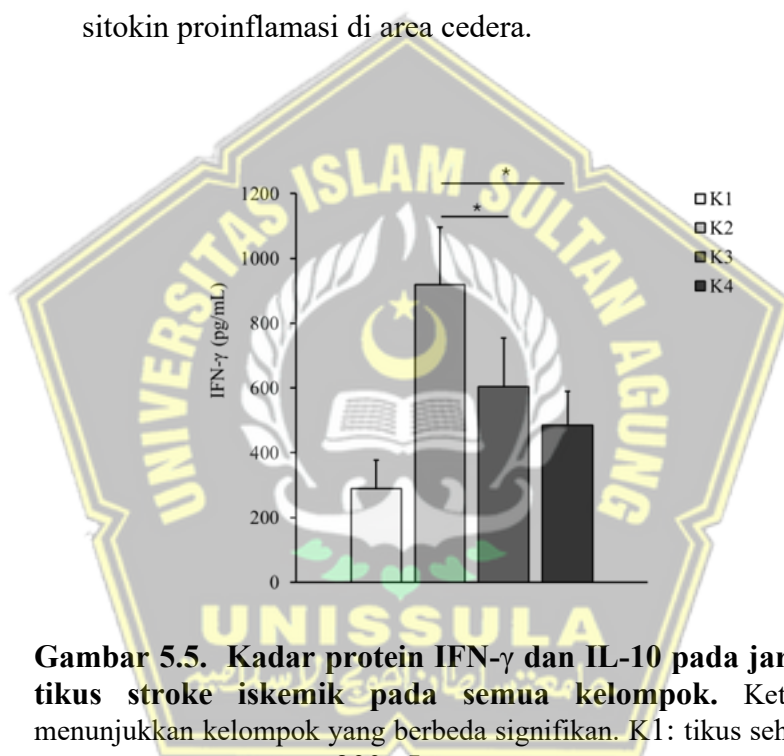
Tabel 5.2. Hasil Post-Hoc LSD Kadar IFN- γ

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
<i>Kadar IFN- γ</i>	K1	K2*	0,000
		K3*	0,002
		K4*	0,036
	K2	K3*	0,002
		K4*	0,000
	K3	K4	0,186

Keterangan: *) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan. K1: tikus sehat, K2: tikus stroke dengan perlakuan 300 μ L NaCl, K3: tikus stroke dengan pemberian HUC-*MSCs* dosis $1,5 \times 10^6$ /tikus, K4: tikus stroke dengan pemberian HUC-*MSCs* dosis 3×10^6 /tikus

IFN- γ merupakan sitokin proinflamasi utama yang berperan penting dalam aktivasi makrofag, stimulasi respon imun seluler, dan peningkatan kerusakan jaringan pada fase akut stroke⁴². Peningkatan IFN- γ pasca stroke sering dikaitkan dengan perburukan inflamasi di jaringan otak, sehingga parameter ini dianalisis untuk menilai sejauh mana terapi HUC-*MSCs* mampu menekan respon inflamasi⁴³. Berdasarkan hasil analisis ELISA (**Gambar 5.5**) pada sampel jaringan otak, kadar IFN- γ pada kelompok kontrol sehat (K1) adalah $289,2 \pm 87,7$ pg/mL. Induksi stroke pada kelompok K2 yang diberi 300 μ L NaCl meningkatkan kadar IFN- γ secara signifikan menjadi $918,7 \pm 178,1$ pg/mL atau sekitar 3,18 kali lipat dibanding K1 ($p = 0,05$). Berdasarkan tabel 5.2., terapi HUC-*MSCs* dosis $1,5 \times 10^6$ sel/tikus (K3) menurunkan kadar IFN- γ menjadi $603,3 \pm 151,4$ pg/mL, meskipun kadar ini masih sama dengan K2 ($p = 0,194$). Penurunan lebih lanjut terjadi pada dosis 3×10^6 sel/tikus (K4) dengan

kadar $485,3 \pm 103,6$ pg/mL, yang berbeda signifikan dibanding K2 ($p < 0,001$) dan K3 ($p < 0,001$). Temuan ini menunjukkan bahwa HUC-MSCs mampu menekan respon proinflamasi di jaringan otak pasca stroke, dengan efek yang lebih nyata pada dosis tinggi. Efek penurunan IFN- γ ini kemungkinan terkait dengan kemampuan MSCs menekan aktivasi sel T proinflamasi dan mengurangi pelepasan sitokin proinflamasi di area cedera.



Gambar 5.5. Kadar protein IFN- γ dan IL-10 pada jaringan otak tikus stroke iskemik pada semua kelompok. Keterangan: *) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan. K1: tikus sehat, K2: tikus stroke dengan perlakuan 300 uL NaCl, K3: tikus stroke dengan pemberian HUC-MSCs dosis $1,5 \times 10^6$ /tikus, K4: tikus stroke dengan pemberian HUC-MSCs dosis 3×10^6 /tikus.

5.1.3. Hasil Analisis Statistik kadar IL-10

Berdasarkan Tabel 5.3 , kadar IL-10 pada K1 adalah $112,8 \pm 6,7$ pg/mL. Induksi stroke pada K2 menurunkan kadar IL-10 menjadi $97,4 \pm 11,1$ pg/mL ($p = 0,05$). Terapi HUC-MSCs dosis $1,5 \times 10^6$ sel/tikus (K3) meningkatkan kadar IL-10 menjadi $131,0 \pm 15,3$ pg/mL, berbeda signifikan

dibanding K2 ($p = 0,008$). Peningkatan tertinggi diperoleh pada dosis 3×10^6 sel/tikus (K4), dengan kadar IL-10 mencapai $186,6 \pm 25,2$ pg/mL, berbeda signifikan dibanding K2 ($p < 0,001$) dan K3 ($p < 0,001$).

Tabel 5.3. Hasil Analisis Statistik Kadar IL-10 (pg/mL)

Parameter	Kelompok				<i>p</i> -value
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ S D (n=5)	Rerata $\pm$ S D (n=5)	Rerata $\pm$ SD (n=5)	Rerata $\pm$ SD (n=5)	
Kadar IL-10	112,8 $\pm$ 6,7	97,4 $\pm$ 11,1	131,0 $\pm$ 15,3	186,6 $\pm$ 25,2	
Uji <i>Saphiro Wilk</i>					0,05*
Uji <i>Lavene</i>					0,008
Uji <i>one-way ANOVA</i>					0,000***

Keterangan:

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

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

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

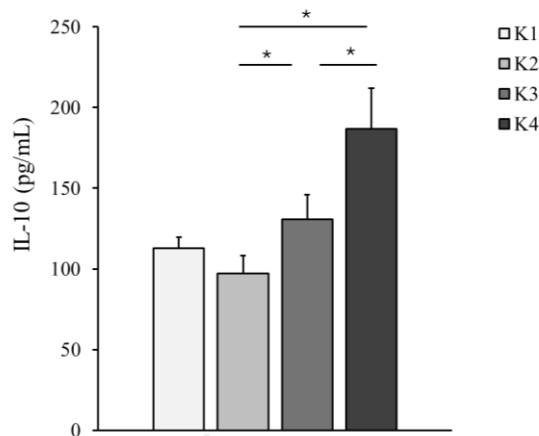
Tabel 5.4. Hasil Post-Hoc Tamhane T2 Kadar IL-10

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.
Kadar IL-10	K1	K2	0,193
		K3	0,287
		K4*	0,012
	K2	K3*	0,029
		K4*	0,003
	K3	K4*	0,027

Keterangan : *) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan. K1: tikus sehat, K2: tikus stroke dengan perlakuan 300 μ L NaCl, K3: tikus stroke dengan pemberian HUC-*MSCs* dosis $1,5 \times 10^6$ /tikus, K4: tikus stroke dengan pemberian HUC-*MSCs* dosis 3×10^6 /tikus

Sisi lain, IL-10 adalah sitokin antiinflamasi yang berfungsi menekan produksi sitokin proinflamasi, menghambat aktivasi sel imun efektor, dan melindungi jaringan dari kerusakan inflamasi berlebihan. Pada kondisi

stroke, peningkatan IL-10 di jaringan otak diasosiasikan dengan perbaikan kerusakan neuron dan pemulihan fungsi neurologis⁴⁴. Oleh karena itu, IL-10 dianalisis untuk mengevaluasi efek imunomodulasi terapi HUC-MSCs. Berdasarkan Gambar 5.4., hasil analisis ELISA pada jaringan otak menunjukkan bahwa kadar IL-10 pada kelompok K1 adalah $112,8 \pm 6,7$ pg/mL. Induksi stroke pada K2 menurunkan kadar IL-10 menjadi $97,4 \pm 11,1$ pg/mL ($p = 0,05$). Pemberian HUC-MSCs dosis $1,5 \times 10^6$ sel/tikus (K3) meningkatkan kadar IL-10 menjadi $131,0 \pm 15,3$ pg/mL, berbeda signifikan dibanding K2 ($p = 0,008$). Peningkatan tertinggi diperoleh pada dosis 3×10^6 sel/tikus (K4) dengan kadar $186,6 \pm 25,2$ pg/mL, yang berbeda signifikan dibanding K2 ($p < 0,001$) dan K3 ($p < 0,001$). Peningkatan IL-10 ini mencerminkan aktivasi mekanisme antiinflamasi yang kuat di jaringan otak, yang berperan dalam menghambat kerusakan lebih lanjut dan mendukung proses perbaikan neuron. Hasil ini memperkuat dugaan bahwa HUC-MSCs bekerja melalui sekresi mediator imunomodulator yang mendorong keseimbangan respon imun ke arah antiinflamasi.



Gambar 5.5. Kadar protein IL-10 pada jaringan otak tikus stroke iskemik pada semua kelompok. Keterangan: *) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan. K1: tikus sehat, K2: tikus stroke dengan perlakuan 300 uL NaCl, K3: tikus stroke dengan pemberian HUC-MSCs dosis $1,5 \times 10^6$ /tikus, K4: tikus stroke dengan pemberian HUC-MSCs dosis 3×10^6 /tikus.

5.2. Pembahasan

IFN- γ adalah sitokin pro-inflamasi utama yang diproduksi terutama oleh sel T efektor (Th1, CD8⁺), NK cell, serta microglia/makrofag yang teraktivasi. Pada jaringan otak pasca-stroke, peningkatan IFN- γ (K2: $918,7 \pm 178,1$ pg/mL vs K1: $289,2 \pm 87,7$ pg/mL; $p \approx 0,05$) menandakan aktivasi kuat jalur imun selular dan priming sel-glia. Secara molekuler, IFN- γ berikatan dengan IFN- γ receptor (IFNGR1/2) pada permukaan sel, mengaktivasi JAK1/JAK2, fosforilasi dan dimerisasi STAT1, translokasi p-STAT1 ke nukleus untuk selanjutnya menginduksi transkripsi gen-target proinflamasi (mis. iNOS, CXCL9/10, MHC class II, IRF1) ^{45,46}. Hasilnya: peningkatan produksi NO, ROS, kemotaksis sel imun, ekspresi molekul presentasi antigen dan difasilitasi infiltrasi sel T ke parenkim otak. IFN- γ juga berinteraksi sinergis dengan jalur NF- κ B untuk meningkatkan ekspresi pro-IL-1 β dan

komponen priming NLRP3, sehingga memfasilitasi aktivasi inflammasome dan pelepasan IL-1 β /IL-18—semua mekanisme yang memperburuk kerusakan neuron, gangguan integritas BBB dan memperlambat pemulihan⁴⁷.

Penurunan IFN- γ pada K3 ($603,3 \pm 151,4$ pg/mL; $p = 0,194$ vs K2 — tidak signifikan) dan K4 ($485,3 \pm 103,6$ pg/mL; signifikan vs K2, $p < 0,001$) dapat dijelaskan oleh beberapa mekanisme parakrin dan seluler dari HUC-MSCs. Salah satunya adalah penghambatan proliferasi dan aktivasi sel T melalui sekresi IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) yang mengonsumsi triptofan, menyebabkan akumulasi metabolit kynurenine, aktivasi GCN2/ARNT, dan akhirnya menghambat siklus sel T serta menurunkan produksi IFN- γ oleh sel T efektor⁴⁸. Selain itu, HUC-MSCs dapat menginduksi perubahan fenotip makrofag/mikroglia dari M1 menjadi M2 melalui mediator seperti PGE₂ yang berikatan dengan reseptor EP2/EP4, meningkatkan kadar cAMP/PKA, mengaktifkan CREB, dan mendorong produksi IL-10 serta menekan ekspresi iNOS dan respon yang distimulasi IFN- γ ⁴⁹. Sekresi faktor lain seperti TSG-6, HGF, TGF- β , dan HLA-G juga berkontribusi dengan menekan aktivasi TLR2/NF- κ B, mengaktifkan sinyal pro-survival PI3K/Akt, mendukung induksi Treg, serta menurunkan aktivasi sel efektor T. Di samping itu, eksosom MSC yang membawa miRNA seperti miR-146a, miR-21, dan miR-124 dapat menarget TRAF6/IRAK1 atau komponen NF- κ B/NLRP3, sehingga menekan transkripsi gen proinflamasi yang dipicu IFN- γ . Produk MSC juga dapat memblokir jalur STAT1 melalui

induksi IL-10 dan SOCS3, yang bersama dengan penghambatan NF- κ B, menurunkan sinyal proinflamasi downstream IFN- γ ^{50,51}.

Pada sisi lain, IL-10 adalah sitokin antiinflamasi kunci yang menekan produksi sitokin proinflamasi dan mempromosikan fenotip penyembuhan. Penurunan IL-10 pada K2 ($97,4 \pm 11,1$ pg/mL vs K1: $112,8 \pm 6,7$; $p \approx 0,05$) menunjukkan bahwa stroke menyebabkan gangguan mekanisme kontrol negatif inflamasi lokal — memperkuat keadaan proinflamasi. IL-10 bekerja melalui IL-10R (IL-10R1/2), aktivasi JAK1/TYK2, fosforilasi STAT3. p-STAT3 masuk nucleus, induksi gen-antiinflamasi termasuk SOCS3. SOCS3 menghambat sinyal JAK/STAT dan juga meredam aktivasi NF- κ B, sehingga menurunkan sintesis TNF- α , IL-1 β , IFN- γ dan iNOS. IL-10 juga menekan priming NLRP3 dan menurunkan aktivasi caspase-1, akhirnya menekan pelepasan IL-1 β ⁵². Oleh karena itu kadar IL-10 yang rendah berkontribusi pada perpanjangan dan eskalasi inflamasi post-stroke.

Pada penelitian ini, kadar IL-10 pada jaringan otak menunjukkan peningkatan signifikan pada K3 ($131,0 \pm 15,3$ pg/mL; $p=0,008$ vs K2) dan K4 ($186,6 \pm 25,2$ pg/mL; $p<0,001$ vs K2/K3). Peningkatan ini dapat terjadi melalui beberapa jalur tumpang tindih, antara lain induksi IL-10 oleh sel inang melalui PGE₂ dari MSC yang memicu makrofag/microglia menghasilkan IL-10 via peningkatan cAMP -PKA-CREB, sehingga IL-10 yang terukur seringkali berasal dari sel inang yang direprogram, bukan semata sekresi langsung MSC. Selain itu, TGF- β dan HLA-G dari MSC dapat memfasilitasi diferensiasi sel T regulator (FoxP3⁺) yang menjadi sumber IL-

10 jangka panjang⁵³. Jalur IDO–Kynurenine juga berperan dalam mempromosikan diferensiasi Treg/Tr1 penghasil IL-10, sedangkan eksosom MSC yang membawa miRNA dapat menekan ekspresi regulator proinflamasi sehingga menggeser keseimbangan menuju profil antiinflamasi. Peningkatan IL-10 ini mengaktivasi STAT3 intraseluler dan menginduksi SOCS3, yang memberi umpan balik negatif pada jalur proinflamasi (JAK/STAT1 dan NF- κ B), sehingga memperkuat efek antiinflamasi pada jaringan otak^{54,55}.

Hasil ini menunjukkan pergeseran dari lingkungan proinflamasi (kondisi stroke) menuju keseimbangan anti-inflamasi setelah terapi HUC-MSCs. Molekularnya ini tercapai melalui kombinasi: (a) penekanan sinyal STAT1/NF- κ B/NLRP3 (mengurangi transkripsi proinflamasi dan aktivasi inflammasome); (b) aktivasi STAT3/SOCS3 dan peningkatan IL-10 (feedback inhibitor pada JAK/NF- κ B); (c) re-polarisasi microglia ke fenotip reparatif M2; (d) dukungan sinyal pro-survival (HGF/PI3K-Akt, BDNF/TrkB) yang menurunkan apoptosis neuron. Perpaduan ini menuntun pada penurunan stres oksidatif, stabilisasi BBB, dan lingkungan yang mendukung neurorepair/angiogenesis — semua berkontribusi pada perbaikan klinis/patologis pasca-stroke.

Penelitian ini memiliki potensi besar untuk menjadi dasar pengembangan terapi imunomodulator berbasis MSC atau produk turunannya (secretome, eksosom) pada penyakit neuroinflamasi dan autoimun. Dengan mengintegrasikan analisis mendalam terhadap jalur IFN- γ dan IL-10, rasio keduanya, serta profil molekuler terkait inflamasi dan

resolusi, studi lanjutan dapat memetakan mekanisme spesifik yang mengarahkan pergeseran respon imun dari proinflamasi menuju antiinflamasi. Pendekatan ini tidak hanya akan memperkuat bukti kausalitas pada model preklinik, tetapi juga membuka peluang untuk merancang biomarker prediktif respons terapi, strategi personalisasi dosis, dan kombinasi dengan agen lain untuk meningkatkan efikasi klinis. Selain itu, pengetahuan ini dapat diaplikasikan lintas penyakit, seperti stroke, multiple sclerosis, atau cedera medula spinalis, sehingga berdampak luas pada terapi regeneratif di masa depan.

Meskipun kadar IFN- γ dan IL-10 telah dianalisis pada jaringan otak dan berpotensi untuk membuka alternatif terapi HUC-MSCs untuk stroke, namun studi ini masih memiliki banyak keterbatasan yaitu belum dilakukannya analisis molekuler yang lebih mendalam untuk mengungkap mekanisme imunomodulasi secara komprehensif. Pada jalur IFN- γ , analisis lanjutan seperti Western blot atau imunohistokimia (IHC) terhadap p-STAT1, total STAT1, dan IFNGR1, serta pengukuran ekspresi gen target seperti iNOS dan CXCL10 akan memberikan pemahaman yang lebih jelas. Demikian pula, pada jalur IL-10, pemeriksaan p-STAT3, total STAT3, dan SOCS3 melalui qPCR atau Western blot dapat mengkonfirmasi aktivasi sinyal antiinflamasi. Selain itu, karakterisasi aktivasi NF- κ B dan inflammasome (misalnya NF- κ B p65 nuklir, I κ B α , NLRP3, ASC, caspase-1, dan pro-IL-1 β) akan membantu menguraikan keterlibatan respons inflamasi bawaan. Profil fenotip mikroglia atau monosit (M1: iNOS/CD86; M2: Arg1/CD206) melalui IHC atau flow

cytometry juga penting untuk menentukan arah polarisasi sel imun. Analisis terhadap populasi Treg (FoxP3⁺) di jaringan atau limfa, beserta ekspresi molekul imunoregulator seperti PD-L1 dan HLA-G, dapat memperkuat bukti peran sel T dalam modulasi imun.

Analisis terhadap populasi Treg (FoxP3⁺) di jaringan atau limfa, beserta ekspresi molekul imunoregulator seperti PD-L1 dan HLA-G, dapat memperkuat bukti peran sel T dalam modulasi imun. Profiling molekul sekretom dan eksosom MSC—meliputi kuantifikasi PGE₂, TGF- β , aktivitas IDO, TSG-6, dan analisis sekuensing miRNA eksosomal (misalnya miR-146a, miR-21)—akan mengidentifikasi mediator potensial. Pemeriksaan parameter fungsi neuronal dan integritas blood-brain barrier (BBB) seperti caspase-3/Bcl-2, jumlah sel NeuN, occludin, claudin-5, serta marker stres oksidatif (MDA, SOD) juga direkomendasikan. Untuk menguji kausalitas, eksperimen blocking menggunakan inhibitor IDO atau antibodi netralisasi IL-10/TGF- β pada model ko-kultur mikroglia-MSK dapat dilakukan. Selain itu, desain analisis time-course diperlukan mengingat sifat dinamis sinyal imun, di mana mediator seperti IFN- γ atau NF- κ B muncul lebih awal sedangkan Treg/IL-10 berkembang kemudian. Menghitung dan melaporkan rasio IFN- γ /IL-10 juga akan menjadi indikator yang kuat terhadap keseimbangan imun lokal, khususnya jika rasio tersebut menurun signifikan pada kelompok perlakuan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) dapat menurunkan kadar IFN- γ dibanding kelompok kontrol.
2. Pemberian *hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cell* (HUC-MSCs) meningkatkan kadar IL-10 dibanding kelompok kontrol.

6.2. Saran

Saran dari penelitian ini antara lain:

1. Perlu dilakukan pemeriksaan jalur pensinyalan IFN secara mendalam pada jaringan otak setelah pemberian HUC-MSCs, meliputi analisis p-STAT1/total STAT1, IFNGR1, serta target downstream (mis. iNOS, CXCL10) dan komponen inflammasome (NLRP3, caspase-1, pro-IL-1 β) menggunakan kombinasi Western blot, IHC, qPCR, dan ELISA untuk mengkonfirmasi mekanisme penurunan IFN- γ .
2. Perlu dilakukan investigasi terhadap jalur IL-10/STAT3 dan sumber seluler IL-10 pasca terapi, termasuk pemeriksaan p-STAT3, SOCS3, frekuensi Treg (FoxP3⁺), polarisasi microglia/monosit (M1 vs M2), serta profiling secretome/eksosom (PGE₂, TGF- β , aktivitas IDO,

miRNA eksosomal) untuk memperjelas bagaimana HUC-MSCs meningkatkan IL-10 dan memediasi efek imunomodulator.



DAFTAR PUSTAKA

1. Laurent D, Small CN, Goutnik M, Hoh B. Ischemic Stroke. *Acute Care Neurosurgery by Case Management: Pearls and Pitfalls*. Published online April 20, 2024;159-172. doi:10.1007/978-3-030-99512-6_13
2. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, et al. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1). doi:10.1038/S41572-019-0118-8
3. Donkor ES. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Res Treat*. 2018;2018:3238165. doi:10.1155/2018/3238165
4. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Neuropharmacology – Special Issue on Cerebral Ischemia Mechanisms of Ischemic Brain Damage – Review Article. *Neuropharmacology*. 2008;55(3):310. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2008.01.005
5. Yaqubi S, Karimian M. Stem cell therapy as a promising approach for ischemic stroke treatment. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2024;6:100183. doi:10.1016/J.CRPHAR.2024.100183
6. Cunningham CJ, Wong R, Barrington J, Tamburrano S, Pinteaux E, Allan SM. Systemic conditioned medium treatment from interleukin-1 primed mesenchymal stem cells promotes recovery after stroke. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1-12. doi:10.1186/S13287-020-1560-Y/FIGURES/4
7. Popa-Fotea NM, Ferdoschi CE, Micheu MM. Molecular and cellular mechanisms of inflammation in atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1200341. doi:10.3389/FCVM.2023.1200341
8. Voloshyna I, Littlefield MJ, Reiss AB. Atherosclerosis and interferon- γ : New insights and therapeutic targets. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;24(1):10.1016/j.tcm.2013.06.003. doi:10.1016/J.TCM.2013.06.003
9. Hao X rui, Cao D li, Hu Y wei, et al. IFN- γ down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR α in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis*. 2009;203(2):417-428. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2008.07.029
10. Rehman S, Nadeem A, Akram U, et al. Molecular Mechanisms of Ischemic Stroke: A Review Integrating Clinical Imaging and Therapeutic Perspectives. *Biomedicines* 2024, Vol 12, Page 812. 2024;12(4):812. doi:10.3390/BIOMEDICINES12040812

11. Cegah Stroke dengan Aktivitas Fisik. Accessed January 4, 2025. <https://kemkes.go.id/id/rilis-kesehatan/cegah-stroke-dengan-aktivitas-fisik>
12. Cunningham CJ, Wong R, Barrington J, Tamburrano S, Pinteaux E, Allan SM. Systemic conditioned medium treatment from interleukin-1 primed mesenchymal stem cells promotes recovery after stroke. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1-12. doi:10.1186/S13287-020-1560-Y/FIGURES/4
13. Amarin B, Alegretti AP, Valim V de S, et al. Characteristics of Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia. *Cellbio (Irvine, Calif).* 2013;2(1):11-19. doi:10.4236/CELLBIO.2013.21002
14. Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. <https://home.liebertpub.com/teb>. 2022;28(5):966-977. doi:10.1089/TEN.TEB.2021.0145
15. Wei L, Fraser JL, Lu ZY, Hu X, Yu SP. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis.* 2012;46(3):635-645. doi:10.1016/J.NBD.2012.03.002
16. Ryu S, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural Regen Res.* 2016;11(2):298. doi:10.4103/1673-5374.177739
17. Mu J, Bakreen A, Juntunen M, et al. Combined Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy and Rehabilitation in Experimental Stroke. *Front Neurol.* 2019;10:235. doi:10.3389/FNEUR.2019.00235/FULL
18. Zhang B, Joseph B, Saatman KE, Chen L. Intra-Arterial Delivery of Neural Stem Cells to the Rat and Mouse Brain: Application to Cerebral Ischemia. *J Vis Exp.* 2020;2020(160):e61119. doi:10.3791/61119
19. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN- γ receptors. *Allergy.* 2001;54(12):1233. doi:10.1034/J.1398-9995.1999.00099.X
20. Young HA, Bream JH. IFN- γ : Recent Advances in Understanding Regulation of Expression, Biological Functions, and Clinical Applications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;316:97-117. doi:10.1007/978-3-540-71329-6_6
21. Chow KT, Gale M. SnapShot: Interferon Signaling. *Cell.* 2015;163(7):1808-1808.e1. doi:10.1016/j.cell.2015.12.008
22. Boshuizen MCS, De Winther MPJ. Interferons as essential modulators of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(7):1579-1588.

23. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515-581.
24. Iyer SS, Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23. doi:10.1615/CRITREVIMMUNOL.V32.I1.30
25. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29(Volume 29, 2011):71-109. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-031210-101312/CITE/REFWORKS
26. Sun W, Wang S, Nan S. The Prognostic Determinant of Interleukin-10 in Patients with Acute Ischemic Stroke: An Analysis from the Perspective of Disease Management. *Dis Markers.* 2021;2021:6423244. doi:10.1155/2021/6423244
27. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro Á. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2003;34(3):671-675. doi:10.1161/01.STR.0000057976.53301.69/ASSET/FA3C61EC-5503-4038-B08D-2B7C3110D2D9/ASSETS/GRAPHIC/16FF2.JPEG
28. Doeppner TR, Hermann DM. Mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke: progress and possibilities. *Stem Cells Cloning.* 2010;3:157. doi:10.2147/SCCAA.S7820
29. Cha Z, Qiao Y, Lu Q, et al. Research progress and challenges of stem cell therapy for ischemic stroke. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1410732. doi:10.3389/FCELL.2024.1410732/BIBTEX
30. Wu KJ, Yu SJ, Chiang CW, et al. Wharton' jelly mesenchymal stromal cell therapy for ischemic brain injury. *Brain Circ.* 2018;4(3):124. doi:10.4103/BC.BC_16_18
31. Zhang L, Wang LM, Chen WW, et al. Neural differentiation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves the recovery of neurological function after transplantation in ischemic stroke rats. *Neural Regen Res.* 2017;12(7):1103. doi:10.4103/1673-5374.211189
32. Ya J, Pellumbaj J, Hashmat A, Bayraktutan U. The Role of Stem Cells as Therapeutics for Ischaemic Stroke. *Cells* 2024, Vol 13, Page 112. 2024;13(2):112. doi:10.3390/CELLS13020112
33. Qin C, Yang S, Chu YH, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal*

- Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1. 2022;7(1):1-29. doi:10.1038/s41392-022-01064-1
34. Endres M, Moro MA, Nolte CH, Dames C, Buckwalter MS, Meisel A. Immune pathways in etiology, acute phase, and chronic sequelae of ischemic stroke. *Circ Res*. 2022;130(8):1167-1186.
 35. Elyasi A, Voloshyna I, Ahmed S, et al. The role of interferon- γ in cardiovascular disease: an update. *Inflammation Research* 2020 69:10. 2020;69(10):975-988. doi:10.1007/S00011-020-01382-6
 36. Widowati W, Wijaya L, Bachtiar I, et al. Effect of oxygen tension on proliferation and characteristics of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 2014;6(1):43-48. doi:10.1016/J.BGM.2014.02.001
 37. Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *Journal of Clinical Medicine* 2019, Vol 8, Page 1025. 2019;8(7):1025. doi:10.3390/JCM8071025
 38. Cha Z, Qiao Y, Lu Q, et al. Research progress and challenges of stem cell therapy for ischemic stroke. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1410732. doi:10.3389/FCELL.2024.1410732/BIBTEX
 39. Takeda H, Yamaguchi T, Yano H, Tanaka J. Microglial metabolic disturbances and neuroinflammation in cerebral infarction. *J Pharmacol Sci*. 2021;145(1):130-139. doi:10.1016/J.JPHS.2020.11.007
 40. Zheng J, Yang M, Shao J, Miao Y, Han J, Du J. Chemokine receptor CX3CR1 contributes to macrophage survival in tumor metastasis. *Mol Cancer*. 2013;12(1):1-11. doi:10.1186/1476-4598-12-141/FIGURES/5
 41. Sungkar T, Putra A, Lindarto D, Sembiring RJ. Intravenous Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Regulates Hyaluronic Acid and Interleukin-10 Secretion Producing Low-grade Liver Fibrosis in Experimental Rat. *Med Arch (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)*. 2020;74(3):177-182. doi:10.5455/medarh.2020.74.177-182
 42. Erol A, Sel FA, Süleymanoğlu M, Demirayak G, Kuruca DS, Savran Oğuz F. Evaluation of the relationship between mesenchymal stem cells and immune system in vitro conditions. *Mol Biol Rep*. 2023;50(5):4347-4356. doi:10.1007/s11033-023-08374-9
 43. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(2):163-177. doi:10.1016/j.beem.2013.02.005

44. Nakajima M, Nito C, Sowa K, et al. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. Published online 2017. doi:10.1016/j.omtm.2017.06.005
45. Shruthi S, Mohan V, Amutha A, Aravindhan V. Increased serum levels of novel T cell cytokines IL-33, IL-9 and IL-17 in subjects with type-1 diabetes. *Cytokine*. 2016;86:6-9. doi:10.1016/J.CYTO.2016.07.007
46. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. Published online 2018. doi:10.18632/oncotarget.23208
47. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):1-15. doi:10.3390/ijms21020465
48. Herzig MC, Christy BA, Montgomery RK, et al. Interactions of human mesenchymal stromal cells with peripheral blood mononuclear cells in a Mitogenic proliferation assay. *J Immunol Methods*. 2021;492:113000. doi:10.1016/J.JIM.2021.113000
49. Darlan DM, Munir D, Putra A, Jusuf NK. MSCs-released TGF β 1 generate CD4+CD25+Foxp3+ in T-reg cells of human SLE PBMC. *J Formos Med Assoc*. 2021;120(1):602-608. doi:10.1016/J.JFMA.2020.06.028
50. Mühl H, Dhingra S, Booz GW, et al. IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Front Immunol* | www.frontiersin.org. 2019;1:1267. doi:10.3389/fimmu.2019.01267
51. Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes*. 2013;6(1):0-7. doi:10.1186/1756-0500-6-275
52. M M, E C, M N, et al. Pro-inflammatory M1/Th1 type immune network and increased expression of TSG-6 in the eutopic endometrium from women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;218:99-105. doi:10.1016/J.EJOGRB.2017.08.014
53. Thepmalee C, Panya A, Junking M, Chieochansin T, Yenchitsomanus P thai. Inhibition of IL-10 and TGF- β receptors on dendritic cells enhances activation of effector T-cells to kill cholangiocarcinoma cells. *Hum Vaccines Immunother*. 2018;14(6):1423-1431. doi:10.1080/21645515.2018.1431598
54. Burmeister AR, Marriott I. The interleukin-10 family of cytokines and their

role in the CNS. *Front Cell Neurosci.* 2018;12(November):1-13. doi:10.3389/fncel.2018.00458

55. Samakova A, Gazova A, Sabova N, Valaskova S, Jurikova M, Kyselovic J. The pi3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia. *Physiol Res.* 2019;68(January 2020):S131-S138. doi:10.33549/PHYSIOLRES.934345

