

**PENGARUH PEMBERIAN HYPOXIC  
PRECONDITIONED UMBILICAL CORD  
MESENCHYMAL STEM CELLS ( HUC- MSCs) –  
TERHADAP PERUBAHAN KADAR TNF  $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$**

(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Wistar Model Stroke  
Iskemik Akut)

**TESIS**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister  
(S2)**



**Magister Ilmu Hukum**

**Ilham Habib Djarkoni**

**MBK. 24.24.010511**

**PROGRAM STUDI PASCASARJANA ILMU BIOMEDIK**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG**

**SEMARANG 2026**

**TESIS**  
**PENGARUH PEMBERIAN HYPOXIC**  
**PRECONDITIONED UMBILICAL CORD**  
**MESENCHYMAL STEM CELLS ( HUC- MSCs) –**  
**TERHADAP PERUBAHAN KADAR TNF  $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$**   
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Wistar Model Stroke Iskemik Akut)

Disusun Oleh :

**Ilham Habib Djarkoni**


**MBK. 24.24.010511**

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji Pada


Tanggal 27 Januari 2026

Pembimbing I

Pembimbing II

  
Prof. Dr.dr. Agung Putra, Msi.Med.

NIK. 210199050

  
Dr.dr Eko Setiawan, SpB, FINACS


NIK. 210113160

Mengetahui.

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



  
Dr. dr. Joko Wahyu Wihowo, M.Kes)


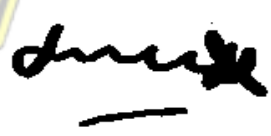



NIK 210 198 046

### LEMBAR PENGESAHIAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis dengan Judul " PENGARUH PEMBERIAN HYPOXIC PRE-  
CONDITIONED UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS  
(HUC- MSCs)-TERHADAP PERUBAHAN KADAR TNF  $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$   
(Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Wistar Model Stroke Iskemik Akut)"  
ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada:

Hari : Selasa

Tanggal : 27 Januari 2026

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes	Penguji I	
2.	Dr.dr.Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF	Penguji II	
3.	Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes	Penguji III	
4.	Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med	Pembimbing I	
5.	Dr. dr. Eko Setiawan,Sp.B, FINACS.	Pembimbing II	

## 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 pendidikanlainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 19 Januari 2026

Ilham Habib Djarkoni

MBK.2424010511



## RIWAYAT HIDUP

### 1. Identitas

Nama : Ilham Habib Djarkoni  
Tempat/ Tanggal Lahir : Ambon, 14 November 1992  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Laki – laki.

### 2. Riwayat Pendidikan

- a. TK : TK Muhammadiyah Ambon, Lulus tahun 1997
- b. SD : SD Negeri 03 Palu. Lulus tahun 2004
- c. SMP : SMP Islam Al Azhar. Lulus tahun 2007
- d. SMA : SMA Negeri 3 Kota Palu. Lulus tahun 2010
- e. S1 : Fakultas Kedokteran. Universitas Sam Ratulangi Manado. Lulus tahun 2014
- f. Profesi Dokter : Fakultas Kedokteran. Universitas Sam Ratulangi Manado. Lulus tahun 2016
- g. PPDS : Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin Makassar. Lulus tahun 2023
- h. S2 : Fakultas Pascasarjana Ilmu Pendidikan islam. Sekolah Tinggi Ilmu Tarbiyah Pringsewu. Magister Ilmu Manajemen Pendidikan. Lulus tahun 2024.
- i. S2 : Fakultas Kedokteran. Universitas Islam Sultan Agung. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula. Lulus tahun 2026.

### 3. Riwayat Keluarga :

Nama Istri : dr. Indri Ayu Pratiwi L.  
TTL : Manado 29 Juni 1992  
Alamat : Permata Sudiang Raya Blok : L6. No.7, Makassar.

## KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN *HYPOXIC PRECONDITIONED UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS (HUC-MSCS)* - TERHADAP PERUBAHAN KADAR TNF-A DAN IL-1B”** Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister (S.2) pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH, M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S. H, Sp. KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Penguji II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk memperbaiki penulisan selama proses tesis.
3. Dr. dr. Eko Setiawan Sp. B. FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulisan selama proses tesis.

4. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med. selaku Dosen Pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulisan selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes. selaku Dosen Penguji I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk memperbaiki penulisan selama proses penyusunan tesis.
6. Dr. dr. Hadi Sarosa M.Kes selaku Dosen Penguji III dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk memperbaiki penulisan selama proses penyusunan tesis.
7. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
8. Istri dan Anak – Anak Tercinta yang semoga selalu dalam Lindungan Allah.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini,

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, Harapan Penulis semoga penelitian yang diusulkan dapat memberikan kontribusi ilmiah terhadap pemahaman mekanisme molekuler stroke iskemik dan potensi terapi berbasis HUC-MSK, serta bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan kesehatan masyarakat. Akhir kata Terima kasih atas segala perhatian dan kerjasama yang telah diberikan.

Semarang, 19 Januari 2026

Penulis

Ilham Habib Djarkoni

## Abstrak

**Latar Belakang:** Faktor nekrosis tumor-alfa (TNF- $\alpha$ ) dan interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) berkontribusi pada cedera neuronal sekunder setelah stroke iskemik dengan memicu gangguan sawar darah-otak dan apoptosis neuronal. Sel punca mesenkimal (MSC) memiliki efek anti-inflamasi dan neuroprotektif, tetapi efektivitasnya mungkin terbatas dalam kondisi iskemik karena kelangsungan hidup yang buruk dan aktivitas parakrin yang tidak memadai. Pra-kondisi hipoksia dapat meningkatkan potensi MSC, namun bukti in vivo tentang modulasi sitokin masih terbatas. Studi ini mengevaluasi efek MSC tali pusat manusia (HUC-MSC) yang telah diberi pra-kondisi hipoksia pada kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dalam model stroke iskemik akut.

**Bahan dan Metode:** Dua puluh delapan tikus Wistar jantan secara acak dibagi menjadi empat kelompok: kontrol sehat, stroke tanpa pengobatan, stroke +  $1,5 \times 10^6$  HUC-MSC yang telah diberi pra-kondisi hipoksia, dan stroke +  $3,0 \times 10^6$  HUC-MSC yang telah diberi pra-kondisi hipoksia. Stroke diinduksi menggunakan oklusi arteri serebral tengah (MCAO). HUC-MSC diberikan secara intravena pada hari ke-3 setelah oklusi. TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  jaringan otak diukur dengan ELISA dan dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dengan pengujian post hoc.

**Hasil:** Kedua dosis HUC-MSC secara signifikan mengurangi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dibandingkan dengan stroke yang tidak diobati ( $p < 0,001$ ), dengan efek yang bergantung pada dosis dan kadar sitokin terendah pada kelompok  $3,0 \times 10^6$ .

**Kesimpulan:** HUC-MSC yang diberi pra-kondisi hipoksia menekan TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada stroke iskemik akut, mendukung potensi imunomodulator dan neuroprotektifnya. Studi lebih lanjut harus menilai hasil jangka panjang dan korelasi histopatologis.

**Kata kunci:** stroke iskemik, HUC-MSC, pra-kondisi hipoksia, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

## Abstract

**Background:** Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) contribute to secondary neuronal injury after ischemic stroke by promoting blood–brain barrier disruption and neuronal apoptosis. Mesenchymal stem cells (MSCs) have anti-inflammatory and neuroprotective effects, but their efficacy may be limited under ischemic conditions due to poor survival and inadequate paracrine activity. Hypoxic preconditioning may enhance MSC potency, yet in vivo evidence on cytokine modulation remains limited. This study evaluated the effects of hypoxic-preconditioned human umbilical cord MSCs (HUC-MSCs) on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in an acute ischemic stroke model.

**Materials and Methods:** Twenty-eight male Wistar rats were randomized into four groups: healthy control, untreated stroke, stroke +  $1.5 \times 10^6$  hypoxic-preconditioned HUC-MSCs, and stroke +  $3.0 \times 10^6$  hypoxic-preconditioned HUC-MSCs. Stroke was induced using middle cerebral artery occlusion (MCAO). HUC-MSCs were administered intravenously on day 3 post-occlusion. Brain tissue TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were measured by ELISA and analyzed using one-way ANOVA with post hoc testing.

**Results:** Both HUC-MSC doses significantly reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  versus untreated stroke ( $p < 0.001$ ), with a dose-dependent effect and the lowest cytokine levels in the  $3.0 \times 10^6$  group.

**Conclusion:** Hypoxic-preconditioned HUC-MSCs suppress TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in acute ischemic stroke, supporting their immunomodulatory and neuroprotective potential. Further studies should assess long-term outcomes and histopathological correlations.

**Keywords:** ischemic stroke, HUC-MSCs, hypoxic preconditioning, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$



## DAFTAR ISI

DAFTAR ISI .....	ii
DAFTAR TABEL .....	iii
DAFTAR GAMBAR .....	iv
DAFTAR SINGKATAN .....	v
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 Stroke Iskemik .....	9
2.1.1 Definisi dan Epidemiologi .....	9
2.1.2 Patofisiologi .....	10
2.1.3 Dampak Klinis terhadap Otak .....	13
2.2 Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) .....	15
2.2.1 Definisi dan Peran TNF- $\alpha$ .....	15
2.2.2 Peran TNF- $\alpha$ pada Stroke Iskemik .....	16
2.3 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	16
2.3.1 Definisi dan Peran IL-1 $\beta$ .....	16
2.3.2 Peran IL-1 $\beta$ pada Stroke Iskemik .....	17
2.4 TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ pada Stroke Iskemik .....	18
2.5 Mesenchymal Stem Cells (MSC) .....	19
2.5.1 Definisi dan Karakteristik .....	19
2.5.2 Potensi Terapi Stroke dengan MSC-Derived Secretome .....	21
2.5.3 Preconditioning Hipoksia pada MSC .....	23
2.6 Mekanisme Kerja MSC pada Kondisi Stroke .....	26
2.7 Pengaruh Hypoxic Preconditioned hUC-MSCs .....	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS .....	28
3.1 Kerangka Teori .....	28

3.2 Kerangka Konsep .....	32
3.3 Hipotesis .....	33
BAB IV METODE PENELITIAN .....	34
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	34
4.2 Variabel dan Definisi Operasional .....	35
4.3 Subjek dan Sampel Penelitian .....	38
4.4 Teknik Pengambilan Sampel .....	39
4.5 Besar Sampel .....	40
4.6 Alat dan Bahan .....	40
4.7 Cara Penelitian .....	43
4.8 Tempat dan Waktu Penelitian .....	53
4.9 Analisis Data .....	53
4.10 Alur Penelitian .....	55
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	58
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	72
DAFTAR PUSTAKA .....	(sesuaikan halaman terakhir)



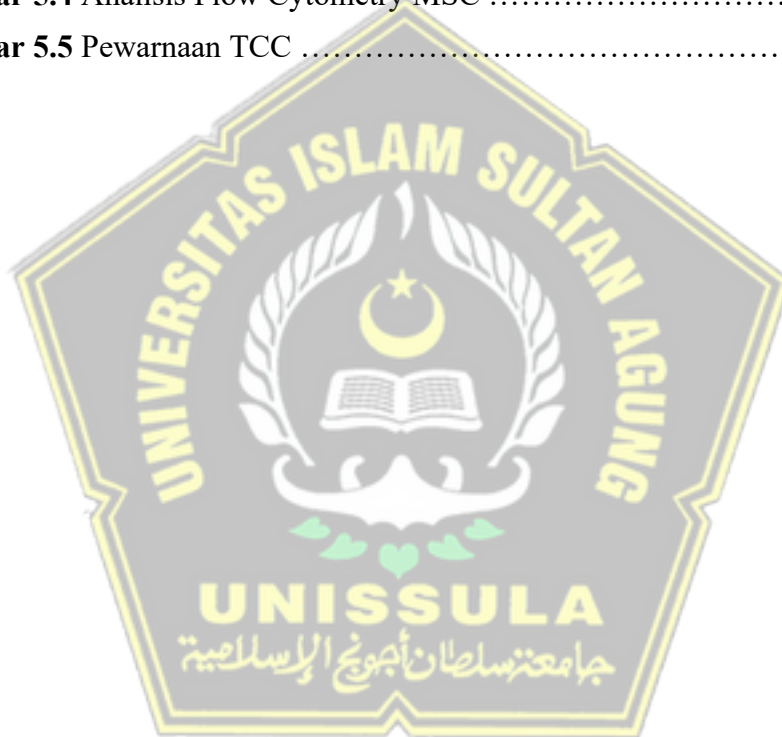
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.1</b> Originalitas Penelitian .....	6
Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas TNF- $\alpha$ .....	65
Tabel 5.2 Data Deskriptif TNF- $\alpha$ .....	66
Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas TNF- $\alpha$ .....	66
Tabel 5.4 Hasil Uji ANOVA dan Post-Hoc Tamhane TNF- $\alpha$ .....	67
Tabel 5.5 Hasil Uji Post-Hoc LSD IL-1 $\beta$ .....	67
Tabel 5.6 Hasil uji analisis post-hoc LSD .....	69



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Peran Interleukin pada Stroke Iskemik <sup>5</sup> .....	15
<b>Gambar 2.2</b> Sumber Mesenchymal stem cells (MSCs) <sup>38</sup> .....	19
<b>Gambar 3.1</b> Kerangka Teori.....	30
<b>Gambar 3.2</b> Kerangka Konsep .....	31
<b>Gambar 4.1</b> Skema Rancangan Penelitian .....	32
<b>Gambar 4.2</b> Alur Penelitian .....	52
<b>Gambar 5.2a</b> Diferensiasi Osteogenesis (Alizarin Red).....	60
<b>Gambar 5.2b</b> Diferensiasi Adipogenik (Oil Red O) .....	60
<b>Gambar 5.3</b> Grafik Scatter Plot .....	60
<b>Gambar 5.4</b> Analisis Flow Cytometry MSC .....	61
<b>Gambar 5.5</b> Pewarnaan TCC .....	



## DAFTAR SINGKATAN

AKT	: <i>Protein Kinase B</i>
BBB	: <i>Blood–Brain Barrier</i>
BMSC	: <i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell</i>
CD9	: <i>Cluster of Differentiation 9</i>
CD63	: <i>Cluster of Differentiation 63</i>
CD81	: <i>Cluster of Differentiation 81</i>
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
DAMP	: <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DLL4	: <i>Delta-Like Ligand 4</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
HIF-1 $\alpha$	: <i>Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-6R	: <i>Interleukin-6 Receptor</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
MCAO	: <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>
MEM- $\alpha$	: <i>Minimum Essential Medium Alpha</i>
miR	: <i>microRNA</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MSC-Exos	: <i>Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes</i>
NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells</i>
PBS	: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PVDF	: <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
Risikesdas	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
rtPA	: <i>Recombinant tissue Plasminogen Activator</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TLR4	: <i>Toll-Like Receptor 4</i>
TMB	: <i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-2	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Stroke iskemik merupakan salah satu tantangan utama dalam bidang neurologi dan kesehatan masyarakat, karena tidak hanya menjadi penyebab kematian yang signifikan, tetapi juga menimbulkan kecacatan jangka panjang yang berdampak besar terhadap kualitas hidup penderita. Stroke terjadi ketika aliran darah ke otak terhambat akibat sumbatan pada pembuluh darah, yang menyebabkan kekurangan oksigen dan nutrisi pada jaringan saraf. Kondisi ini memicu serangkaian mekanisme biologis kompleks, termasuk stres oksidatif, disfungsi mitokondria, dan aktivasi respon inflamasi yang berlebihan.<sup>1</sup> Sayangnya, terapi konvensional seperti trombolisis dengan *recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) atau trombektomi mekanik hanya efektif jika diberikan dalam jendela waktu yang sangat sempit (4,5 jam sejak onset), dan penggunaannya berisiko menimbulkan perdarahan intraserebral. Oleh karena itu, muncul kebutuhan mendesak akan terapi alternatif yang mampu bekerja secara lebih luas dalam berbagai fase stroke dan memiliki efek samping minimal.<sup>2</sup> Salah satu pendekatan yang kini banyak dikaji adalah terapi berbasis sel punca, terutama *Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (UC-MSCs), karena memiliki keunggulan biologis seperti kapasitas proliferasi tinggi, rendahnya imunogenisitas, serta kemampuan untuk beradaptasi dan merespons lingkungan mikro yang rusak di otak. Penggunaan HUC-MSCs yang

diprekondisi hipoksia menjadi semakin relevan, karena teknik ini terbukti meningkatkan efektivitas sel punca dalam menekan inflamasi dan mempercepat perbaikan jaringan. Dengan mempertimbangkan kompleksitas patofisiologi stroke iskemik, strategi terapi berbasis HUC-MSCs hipoksia menjadi solusi yang sangat menjanjikan secara ilmiah dan klinis.<sup>3</sup>

Prevalensi stroke iskemik terus meningkat secara global dan menjadi penyebab kematian nomor dua setelah penyakit jantung iskemik. Menurut data *World Stroke Organization*, setiap tahunnya terdapat lebih dari 12 juta kasus baru stroke di seluruh dunia, dan sekitar 7 juta kematian terkait stroke, menjadikannya sebagai beban kesehatan global yang signifikan. Stroke iskemik sendiri mencakup 70–80% dari seluruh kasus stroke. Di Indonesia, berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2018, stroke menjadi penyebab kematian tertinggi dengan angka mencapai 10,9%, dan prevalensinya meningkat drastis pada kelompok usia di atas 45 tahun. Kondisi ini diperparah dengan tingginya prevalensi faktor risiko yang dapat dimodifikasi, seperti hipertensi, diabetes melitus, dislipidemia, dan kebiasaan merokok. Selain itu, meningkatnya angka kejadian pada usia produktif menambah dimensi ekonomi dan sosial dari penyakit ini, karena banyak penderita yang akhirnya kehilangan fungsi motorik, kognitif, dan ketergantungan jangka panjang terhadap bantuan orang lain. Besarnya beban morbiditas dan mortalitas ini menekankan perlunya pendekatan terapi yang tidak hanya menargetkan reperfusi vaskular, tetapi juga memperbaiki kondisi jaringan otak yang rusak melalui mekanisme antiinflamasi dan neuroregeneratif.<sup>4</sup>

Pada fase akut stroke iskemik, aktivasi sistem imun bawaan menghasilkan pelepasan berbagai sitokin proinflamasi yang memperburuk cedera otak. Di antara sitokin tersebut, *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *Interleukin1 beta* (IL-1 $\beta$ ) memiliki peran sentral dalam memicu disfungsi sawar darah otak, meningkatkan apoptosis neuron, dan memperparah area infark. TNF- $\alpha$  diproduksi dalam waktu singkat setelah terjadinya iskemia dan berperan dalam aktivasi jalur inflamasi NF- $\kappa$ B, sedangkan IL-1 $\beta$  memperkuat infiltrasi leukosit dan aktivasi mikroglia, sehingga memperburuk cedera neuron<sup>5,6</sup>. Meskipun banyak penelitian telah mengeksplorasi potensi *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) dalam terapi stroke, sebagian besar studi masih berfokus pada dampaknya terhadap regenerasi jaringan dan perbaikan fungsional secara umum, tanpa secara spesifik mengevaluasi efeknya terhadap kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Beberapa pendekatan baru menunjukkan bahwa prekondisi hipoksia dapat meningkatkan potensi MSC untuk menghambat inflamasi dan meningkatkan sekresi faktor neurotropik. Namun, pengaruh HUC-MSCs yang dipre-kondisi hipoksia terhadap biomarker inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  masih jarang diteliti, terutama dalam model *in vivo* pada hewan.<sup>7,8</sup>

Salah satu pendekatan yang berpotensi menjawab tantangan terapi stroke iskemik adalah penggunaan *Hypoxic Preconditioned* HUC-MSCs sebagai agen terapeutik. Prekondisi hipoksia diketahui mampu meningkatkan viabilitas, ketahanan terhadap stres lingkungan, serta aktivitas sekresi dari MSC,

termasuk pelepasan eksosom yang mengandung molekul-molekul bioaktif seperti microRNA dan protein antiinflamasi.<sup>9</sup>

Eksosom yang dihasilkan dari MSC yang telah dipre-kondisi hipoksia memiliki efek yang lebih kuat dalam menekan produksi sitokin proinflamasi dan memperbaiki fungsi sawar darah otak. Pada stroke, pemberian HUC-MSCs hipoksia secara sistemik diharapkan mampu mencapai area cedera, mengurangi kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , serta mendukung proses neuroregeneratif. Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi pengaruh spesifik dari intervensi tersebut terhadap kadar sitokin proinflamasi utama, sebagai dasar ilmiah untuk pengembangan terapi sel yang lebih terarah dan efektif. Jika terbukti berhasil, pendekatan ini berpotensi menjadi bagian dari strategi klinis masa depan dalam pengelolaan stroke iskemik, dengan tujuan utama meminimalkan kerusakan sekunder akibat inflamasi dan mempercepat pemulihan fungsi neurologis pasien.<sup>9,10,11</sup>

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (HUC-MSCs) terhadap kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada stroke iskemik akut?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (HUC-MSCs) terhadap kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada stroke iskemik akut

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (HUC-MSCs) terhadap kadar TNF- $\alpha$  pada stroke iskemik akut.
2. Menganalisis pengaruh pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (HUC-MSCs) terhadap kadar IL-1 $\beta$  pada stroke iskemik akut.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman ilmiah tentang dampak pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (HUC-MSCs) terhadap kadar IL-1 $\beta$  pada stroke iskemik akut serta menjelaskan mekanisme peran kedua sitokin proinflamasi tersebut dalam proses inflamasi pada model tikus stroke iskemik.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna dalam pengembangan terapi berbasis HUC-MSCs yang diprekondisi hipoksia untuk menekan peradangan dan mempercepat pemulihan jaringan otak pada pasien stroke iskemik. Selain itu, penelitian ini dapat menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan strategi terapi baru yang lebih efektif, aman, dan aplikatif dalam menangani fase akut stroke iskemik.

### 1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil
Huang et al., 2024 <sup>12</sup>	<i>Preclinical safety and efficacy evaluation of the intrathecal transplantation of GMPgrade human umbilical cord mesenchymal stem cells for ischemic stroke</i>	In vivo, eksperimen	Transplantasi hUC-MSC secara intratekal melalui injeksi cerebellomedullary cistern pada tikus stroke iskemik menunjukkan efikasi yang baik dengan peningkatan neurogenesis dan angiogenesis serta pengurangan volume infark dan perbaikan fungsi neurologis.

Liu et al., 2022 <sup>13</sup>	<i>Intramyocardial injected human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (HucMSCs) contribute to the recovery of cardiac function and the migration of CD4+ T cells into the infarcted heart via CCL5/CCR5 signaling</i>	In vivo, eksperimen	Penyuntikan intramiokardial hUC-MSC meningkatkan angiogenesis, memperbaiki fibrosis jantung, dan meningkatkan migrasi sel T CD4+ Tregs melalui jalur CCL5/CCR5 yang berhubungan dengan pemulihan fungsi jantung.
Xia et al., 2020 <sup>14</sup>	<i>Small extracellular vesicles secreted by human iPSC-derived MSC enhance angiogenesis through inhibiting STAT3-dependent autophagy in ischemic stroke</i>	In vivo, eksperimen	iMSC-sEV memperbaiki angiogenesis dan fungsi neurologis pada model stroke dengan menghambat autophagy melalui aktivasi STAT3.
Kim et al., 2020 <sup>15</sup>	<i>Mesenchymal stem cell-derived magnetic extracellular nanovesicles for targeting and treatment of ischemic stroke</i>	In vivo, eksperimen	Nanovesikel magnetik MSC meningkatkan targeting ke lesi stroke, memperkuat angiogenesis dan antiinflamasi, serta memperbaiki fungsi neurologis tikus stroke.

---

Xu et al., 2020 <sup>16</sup>	<i>In vivo Monitoring and Assessment of Exogenous Mesenchymal Stem Cell-Derived in Mice with Ischemic Stroke by Molecular Imaging</i>	In vivo, of eksperimen ntal	MSC bermigrasi ke otak iskemik, meningkatkan angiogenesis dan neurogenesis, serta menurunkan IL-1 $\beta$ yang berkontribusi pada pemulihan stroke.
----------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

---

Penelitian ini berfokus pada pengaruh pemberian HUC-MSCs yang dipre-kondisi hipoksia terhadap kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada kondisi stroke iskemik. Meskipun banyak penelitian sebelumnya yang mengeksplorasi aplikasi terapi menggunakan MSCs, seperti MSCs dari sumsum tulang atau eksosom MSCs, fokus sebagian besar penelitian tersebut masih terbatas pada efek angiogenik dan neurogenik secara umum. Penelitian ini berbeda karena memfokuskan pada pengaruh langsung HUC-MSCs yang diprekondisikan secara hipoksia pada tikus terhadap kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , dua sitokin utama yang berperan dalam proses peningkatan inflamasi pada kejadian pascastroke.

Perbedaan utama dari penelitian ini adalah pendekatan yang fokus pada kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , serta penggunaan HUC-MSCs yang dipre-kondisi hipoksia, suatu pendekatan yang belum banyak diterapkan pada studi sebelumnya.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Stroke Iskemik**

##### **2.1.1 Definisi dan Epidemiologi**

Stroke iskemik adalah suatu kondisi neurologis akut yang terjadi secara mendadak dan disebabkan oleh hambatan aliran darah di pembuluh arteri serebral, yang mengakibatkan gangguan aliran oksigen dan nutrisi ke jaringan otak sehingga menimbulkan kerusakan jaringan sel saraf.<sup>1</sup> Stroke iskemik merupakan jenis stroke yang paling umum, mencakup sekitar 80–87% dari seluruh kejadian stroke secara global. Insiden stroke iskemik secara global diperkirakan mencapai 13,7 juta kasus baru setiap tahun, dengan beban penyakit tertinggi ditemukan di negara-negara berpendapatan rendah dan menengah, yang memiliki akses terbatas terhadap layanan kesehatan akut dan rehabilitasi.<sup>25,26</sup>

Faktor risiko utama stroke iskemik meliputi hipertensi, diabetes mellitus, dislipidemia, merokok, fibrilasi atrium, serta gaya hidup tidak sehat seperti kurang aktivitas fisik dan pola makan buruk.<sup>25</sup> Usia juga merupakan faktor risiko penting, dimana lebih dari 75% stroke terjadi pada individu di atas usia 65 tahun, dan prevalensi stroke meningkat signifikan seiring bertambahnya usia.<sup>1</sup> Perbedaan insiden stroke juga terjadi antar jenis kelamin dan etnis, dimana pria memiliki insiden stroke

lebih tinggi secara umum, namun wanita cenderung memiliki mortalitas dan disabilitas yang lebih berat pasca-stroke.<sup>26</sup>

Data epidemiologi dari berbagai wilayah menunjukkan tren penurunan angka insiden stroke di beberapa negara maju, namun peningkatan kasus stroke secara absolut tetap terjadi akibat populasi yang menua dan peningkatan prevalensi faktor risiko kardiovaskular.<sup>25</sup> Di Amerika Serikat, lebih dari 795.000 kasus stroke baru atau berulang terjadi setiap tahun dengan 610.000 merupakan stroke pertama kali. Di wilayah Asia dan Amerika Latin, peningkatan insiden stroke dilaporkan secara signifikan dalam dua dekade terakhir.<sup>1,25-27</sup>

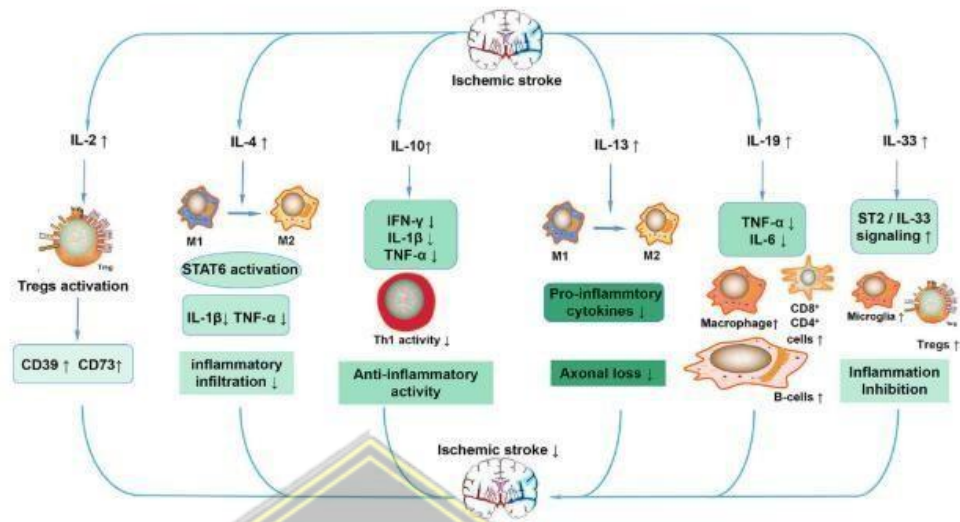
Penanganan stroke iskemik akut menuntut waktu respons yang cepat, karena terapi reperfusi seperti trombolisis dengan recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) dan trombektomi mekanik hanya efektif jika diberikan dalam rentang waktu tertentu (biasanya <4,5 jam untuk trombolisis dan hingga 24 jam untuk trombektomi dengan kriteria khusus). Keterlambatan dalam diagnosis dan pengobatan sering kali menyebabkan hasil klinis yang buruk serta peningkatan beban kecacatan jangka panjang.<sup>1,2,28</sup>

### **2.1.2 Patofisiologi**

Stroke iskemik dimulai dengan oklusi arteri serebral, umumnya arteri serebral media atau *middle cerebral artery* (MCA), yang menyebabkan penurunan suplai oksigen dan nutrisi ke area otak yang terdampak.<sup>29</sup> Penurunan aliran darah tersebut mengganggu homeostasis

ion sel, khususnya disfungsi pompa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase yang mengakibatkan akumulasi ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler.<sup>30</sup> Kenaikan ion  $\text{Ca}^{2+}$  menyebabkan aktivasi jalur kematian sel melalui apoptosis dan nekrosis. Akumulasi glutamat menyebabkan eksitotoksisitas dengan aktivasi reseptor NMDA yang memperparah masuknya kalsium ke dalam neuron.<sup>29,31</sup>

Kerusakan endotel pembuluh darah dan gangguan pada *blood-brain barrier* (BBB) memperparah edema serebral dan infiltrasi sel imun ke jaringan otak. BBB tersusun dari sel endotel yang rapat dengan tight junction yang menjaga permeabilitas molekuler.<sup>32</sup> Pada stroke iskemik, permeabilitas BBB meningkat secara multiphasik: tahap hiperakut ditandai dengan kerusakan hipoksia, diikuti dengan inflamasi akut yang memperburuk permeabilitas dan risiko transformasi hemoragik, serta neoangiogenesis pada tahap subakut yang membantu regenerasi namun dengan permeabilitas yang masih tinggi.<sup>30-32</sup>



**Gambar 2.1** Peran Interleukin pada Stroke Iskemik<sup>5</sup>

Setelah kejadian stroke iskemik, sitokin pro-inflamasi seperti TNF $\alpha$  dan IL1 $\beta$  terlibat dalam proses inflamasi yang memperburuk kerusakan jaringan otak. TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  diproduksi oleh berbagai sel imun, terutama makrofag dan mikroglia, yang teraktivasi setelah gangguan suplai darah ke otak. Salah satu jalur utama yang terlibat dalam proses ini adalah aktivasi makrofag tipe M1, yang lebih banyak memproduksi sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , yang pada gilirannya memperburuk inflamasi dan kerusakan jaringan.<sup>5,6</sup>

Secara khusus, setelah stroke, terjadi perubahan dalam polaritas imun, dengan peningkatan aktivitas makrofag tipe M1 yang berperan dalam produksi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Seperti pada gambar di atas Proses yang terkait dengan peningkatan ekspresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-4, biasanya akan mempromosikan polaritas imun ke arah makrofag

M2 yang lebih antiinflamasi. Aktivasi makrofag tipe ini mengarah pada jalur STAT6, yang berfungsi untuk meningkatkan produksi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  lebih lanjut. Kedua sitokin ini kemudian memperburuk inflamasi, meningkatkan infiltrasi sel imun, dan memperburuk kerusakan neuron melalui proses seperti apoptosis dan eksitotoksisitas.<sup>5,33</sup>

Selain itu, TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  meningkatkan produksi IL-6, yang memperburuk edema serebral dan kerusakan pada *blood-brain barrier* (BBB), sehingga memperburuk kondisi pasca-stroke. Dalam kondisi seperti ini, keseimbangan antara polaritas imun M1 dan M2 menjadi kunci dalam proses penyembuhan atau perburukan, di mana dominasi M1 berkontribusi pada kerusakan jaringan otak dan memperlambat pemulihan. Oleh karena itu, pengaturan terhadap produksi TNF- $\alpha$  dan IL1 $\beta$  dapat membantu mengurangi peradangan yang merusak dan mendukung proses penyembuhan pasca-stroke.<sup>5,24</sup>

### 2.1.3 Dampak Klinis Terhadap Otak

Stroke iskemik menimbulkan kerusakan jaringan otak yang dimulai dari area inti infark (*core*) yang mengalami nekrosis cepat akibat kehilangan suplai darah total.<sup>29</sup> Di sekitar inti ini terdapat area penumbra, jaringan yang mengalami hipoperfusi namun masih dapat diselamatkan jika aliran darah segera dipulihkan.<sup>1</sup> Perkembangan kerusakan jaringan terjadi melalui beberapa mekanisme patofisiologis termasuk

eksitotoksisitas glutamat, stres oksidatif, aktivasi jalur inflamasi, dan disfungsi endotel vaskuler.<sup>30,31</sup>

Pada tingkat klinis, stroke iskemik pada wilayah suplai arteria serebral media (MCA) yang paling umum menyebabkan defisit motorik dan sensorik pada sisi tubuh kontralateral (berlawanan) dengan lesi otak. Pasien biasanya menunjukkan hemiparesis (kelemahan satu sisi), gangguan sensasi, serta dalam kasus stroke hemisfer kiri sering timbul afasia (gangguan bahasa) karena dominasi hemisfer kiri dalam fungsi bahasa.<sup>1,31</sup>

Peradangan yang dipicu oleh sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *Interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ) memperburuk kerusakan jaringan melalui aktivasi sel mikroglia dan infiltrasi leukosit, yang pada gilirannya meningkatkan kerusakan oksidatif dan apoptosis neuron. TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  berperan penting dalam mengatur respons imun dan inflamasi, yang dapat memperburuk cedera otak iskemik. Kedua sitokin ini meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada endotelium, yang mempercepat migrasi sel inflamasi ke dalam jaringan otak yang sedang mengalami iskemia, memperburuk kerusakan jaringan otak.<sup>5,6</sup>

Dampak klinis stroke iskemik meliputi gangguan fungsi motorik, sensorik, kognitif, dan bahasa yang sangat tergantung pada lokasi dan luasnya lesi. Kerusakan neuron dan jaringan neurovaskular

mengakibatkan hilangnya fungsi saraf yang dapat menyebabkan kecacatan permanen, serta meningkatkan risiko kematian.<sup>34</sup> Proses inflamasi dan disfungsi vaskuler yang berlangsung pascastroke menjadi target penting dalam pengembangan terapi neuroprotektif dan regeneratif termasuk pemanfaatan MSC-derived exosomes.<sup>14,35</sup>

## **2.2 Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )**

### **2.2.1 Definisi dan Peran TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  adalah sitokin pro-inflamasi yang juga berperan penting dalam regulasi respons imun tubuh. Seperti IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dihasilkan oleh berbagai sel, termasuk makrofag, mikroglia, dan neutrofil. TNF- $\alpha$  diproduksi dalam dua bentuk: bentuk transmembran (mTNF- $\alpha$ ) yang berfungsi secara lokal dan bentuk larut (sTNF- $\alpha$ ) yang beredar dalam darah. TNF- $\alpha$  bekerja dengan mengikat dua reseptor utama, TNFR1 dan TNFR2, yang menginduksi berbagai jalur sinyal yang mengarah pada aktivasi inflamasi, kematian sel, dan modifikasi fungsi vaskular.<sup>18</sup> TNF $\alpha$  memainkan peran penting dalam mengaktifkan sel-sel imun lain dan mengatur proses peradangan. Sebagai contoh, TNF- $\alpha$  meningkatkan ekspresi sitokin lain seperti IL-6, IL-1 $\beta$ , dan kemokin yang mempromosikan infiltrasi leukosit ke area yang terinfeksi atau terluka. Di samping itu, TNF- $\alpha$  berperan dalam pengaktifan sel endotel dan mikroglia, yang keduanya berperan dalam memperburuk peradangan dan kerusakan jaringan.<sup>5,18</sup>

### 2.2.2 Peran TNF- $\alpha$ pada Stroke Iskemik

Pada stroke iskemik, TNF- $\alpha$  berperan dalam memperburuk kerusakan jaringan otak. Pada fase akut stroke, TNF- $\alpha$  berfungsi untuk mengaktifkan mikroglia dan makrofag yang menghasilkan lebih banyak TNF- $\alpha$  dan sitokin pro-inflamasi lainnya. Selain itu, TNF- $\alpha$  dapat menyebabkan disfungsi *blood-brain barrier* (BBB), meningkatkan permeabilitasnya dan memungkinkan infiltrasi lebih banyak sel imun dan zat yang merusak ke dalam jaringan otak yang terinfeksi.<sup>18,19</sup> Studi pada model hewan menunjukkan bahwa TNF- $\alpha$  berperan dalam meningkatkan apoptosis neuron di area yang terpengaruh oleh stroke. TNF- $\alpha$  melalui jalur TNFR1 mengaktifkan berbagai enzim yang memicu kematian sel, memperburuk kerusakan otak yang sudah terjadi. Penurunan kadar TNF $\alpha$ , baik melalui penghambatan reseptor TNF atau melalui intervensi farmakologis lainnya, dapat mengurangi kerusakan jaringan otak dan memperbaiki prognosis stroke.<sup>6</sup>

### 2.3 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

#### 2.3.1 Definisi dan Peran IL-1 $\beta$

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) adalah sitokin pro-inflamasi yang berperan penting dalam modulasi respon imun tubuh, terutama dalam proses inflamasi. IL-1 $\beta$  diproduksi oleh berbagai sel imun, termasuk makrofag, mikroglia, dan sel dendritik, sebagai reaksi terhadap infeksi atau cedera jaringan. IL-1 $\beta$  diproduksi dalam bentuk tidak aktif yang disebut proIL1 $\beta$ , yang kemudian diproses oleh enzim caspase-1 untuk menjadi

bentuk aktif yang berfungsi sebagai mediator inflamasi.<sup>20,21</sup> Setelah diaktifkan, IL-1 $\beta$  berikatan dengan reseptor IL-1 (IL-1RI) yang ditemukan pada permukaan berbagai jenis sel, termasuk sel endotel, makrofag, dan sel glial. Ikatan ini memicu pengaktifan jalur sinyal yang melibatkan NF- $\kappa$ B dan MAPK, yang mengarah pada produksi sitokin pro-inflamasi lain seperti IL-6, TNF- $\alpha$ , dan berbagai molekul adesi seperti ICAM-1 dan VCAM-1.<sup>5</sup>

IL-1 $\beta$  berfungsi dalam beberapa tahap peradangan, termasuk peningkatan permeabilitas vaskular yang memfasilitasi infiltrasi leukosit ke dalam jaringan yang terluka. Selain itu, IL-1 $\beta$  juga berperan dalam meningkatkan ekspresi molekul adesi dan menginduksi migrasi neutrofil ke area yang rusak. Aktivasi ini adalah kunci dalam mempertahankan dan memperpanjang reaksi inflamasi di lokasi cedera.<sup>21</sup>

### **2.3.2 Peran IL-1 $\beta$ pada Stroke Iskemik**

Stroke iskemik terjadi ketika aliran darah ke otak terganggu, menyebabkan hipoksia dan kerusakan jaringan. Proses inflamasi yang dipicu oleh stroke berperan besar dalam memperburuk kerusakan otak dan memperburuk prognosis pasien. IL-1 $\beta$ , sebagai salah satu sitokin utama dalam proses inflamasi, memiliki peran yang sangat signifikan dalam patofisiologi stroke iskemik.<sup>22</sup> Penelitian menunjukkan bahwa setelah stroke iskemik, level IL-1 $\beta$  meningkat secara signifikan di otak. IL-1 $\beta$  diproduksi terutama oleh mikroglia yang teraktivasi dan sel-sel sistem imun lainnya yang terlibat dalam respons inflamasi. Peningkatan

kadar IL-1 $\beta$  ini berperan dalam memperburuk kerusakan otak dengan cara memicu reaksi peradangan yang melibatkan aktivasi sel glial dan leukosit yang menghasilkan ROS (*reactive oxygen species*), yang menyebabkan kerusakan tambahan pada jaringan otak.<sup>23</sup>

IL-1 $\beta$  juga diketahui meningkatkan permeabilitas *blood-brain barrier* (BBB), yang memungkinkan masuknya lebih banyak sel inflamasi dan molekul berbahaya ke dalam jaringan otak yang rusak. Efek ini menyebabkan pembengkakan (edema) otak dan memperburuk kondisi stroke. Selain itu, IL-1 $\beta$  berperan dalam aktivasi apoptosis sel saraf yang terpengaruh, yang memperburuk kerusakan jaringan dan meningkatkan luas infark.<sup>5,24</sup>

#### **2.4 TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ pada Stroke Iskemik**

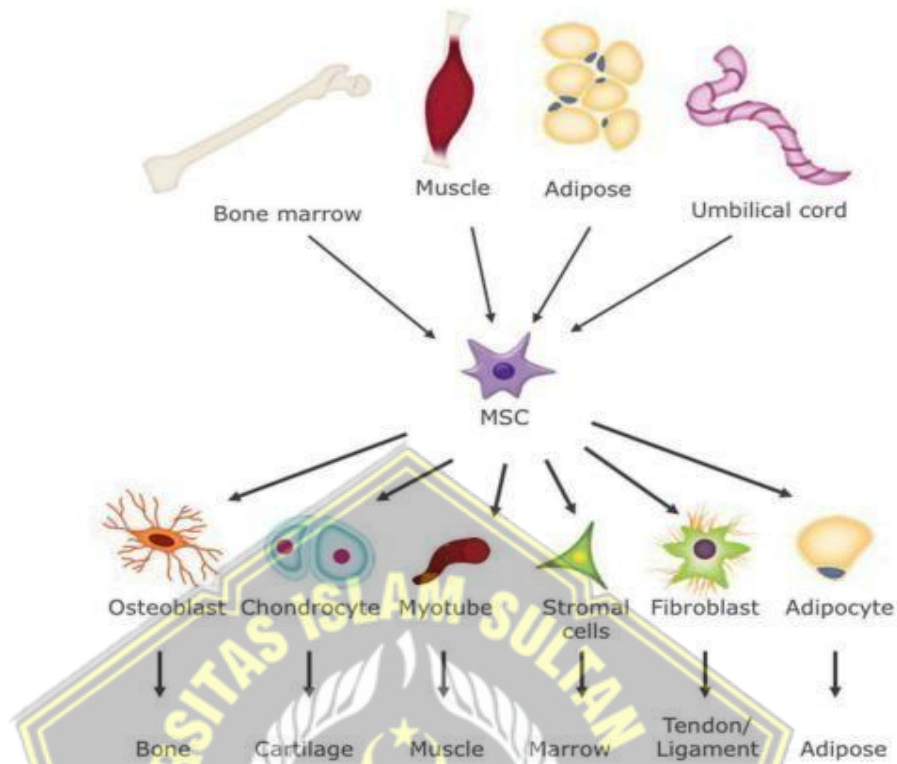
IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  berperan dalam respons inflamasi yang berkembang setelah stroke iskemik. Keduanya berfungsi melalui jalur yang saling berkaitan untuk memperburuk kerusakan otak. Setelah stroke, baik IL-1 $\beta$  maupun TNF $\alpha$  merangsang produksi sitokin lain, seperti IL-6 dan IL-8, serta molekul adesi yang meningkatkan migrasi leukosit ke lokasi yang terluka. Aktivasi ini memperpanjang dan memperburuk inflamasi di otak yang berkontribusi pada pembengkakan dan kematian neuron.<sup>20,21</sup> Selain itu, TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  meningkatkan permeabilitas *blood-brain barrier*, yang memungkinkan lebih banyak sel inflamasi dan molekul berbahaya masuk ke jaringan otak. Keduanya juga berperan dalam mengaktivasi mikroglia dan makrofag yang melepaskan

ROS dan zat-zat pro-inflamasi lainnya yang menyebabkan kerusakan lebih lanjut pada sel-sel otak yang belum mati.<sup>5,6</sup> Di sisi lain, meskipun TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  memiliki efek merusak yang besar pada fase akut stroke, penurunan kadar sitokin ini melalui terapi dapat mengurangi kerusakan dan memperbaiki fungsi neurologis pada model tikus stroke.<sup>19,20,23</sup>

## **2.5 Mesenchymal Stem Cells (MSC)**

### **2.5.1 Definisi dan Karakteristik**

*Mesenchymal stem cells* (MSCs) adalah sel punca multipoten yang berasal dari berbagai jaringan mesenkimal seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, tali pusat, dan cairan amnion. MSCs memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel termasuk osteoblas, kondrosit, dan adiposit.<sup>36</sup> Selain kemampuan diferensiasinya, MSCs juga dikenal luas karena sifat imunomodulator dan efek regeneratif yang dimediasi oleh sekresi berbagai faktor parakrin, termasuk eksosom.<sup>37</sup>



**Gambar 2.2** Sumber *Mesenchymal stem cells (MSCs)*<sup>38</sup>

Eksosom merupakan sub tipe vesikula ekstraseluler atau *extracellular vesicles (EVs)* yang memiliki ukuran kecil (40–150 nm), dibentuk melalui mekanisme endosomal yang menghasilkan *multivesicular bodies (MVB)* dan dilepaskan ke ruang ekstraseluler melalui eksositosis.<sup>39,40</sup> Eksosom mengandung berbagai muatan bioaktif seperti protein, lipid, mRNA, microRNA, dan DNA fragment yang mencerminkan kondisi dan fungsi sel asalnya. Kandungan ini memungkinkan eksosom berfungsi sebagai mediator komunikasi antar sel dan memainkan peran penting dalam perbaikan jaringan, modulasi imun, dan homeostasis seluler.<sup>36,41</sup>

Eksosom MSC menunjukkan profil molekuler yang khas, seperti ekspresi tetraspanin CD9, CD63, dan CD81, serta protein terkait endosom seperti Alix dan TSG101.<sup>40</sup> Tidak seperti terapi berbasis sel utuh, eksosom MSC tidak memiliki inti sel atau DNA utuh, sehingga tidak menimbulkan risiko tumorigenik, emboli mikrovaskular, atau reaksi imunologis berat, menjadikannya kandidat unggul dalam terapi regeneratif berbasis pendekatan non-seluler.<sup>36,42</sup>

### **2.5.2 Potensi Terapi Stroke Iskemik dengan MSC-Derived secretome**

Pada kondisi stroke iskemik, *MSC-derived secretomes* menunjukkan efek neuroprotektif yang kuat melalui berbagai mekanisme termasuk penekanan inflamasi, reduksi stres oksidatif, stimulasi neurogenesis, dan peningkatan angiogenesis.<sup>43</sup> Eksosom ini mampu melintasi sawar darah otak dan mengantarkan muatan terapeutik ke area iskemik secara efektif tanpa menginduksi respon imun yang merugikan.<sup>37,44</sup>

Penelitian menunjukkan bahwa efek terapeutik MSC setelah stroke sebagian besar dimediasi oleh eksosom yang disekresikannya, bukan oleh sel itu sendiri. Eksosom berperan dalam memperbaiki lingkungan mikro jaringan yang rusak melalui penghantaran miRNA, protein angiogenik, dan molekul imunoregulatorik.<sup>39,43</sup>

MSC secara umum bekerja melalui efek parakrin yakni pelepasan sikotik-sitokin anti inflamasi diantaranya yang berkaitan dengan penekanan TNF- $\alpha$  & IL-1 $\beta$  adalah Prostaglandin E2 (PGE2) dan

TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene 6) yang bekerja menekan **NF-κB**, serta melalui pelepasan TGF-β yang selanjutnya membantu dalam mekanisme polarisasi Makrofag (M2-M1). Makrofag 2 diketahui berfungsi dalam anti inflamasi, sedangkan makrofag 1 berperan sebagai pro inflamator. MSC juga menekan kadar TNF-α & IL-1β melalui pelepasan miR, diantaranya miR-146a, miR 124, miR 21, miR-223 dan HO-1.

*Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (UC-MSCs) merupakan sumber MSC yang banyak digunakan dalam penelitian stroke, terutama melalui pemberian eksosom yang dihasilkan oleh sel-sel ini. Eksosom dari UC-MSCs terbukti dapat mengurangi area infark serebral, meningkatkan skor fungsi neurologis, dan diharapkan dapat memodulasi ekspresi TNF-α dan IL-1β, dua sitokin pro-inflamasi yang berperan penting dalam memperburuk kerusakan jaringan otak setelah stroke.<sup>45</sup> TNF-α dan IL-1β berfungsi dalam mengatur respons inflamasi, namun keduanya juga berkontribusi pada kerusakan jaringan akibat inflamasi yang berlebihan. Eksosom UC-MSCs dapat mengatur ekspresi sitokinsitokin ini, yang mendukung pemulihan dan perbaikan jaringan otak

Dengan cara ini, eksosom UC-MSCs juga melindungi otak dari kerusakan lebih lanjut akibat hipoksia dan inflamasi. Secara keseluruhan, eksosom dari UC-MSCs menunjukkan potensi besar sebagai terapi

nonseluler yang memberikan manfaat neuroprotektif dan angiogenik, serta mengatasi ke terbatasan terapi

berbasis sel pada stroke iskemik.<sup>46,47</sup>

### 2.5.3 *Preconditioning* Hipoksia Pada MSC

*Preconditioning* hipoksia merupakan strategi kultur yang meniru kondisi oksigen rendah pada lingkungan fisiologis *mesenchymal stem cells* (MSC) di jaringan asalnya, seperti sumsum tulang atau jaringan adiposa. Kondisi kultur normoksia konvensional di laboratorium (sekitar 21% O<sub>2</sub>) jauh lebih tinggi dibandingkan kadar oksigen *in vivo* (1–9% O<sub>2</sub>), sehingga dapat memicu stres oksidatif, mempercepat penuaan sel, dan menurunkan potensi terapeutiknya.<sup>48</sup> Dengan menurunkan kadar oksigen kultur menjadi 0,5–5% O<sub>2</sub>, MSC akan mengaktifkan mekanisme adaptif yang dimediasi oleh *hypoxia-inducible factors* (HIF), khususnya HIF-1 $\alpha$  dan HIF-2 $\alpha$ . Protein ini terakumulasi di inti sel dan menginduksi transkripsi ratusan gen yang terlibat dalam angiogenesis, metabolisme energi, proliferasi, migrasi, diferensiasi, perlindungan terhadap apoptosis, serta modulasi respons imun. Akibatnya, MSC yang dikondisikan pada hipoksia menunjukkan peningkatan proliferasi, ketahanan hidup, dan kemampuan bermigrasi menuju lokasi cedera melalui aktivasi jalur sinyal seperti PI3K/Akt dan MAPK/ERK, disertai peningkatan ekspresi faktor siklus sel seperti Cyclin D1 dan Cyclin E.<sup>49</sup>

*Hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells* (HUCMSCs) menunjukkan potensi besar dalam memodulasi respon inflamasi ini. Preconditioning hipoksia pada HUC-MSCs meningkatkan kemampuan sel untuk bertahan dalam kondisi stres oksidatif dan hipoksia. MSC yang diberi prekondisi hipoksemia ini menunjukkan kemampuan lebih kuat dalam menekan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dengan efek parakrin, serta pelepasan eksosom, dan aktivasi HIF-1 $\alpha$  yang memperkuat efek anti inflamasi. Penekanan produksi kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  oleh HUC-MSc melalui beberapa mekanisme, diantaranya penekanan jalur NF- $\kappa$ B, dan NLRP3, serta mengubah M1 (pro inflamasi) menjadi M2 (anti inflamasi)

Pada kondisi hipoksia khususnya seperti HUC-MSC, kemudian mengaktivasi HIF-1 $\alpha$  dan selanjutnya memperkuat efek-efek yang ditimbulkan MSC. HIF-1 $\alpha$  juga meningkatkan pertahanan hidup MSC di keadaan stress oksidatif. Aktivasi HIF-1 $\alpha$ , meningkatkan pelepasan IL10, TGF- $\beta$ , HGF, PGE2 yang berefek anti inflamasi, meningkatkan pelepasan VEGF di endotel dan selanjutnya meningkatkan angiogenesis. Namun hal ini tidak dapat diperoleh pada MSC endogen karena MSC naïve cenderung mati akibat ketidaksiapan terhadap kondisi hipoksemia.

Kondisi hipoksia juga memodulasi multipotensi MSC secara selektif, umumnya meningkatkan kecenderungan diferensiasi kondrogenik, menekan adipogenesis, serta pada beberapa kondisi menghambat atau mengubah pola osteogenesis. Lebih

jauh, preconditioning hipoksia terbukti memperkuat aktivitas parakrin MSC, yang diwujudkan dalam peningkatan sekresi *secretome* baik berupa faktor terlarut maupun vesikel ekstraseluler (EV) seperti eksosom.<sup>48</sup> EV yang dihasilkan MSC hipoksia mengandung komponen bioaktif yang lebih kaya faktor angiogenik, anti-apoptotik, dan imunomodulator dibandingkan EV normoksia, sehingga memiliki potensi regeneratif yang lebih tinggi. Pada uji in vitro, EV MSC hipoksia mampu merangsang pembentukan pembuluh darah baru (*tube formation*) secara lebih efektif dibandingkan EV normoksia.<sup>49,50</sup>

Manfaat preconditioning hipoksia juga terbukti pada model *oxyglucose deprivation* (OGD) yang meniru stroke iskemik. Medium terkondisi dari MSC hipoksia (*hypoCM*) menunjukkan efek protektif yang signifikan terhadap neuron, mempertahankan viabilitas dan morfologi sel saraf lebih baik dibandingkan medium dari MSC normoksia. Efek ini sebagian besar dimediasi oleh peningkatan sekresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), terbukti dari hilangnya efek neuroprotektif ketika reseptor VEGF diblokade. Dengan demikian, preconditioning hipoksia tidak hanya mengoptimalkan kemampuan MSC sebagai agen terapi berbasis sel, tetapi juga meningkatkan potensi aplikasi eksosom atau *secretome*-nya sebagai terapi bebas sel (*cell-free therapy*). Pendekatan ini menjadi salah satu strategi penting untuk meningkatkan efektivitas terapi regeneratif, termasuk pada penanganan

stroke iskemik, dengan potensi dosis sel yang lebih rendah namun manfaat biologis yang lebih tinggi.<sup>49,51</sup>

## 2.6 Mekanisme Kerja MSC pada Kondisi Stroke

*Mesenchymal Stem Cells* (MSC) merupakan sel multipoten yang memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, bersifat imunomodulator, serta mampu mensekresikan faktor trofik yang berperan penting dalam proses perbaikan jaringan saraf pasca stroke iskemik. Setelah terjadinya stroke, jaringan otak yang mengalami iskemia akan melepaskan sinyal kemotaktik seperti *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) yang berikatan dengan reseptor *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4) pada permukaan MSC. Interaksi ini memfasilitasi migrasi MSC menuju area penumbra iskemik dan zona subventrikular sebagai langkah awal untuk memberikan efek terapeutik secara lokal. Sesampainya di area cedera, MSC akan mensekresikan berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin seperti *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), dan *hepatocyte growth factor* (HGF) yang dapat merangsang neurogenesis dan angiogenesis, menghambat apoptosis neuron, serta mendukung regenerasi akson dan sinaps.<sup>52,53</sup>

Selain itu, MSC juga mampu memodulasi respons imun dengan menekan aktivasi mikroglia proinflamasi (M1) dan mendorong polaritas mikroglia ke arah antiinflamasi (M2), mengurangi produksi sitokin proinflamasi seperti

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, dan IFN- $\gamma$ , serta meningkatkan jumlah sel T regulator (Treg) untuk menjaga keseimbangan respons imun. Melalui aktivasi jalur survival neuron seperti PI3K/Akt dan MAPK/ERK, MSC dapat menekan sinyal proapoptosis, memperbaiki integritas *blood-brain barrier* (BBB), dan merangsang aktivasi sel punca neural endogen untuk regenerasi jaringan.<sup>52-54</sup>

Proses angiogenesis juga difasilitasi melalui sekresi faktor proangiogenik seperti VEGF dan angiopoietin, yang membantu pemulihan suplai darah ke jaringan iskemik. Selain bekerja melalui keberadaan sel utuh, MSC juga melepaskan eksosom yang mengandung microRNA, protein, dan faktor bioaktif lain yang mampu menembus BBB dan memberikan efek antiinflamasi, neuroprotektif, serta angiogenik. Peningkatan efektivitas MSC dapat dicapai melalui strategi *hypoxic preconditioning*, yang terbukti mampu meningkatkan ekspresi faktor angiogenik, kemampuan migrasi, dan ketahanan terhadap stres oksidatif. Dengan demikian, MSC bekerja secara multifaktorial melalui kombinasi migrasi ke area cedera, sekresi faktor neurotropik, modulasi imun, angiogenesis, dan stimulasi perbaikan jaringan endogen, yang secara keseluruhan berpotensi mengurangi ukuran infark, memperbaiki fungsi neurologis, dan meningkatkan kualitas hidup pasien pasca stroke.<sup>55,56</sup>

## **2.7 Pengaruh *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUC-MSCs)**

*Umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUC-MSCs) merupakan salah satu sumber MSC yang menjanjikan karena memiliki kapasitas proliferasi tinggi, potensi diferensiasi multipel, serta profil imunogenisitas rendah. Seperti halnya

MSC dari sumber lain, hUC-MSCs juga menunjukkan efek terapeutik yang besar melalui mekanisme parakrin dan modulasi imun.<sup>45</sup> Namun, efektivitasnya dapat ditingkatkan melalui strategi *hypoxic preconditioning*, yaitu pemeliharaan sel dalam kondisi oksigen rendah (1–5% O<sub>2</sub>) untuk meniru mikro-lingkungan fisiologis jaringan asalnya. Kondisi ini menginduksi aktivasi *hypoxia-inducible factors* (HIF), yang selanjutnya mengatur ekspresi gen-gen terkait, proliferasi, migrasi, dan angiogenesis terutama regulasi respons imun. Berbagai studi telah menunjukkan bahwa preconditioning hipoksia dapat memperkuat sifat imunomodulator hUC-MSCs, termasuk dalam pengendalian ekspresi sitokin proinflamasi seperti tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dan interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).<sup>49,51</sup>



## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Teori

Pada fase akut stroke iskemik (72 jam pertama, jaringan otak mengalami hipoksia berat dan iskemia akibat kekurangan pasokan oksigen dan energi. Keadaan ini memicu kondisi inflamasi lebih lanjut melalui aktivasi mikroglia dan astrosit yang selanjutnya memicu produksi TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Keduanya merupakan sitokin pro inflamasi yang memperburuk kondisi jaringan otak. TNF $\alpha$  memicu aktivasi *NF- $\kappa$ B* dan meningkatkan apoptosis neuron dan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak (BBB).

ROS ini mengaktifkan jalur *NF- $\kappa$ B*, yang selanjutnya meningkatkan sekresi sitokin proinflamasi, terutama TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Kedua sitokin ini, sebagai karakter utama dalam proses inflamasi, berperan penting dalam memperburuk peradangan dan kerusakan jaringan otak. Peningkatan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  mengarah pada pembesaran area iskemik dan memperlambat proses pemulihan otak, serta berkontribusi pada kerusakan lebih lanjut akibat peradangan yang berkepanjangan.

Pada stroke iskemik, gangguan aliran darah ke jaringan otak menyebabkan hipoksia yang mengaktifkan factor transkripsi HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha). Area yang mengalami hipoksia pada otak kemudian menginduksi HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  diaktivasi oleh astrosit dan mikroglia untuk

memodulasi inflamasi, serta diinduksi oleh MSc endogen yang berkontribusi dalam perbaikan jaringan melalui sekresi factor anti inflamasi serta penghambatan **NF-κB** sehingga menekan produksi **TNF-α dan IL-1β**. HIF1α juga disisi lain juga meningkatkan ketahanan hidup MSC di lingkungan stress oksidatif, dan kemudian memicu efek parakrin dari MSc dan pelepasan eksosom yang lebih lanjut berfungsi sebagai anti inflamasi. HIF-1α juga berperan dalam regenerasi jaringan otak melalui proses angiogenesis melalui pelepasan VEGF.

*Hypoxic preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells* (HUCMSCs) menunjukkan potensi besar dalam memodulasi respon inflamasi ini. Preconditioning hipoksia pada HUC-MSCs meningkatkan kemampuan sel untuk bertahan dalam kondisi stres oksidatif dan hipoksia. MSC yang diberi prekondisi hipoksemia ini menunjukkan kemampuan lebih kuat dalam menekan kadar TNF-α dan IL-1β dengan efek parakrin, serta pelepasan eksosom, dan aktivasi HIF-1α yang memperkuat efek anti inflamasi. Penekanan produksi kadar TNF-α dan IL-1β oleh HUC-MSc melalui beberapa mekanisme, diantaranya penekanan jalur NF-κB, dan NLRP3, serta mengubah M1 (pro inflamasi) menjadi M2 (anti inflamasi)

MSC secara umum bekerja melalui efek parakrin yakni pelepasan sikotik-sitokin anti inflamasi diantaranya yang berkaitan dengan penekanan TNF-α & IL-1β adalah Prostaglandin E2 (PGE2) dan TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene 6) yang bekerja menekan **NF-κB**, serta melalui pelepasan

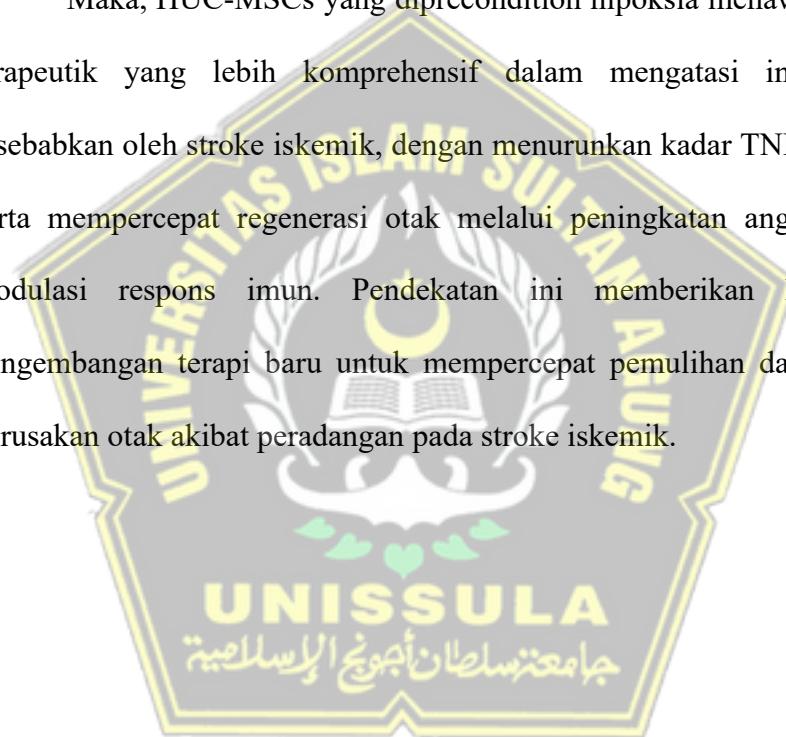
TGF- $\beta$  yang selanjutnya membantu dalam mekanisme polarisasi Makrofag (M2-M1). Makrofag 2 diketahui berfungsi dalam anti inflamasi, sedangkan makrofag 1 berperan sebagai pro inflamator. MSC juga menekan kadar TNF- $\alpha$  & IL-1 $\beta$  melalui pelepasan miR, diantaranya miR-146a, miR 124, miR 21, miR223 dan HO-1.

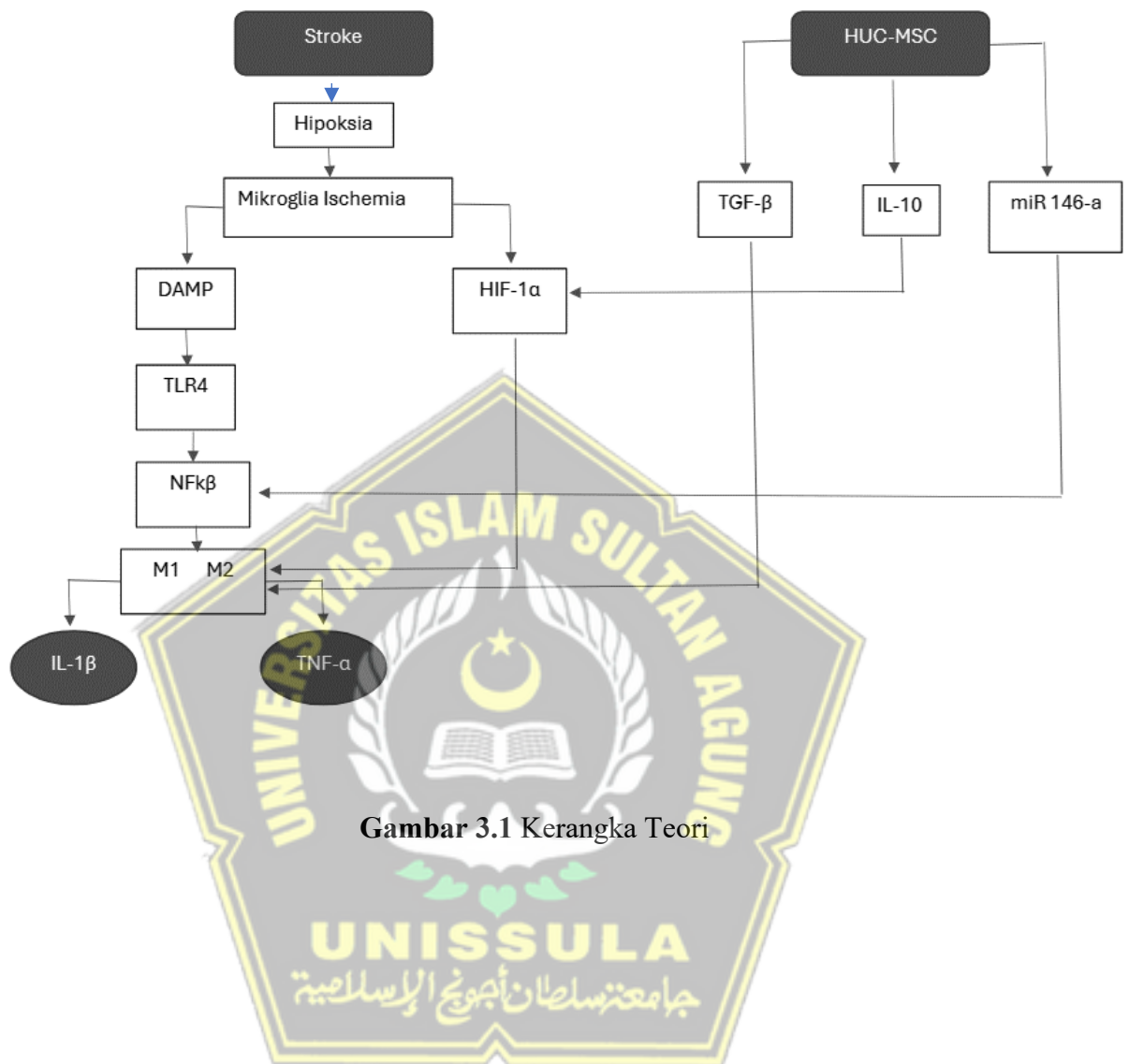
Pada kondisi hipoksia khususnya seperti HUC-MSCs, kemudian mengaktivasi HIF-1 $\alpha$  dan selanjutnya memperkuat efek-efek yang ditimbulkan MSC. HIF-1 $\alpha$  juga meningkatkan pertahanan hidup MSC di keadaan stress oksidatif. Aktivasi HIF-1 $\alpha$ , meningkatkan pelepasan IL-10, TGF- $\beta$ , HGF, PGE2 yang berefek anti inflamasi, meningkatkan pelepasan VEGF di endotel dan selanjutnya meningkatkan angiogenesis. Namun hal ini tidak dapat diperoleh pada MSC endogen karena MSC naïve cenderung mati akibat ketidaksiapan terhadap kondisi hipoksemia.

Selain efek imunomodulasi, HUC-MSCs yang *diprecondition* hipoksia juga memiliki peran dalam memperbaiki jaringan otak melalui peningkatan angiogenesis. HUC-MSCs meningkatkan ekspresi faktor induksi hipoksia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), yang mengatur produksi platelet-derived growth factor (PDGF), yang penting dalam merangsang pembentukan pembuluh darah baru. Pembentukan pembuluh darah baru ini sangat penting untuk memperbaiki aliran darah dan menyediakan oksigen ke area otak yang mengalami iskemia, mendukung proses regenerasi jaringan otak.

Keunggulan HUC-MSCs yang diprecondition hipoksia dibandingkan dengan terapi berbasis eksosom atau secretome terletak pada kemampuan mereka untuk menghasilkan mediator bioaktif. Mediator ini tidak hanya membantu menekan peradangan, tetapi juga mengatur sistem imun dan memperbaiki jaringan. PGE2 berperan dalam menghambat rekrutmen sel-sel imun inflamasi.

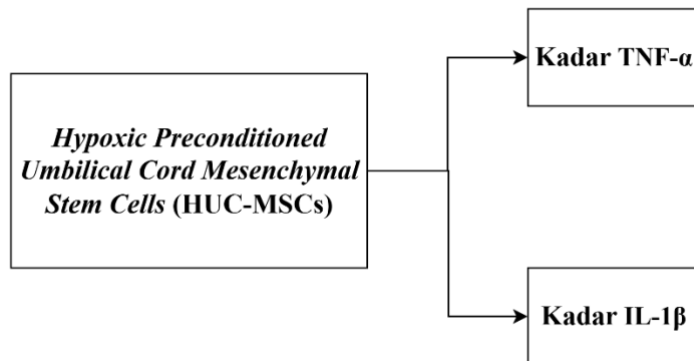
Maka, HUC-MSCs yang diprecondition hipoksia menawarkan potensi terapeutik yang lebih komprehensif dalam mengatasi inflamasi yang disebabkan oleh stroke iskemik, dengan menurunkan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , serta mempercepat regenerasi otak melalui peningkatan angiogenesis dan modulasi respons imun. Pendekatan ini memberikan harapan bagi pengembangan terapi baru untuk mempercepat pemulihan dan mengurangi kerusakan otak akibat peradangan pada stroke iskemik.





Gambar 3.1 Kerangka Teori

### 3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep.

### 3.3 Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (HUC-MSCs)* terhadap kadar TNF- $\alpha$  pada stroke iskemik akut.

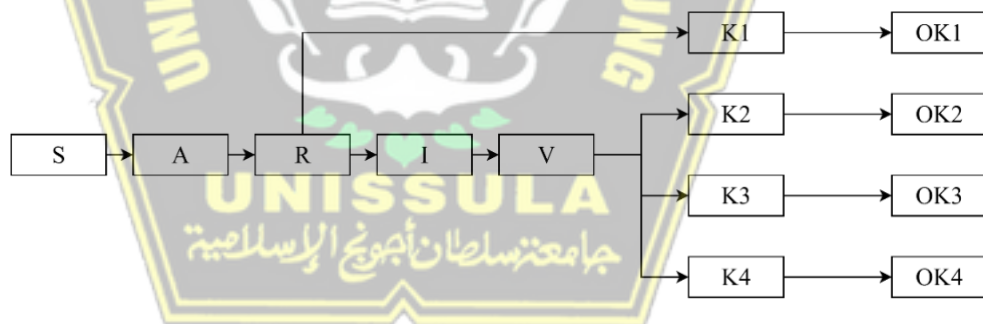
Terdapat pengaruh pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (HUC-MSCs)* terhadap kadar IL-1 $\beta$  pada stroke iskemik akut.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* dengan desain *Post Test Only Control Group Design*, menggunakan model tikus stroke iskemik akut. Rancangan penelitian yang diterapkan adalah *Rancangan Acak Lengkap* (RAL), yang terdiri dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan akan diberikan *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (HUC-MSCs)* sedangkan kelompok kontrol akan diberi perlakuan standar. Setelah pemberian perlakuan, kedua kelompok akan dievaluasi untuk mengukur kadar sebagai biomarker proinflamasi.



**Gambar 4.1** Skema Rancangan Penelitian

**Keterangan:**

1. S: Sampel
2. R: Randomisasi
3. I: Induksi Stroke
4. V: Validasi Stroke

5. K1: Kelompok kontrol sehat (tikus tidak diinduksi stroke iskemik dan tidak diberikan terapi)
6. K2: Kelompok kontrol negatif (tikus diinduksi stroke iskemik tapi tidak diberikan terapi)
7. K3: Kelompok perlakuan tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi HUC-MSCs dengan dosis  $1,5 \times 10^6$  sel
8. K4: Kelompok perlakuan tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi HUC-MSCs dengan dosis  $3 \times 10^6$  sel
9. OK1: Observasi kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada kelompok K1. 10. OK2: Observasi kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada kelompok K2.
11. OK3: Observasi kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada kelompok K3.
12. OK4: Observasi kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada kelompok K4.

## 4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.2.1 Variabel Penelitian

#### 4.2.1.1 Variabel Bebas

Pemberian *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord*

*Mesenchymal Stem Cells* (HUC-MSCs) dengan dua dosis berbeda, yaitu dosis  $1,5 \times 10^6$  sel (K3) dan dosis  $3 \times 10^6$  sel (K4).

#### 4.2.1.2 Variabel Terikat

- 1) Kadar TNF- $\alpha$  yang diukur dalam serum darah tikus. Satuan: pg/mL.
- 2) Kadar IL-1 $\beta$  yang diukur dalam serum darah tikus. Satuan: pg/mL.

## 4.2.2 Definisi Operasional

### 4.2.2.1 HUC-MSCs

HUC-MSCs adalah sel punca mesenkimal yang diperoleh dari tali pusat tikus Wistar yang telah diperlakukan dengan kondisi hipoksia sebelum diberikan sebagai terapi. Dalam penelitian ini, HUC-MSCs digunakan untuk mengatasi stroke iskemik dengan tujuan untuk memodulasi respons imun dan merangsang proses regenerasi jaringan otak melalui peningkatan angiogenesis. Keberadaan dan efek dari terapi ini dapat diamati melalui pengukuran biomarker yang terkait dengan inflamasi dan perbaikan jaringan. Dua dosis HUC-MSCs yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1,5 juta sel dan 3 juta sel, yang dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya.

Skala :Nominal

### 4.2.2.2 Kadar TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  adalah sitokin proinflamasi yang berperan dalam regulasi sistem imun dan peradangan tubuh. Dalam konteks stroke iskemik, peningkatan kadar TNF- $\alpha$  menunjukkan adanya inflamasi akut yang dapat memperburuk kerusakan otak. Pengukuran kadar TNF- $\alpha$  dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode ELISA, yang dilakukan pada sampel serum

darah tikus Wistar yang telah diambil pada hari ke-3 setelah perlakuan dan terminasi.

Satuan : pg/mL (pikogram/mL)

Skala : Rasio

#### 4.2.2.3 Kadar IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  adalah sitokin proinflamasi yang berperan dalam pengaturan inflamasi dan pengaktifan respon imun. Dalam penelitian ini, IL-1 $\beta$  diukur untuk menilai pengaruh pemberian HUC-MSCs terhadap pengendalian inflamasi setelah stroke iskemik. Pengukuran IL-1 $\beta$  dilakukan dengan menggunakan metode ELISA, dengan sampel tikus Wistar pada hari ke-3 setelah pemberian terapi.

Satuan : pg/mL (pikogram/mL)

Skala : Rasio

### 4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

#### 4.3.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar yang telah dinyatakan memenuhi syarat untuk digunakan dalam penelitian oleh dokter hewan dari Animal House di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia, Semarang.

### 4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini terdiri dari tikus jantan galur Wistar berusia 6–8 minggu dan dengan berat badan 180–220 gram. Tikus dipelihara dalam kondisi lingkungan yang terkontrol dengan suhu 22°C–24°C, ventilasi baik, dan pencahayaan yang sesuai. Pakan standar pellet dan air minum disediakan secara bebas. Sebelum perlakuan diberikan, tikus-tikus ini menjalani periode adaptasi selama 7 hari untuk memastikan kenyamanan dan stabilitas kondisi fisik mereka.

#### 4.3.1.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan Wistar, berusia 6–8 minggu dengan berat badan 180–220 gram.
2. Tikus yang bebas dari penyakit dan gangguan kesehatan atau infeksi.
3. Tikus yang telah menjalani periode adaptasi di laboratorium selama 7 hari.

#### 4.3.1.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang tidak menunjukkan tanda-tanda stroke setelah prosedur induksi.
2. Tikus yang menunjukkan gejala gangguan kesehatan atau infeksi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.
3. Tikus yang tidak memenuhi kriteria fisik atau berat badan yang diperlukan untuk penelitian.

#### 4.3.1.3 Kriteria *Dropout*

1. Tikus yang mengalami kematian selama masa penelitian.
2. Tikus yang mengalami gangguan fisik atau infeksi yang menghalangi evaluasi penelitian.
3. Tikus yang menunjukkan tanda-tanda stres berat atau sakit yang mengganggu kelangsungan penelitian.

#### 4.4 Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan teknik *simple random sampling* untuk memilih sampel. Sebanyak 28 ekor tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi akan dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yang terdiri dari 7 tikus per kelompok. Kelompok-kelompok ini terdiri dari dua kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan.

#### 4.5 Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung berdasarkan sampel eksperimental dari Federer.

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

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

$$3 (n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18 \quad n \geq 6+1 \text{ ( tikus wistar substitusi)}$$

Sehingga sampel yang digunakan adalah 7 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak. Dibagi menjadi 4 kelompok sehingga jumlahnya adalah 30 ekor tikus.

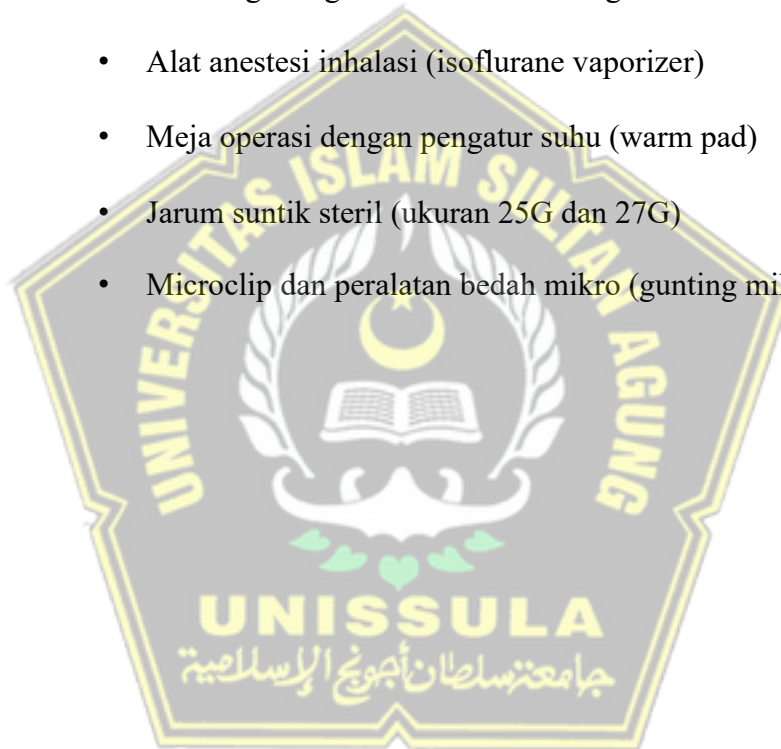
## 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.6.1 Alat

#### 4.6.1.1 Alat untuk Persiapan dan Perlakuan Hewan Model Stroke

Iskemik

- Kandang hewan laboratorium dengan ventilasi baik dan kontrol suhu
- Timbangan digital untuk menimbang tikus
- Alat anestesi inhalasi (isoflurane vaporizer)
- Meja operasi dengan pengatur suhu (warm pad)
- Jarum suntik steril (ukuran 25G dan 27G)
- Microclip dan peralatan bedah mikro (gunting mikro, pinset, pisau bedah)



*Laser Doppler flowmeter* dengan probe optik untuk monitoring *cerebral blood flow* (CBF)

- Termometer rektal untuk monitoring suhu tubuh tikus
- Jarum suntik steril dan tabung mikro untuk pengambilan darah vena ekor
- Alat sterilisasi (autoclave, alkohol 70%, kapas steril)

#### 4.6.1.2 Alat untuk Kultur Sel dan Isolasi MSC

- Biosafety Cabinet kelas II untuk sterilisasi dan isolasi sel
- CO<sub>2</sub> Incubator (suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- Mikroskop inverted untuk observasi kultur sel
- Sentrifuge dengan kemampuan pengaturan kecepatan dan suhu
- Mikropipet dengan berbagai ukuran (1–1000 µL) dan tips steril
- Flask kultur sel, cawan kultur, tabung sentrifugasi steril
- Shaker dan pH meter
- Alat ultracentrifugasi atau *Tangential Flow Filtration* (TFF) dengan membran 100 kDa
- Peralatan validasi (*Flow Cytometer, Transmission Electron Microscope/TEM*)

#### 4.6.1.3 Alat untuk Analisis Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$

- Microplate Reader untuk pembacaan absorbansi ELISA (pada panjang gelombang 450 nm)
- Mikropipet dan tips steril
- Tabung mikro untuk reaksi ELISA

- Inkubator suhu kamar
- Peralatan pencucian pelat ELISA

#### 4.6.2 Bahan

##### 4.6.2.1 Bahan untuk Kultur dan Isolasi BMSC

- Minimum Essential Medium  $\alpha$  (MEM  $\alpha$ )
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Penicillin-Streptomycin
- PBS (Phosphate Buffered Saline) steril
- Trypsin-EDTA 0,25%
- Larutan detachment untuk pemisahan sel

##### 4.6.2.2 Bahan untuk Isolasi dan Validasi MSC

- Media serum-free atau bebas eksosom untuk pengumpulan conditioned medium
- Buffer untuk ultracentrifugasi / filtrasi (PBS steril)
- Larutan blocking dan antibodi primer dan sekunder untuk Western Blot

##### 4.6.2.3 Bahan untuk Perlakuan Hewan

- Larutan NaCl 0,9% steril
- HUC-MSCs

##### 4.6.2.4 Bahan untuk Pengambilan dan Analisis Sampel Darah

- Tabung mikro dengan anticoagulan (EDTA) atau tabung tanpa anticoagulan untuk serum

- Reagen dan kit ELISA spesifik untuk pengukuran kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$

Larutan substrat enzim (TMB) dan larutan penghenti reaksi untuk ELISA

#### 4.6.2.5 Bahan Pendukung Lain

- Alkohol 70% untuk sterilisasi
- Kapas steril
- Sarung tangan dan perlengkapan proteksi laboratorium

### 4.7 Cara Penelitian

#### 4.7.1 Permohonan *Ethical Clearance*

Permohonan *ethical clearance* untuk penelitian ini diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang. Persetujuan dari komisi etik ini merupakan prasyarat sebelum penelitian dapat dilaksanakan untuk memastikan bahwa prosedur penelitian memenuhi standar etika yang berlaku.

#### 4.7.2 Persiapan Sebelum Perlakuan

- a. Sebanyak 30 ekor tikus jantan galur Wistar dengan berat badan 180–220 gram dan usia 6–8 minggu akan dipilih berdasarkan kriteria inklusi yang telah ditetapkan. Hewan uji ini kemudian dibagi secara acak menjadi lima kelompok, masing-masing terdiri dari enam ekor,

dengan komposisi tiga kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan. Sebelum menjalani perlakuan, tikus akan melalui periode adaptasi selama tujuh hari, bertujuan untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan laboratorium dan meminimalisir stres yang dapat memengaruhi hasil penelitian.

- b. Proses aklimatisasi akan dilakukan untuk memastikan kondisi lingkungan yang stabil dan sesuai dengan kebutuhan hewan uji. Selama aklimatisasi, tikus akan ditempatkan dalam kandang yang memiliki ventilasi yang baik dan suhu yang sesuai, serta dipantau secara rutin untuk memastikan kesehatannya.
- c. Selama periode penelitian, tikus akan diberikan pakan standar yang mengandung komposisi nutrisi yang seimbang: protein 20-25%, pati 45-55%, lemak 10-12%, dan serat kasar 4%. Selain itu, tikus juga akan diberi air minum dalam jumlah yang cukup setiap hari. Pemberian pakan dan air akan dilakukan secara teratur untuk menjaga kondisi fisik hewan dan memastikan bahwa faktor ini tidak memengaruhi hasil penelitian.

#### **4.7.3 Isolasi *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem***

##### ***Cells (HUC-MSCs)***

Seluruh proses isolasi dilakukan di dalam *biosafety cabinet* kelas 2 dengan menggunakan peralatan steril dan teknik aseptik untuk menghindari kontaminasi.<sup>57</sup>

1. Persiapan Media Kultur

Siapkan media kultur untuk HUC-MSCs dengan melarutkan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) dan menambahkan 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, dan 1% Fungizone. Media kultur disiapkan dalam tabung mikro sentrifugasi 1,5 mL.

2. Pengambilan Tali Pusat

Setelah euthanasia tikus jantan Wistar, bersihkan tubuh dengan semprotan alkohol 70%. Pisahkan dan ambil tali pusat secara aseptik, kemudian buang pembuluh darah dan jaringan lain yang tidak diperlukan.

3. Pemisahan Jaringan Tali Pusat.

Gunakan pinset steril, tali pusat dipotong kecil-kecil hingga berbentuk fragmen halus dan diletakkan dalam petri dish yang berisi PBS (*Phosphate Buffered Saline*) untuk pembersihan. Jaringan tali pusat kemudian dicuci hingga bersih.

4. Pengumpulan dan Pemrosesan Jaringan

Jaringan tali pusat yang telah dibersihkan dicacah hingga halus menggunakan pisau bedah steril dan diletakkan pada flask 25T secara merata. Diamkan selama 3 menit agar jaringan melekat pada permukaan flask.

5. Penambahan Media dan Inkubasi

Tambahkan medium komplit yang terdiri dari DMEM,

penicillinstreptomycin, FBS 10%, dan fungizone secara pelan-pelan hingga menutupi seluruh permukaan flask. Inokulasi jaringan dilakukan dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 72 jam. Hitung jumlah sel dan tanam pada cawan kultur dengan densitas  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>2</sup> dalam media kultur yang sudah disiapkan. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 72 jam untuk menumbuhkan sel yang melekat pada permukaan.

#### 6. Penggantian Media dan Pemeliharaan

Setelah 72 jam, buang media yang berisi sel tidak melekat (*nonadherent*) dan ganti dengan media baru. Lakukan penggantian media setiap 2 hari sekali sampai sel mencapai konfluensi 80–90%.

#### 4.7.4 Validasi MSC

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

1. Lepaskan sel dari flask menggunakan BDTM Accutase™ Cell Detachment Solution (Cat No. 561527) atau solusi detachment lainnya. Cuci sel dan suspensikan kembali pada konsentrasi  $1 \times 10^7$  sel/ml dalam BD Pharmingen™ Stain Buffer (Cat No. 554656) atau Phosphate Buffered Saline (PBS). Jika jumlah sel terbatas, sel dapat disuspensikan pada konsentrasi  $5 \times 10^6$  sel/ml.
2. Siapkan tabung falcon 5 ml yang berisi reagen untuk flow cytometry.

3. Ulangi langkah ini untuk setiap penambahan sampel yang akan dianalisis, dengan menggunakan 5 sampai 7 tabung.
4. Ambil 100  $\mu$ l sampel dan masukkan ke dalam masing-masing tabung.
5. Lakukan vortex atau tapping pada tabung.
6. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dalam kondisi gelap.
7. Cuci sampel sebanyak 2 kali menggunakan PBS dan suspensikan kembali dengan 300-500  $\mu$ l PBS atau 1 kali washing buffer (FBS).
8. Baca sampel di flow cytometer, menggunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk pengaturan flow cytometry (sebagai kompensasi).

#### **4.7.5 Prosedur Hipoksia MSC**

1. Persiapkan hypoxic chamber terlebih dahulu.
2. Tempatkan well yang berisi MSC ke dalam chamber.
3. Pasang oksigenmeter di dalam chamber untuk memantau konsentrasi oksigen.
4. Pastikan chamber tertutup rapat agar tidak ada kebocoran.
5. Alirkan nitrogen melalui selang yang terhubung ke chamber secara merata.
6. Tambahkan nitrogen secara perlahan hingga oksigenmeter menunjukkan konsentrasi oksigen 5%.
7. Lakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Terus pantau oksigenmeter untuk memastikan konsentrasi oksigen tetap stabil di 5%.

#### 4.7.6 Penetapan Dosis

Pemilihan dosis  $1,5 \times 10^6$  sel (K3) dan  $3 \times 10^6$  sel (K4) pada kelompok perlakuan didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa dosis sel punca mesenkimal (MSC) yang lebih rendah dapat memberikan efek terapeutik yang signifikan dalam perbaikan jaringan dan pengurangan inflamasi pada stroke iskemik, tanpa menimbulkan efek samping yang berbahaya. Dosis pertama (K3) dipilih untuk mengeksplorasi efek terapeutik dengan jumlah sel yang moderat, sementara dosis kedua (K4) dipilih untuk menguji potensi maksimal dalam mempercepat regenerasi dan meningkatkan angiogenesis. Dengan membandingkan kedua dosis ini, penelitian ini bertujuan untuk menemukan dosis optimal yang dapat memberikan efek terapeutik terbaik dalam mengatasi kerusakan jaringan otak pasca-stroke, sambil memastikan keseimbangan antara efektivitas dan keamanan.

#### 4.7.7 Induksi Model Hewan Stroke Iskemik

Prosedur pembuatan model hewan stroke iskemik adalah sebagai berikut: 58,59

##### 1. Persiapan Hewan dan Anestesi

- Tikus jantan galur Wistar ditimbang dan diinduksi anestesi dengan inhalasi kombinasi 3% isoflurane dan oksigen.
- Hewan diposisikan secara terlentang di atas meja operasi hangat (warm pad) untuk menjaga suhu tubuh antara  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , yang dipantau menggunakan termometer rektal.

## 2. Monitoring Aliran Darah Otak (CBF)

- *Laser-Doppler flowmeter optic probe* dipasang secara bilateral pada kedua hemisfer otak untuk memantau *cerebral blood flow* (CBF).
- Penempatan probe pada hemisfer ipsilateral (sisi oklusi) bertujuan memantau keberhasilan induksi iskemia.
- Probe pada hemisfer kontralateral digunakan untuk mendeteksi kemungkinan perdarahan subaraknoid akibat perforasi vaskular.

## 3. Kriteria Keberhasilan Model Iskemik

- Penurunan CBF  $\geq 50\%$  hanya pada hemisfer ipsilateral menunjukkan oklusi MCA berhasil dan iskemia terjadi.
- Penurunan CBF pada kedua hemisfer mengindikasikan adanya perdarahan intrakranial, dan hewan tersebut dikeluarkan dari percobaan.

## 4. Prosedur Bedah

- Sayatan dibuat pada garis tengah leher sepanjang  $\pm 3$  cm.
- *Common carotid artery* (CCA) kiri diekspos dan nervus vagus dipisahkan secara hati-hati.
- Lubang kecil dibuat pada dinding CCA menggunakan gunting mikro.

#### 5. Induksi *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)

- Benang nilon monofilamen berlapis silikon dimasukkan perlahan melalui CCA menuju arteri karotis interna (ICA) hingga mencapai percabangan arteri serebri media (MCA).
- Penurunan CBF secara mendadak di hemisfer ipsilateral diamati melalui flowmeter sebagai tanda oklusi berhasil.
- Benang difiksasi menggunakan microclip, dan oklusi dipertahankan selama 60 menit.
- CBF dicatat setiap 10 menit selama periode oklusi.

#### 6. Reperfusi

- Setelah 60 menit, benang dilepaskan perlahan dari ICA untuk menginisiasi reperfusi spontan.

#### 4.7.8 Pemberian HUC-MSCs

Pada kelompok perlakuan K3, HUC-MSCs diberikan melalui injeksi intravena di vena ekor sebanyak 300  $\mu\text{L}$  yang mengandung  $1,5 \times 10^6$  sel tiga hari setelah induksi MCAO. Sementara itu, pada kelompok perlakuan K4, HUC-MSCs diberikan dengan dosis yang lebih tinggi, yaitu 300  $\mu\text{L}$  yang mengandung  $3 \times 10^6$  sel secara intravena di vena ekor, juga tiga hari setelah MCAO. Sebagai perbandingan, kelompok kontrol menerima normal saline sebanyak 300  $\mu\text{L}$  secara intravena di vena ekor, tiga hari setelah MCAO.

#### 4.7.9 Prosedur Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ Menggunakan

## Metode ELISA

### 1. Persiapan dan Pengambilan Jaringan Otak

- Setelah terminasi tikus (menggunakan kloroform), lakukan diseksi kranial untuk mengambil jaringan otak, khususnya korteks serebri bagian ipsilateral pada area infark.
- Jaringan otak yang diperoleh segera dibersihkan dan dimasukkan ke dalam tabung mikrocentrifuge.
- Jaringan otak kemudian dihomogenisasi dengan buffer khusus untuk mempersiapkan sampel untuk analisis lebih lanjut.

### 2. Persiapan Reagen dan Alat ELISA

- Semua reagen, termasuk antibodi, standar, dan buffer, dipersiapkan sesuai dengan petunjuk protokol standar ELISA yang berlaku.
- Reagen dibiarkan mencapai suhu kamar sebelum digunakan untuk memastikan reaktivitas optimal.

### 3. Analisis ELISA

#### a. Penambahan Standar dan Sampel

- Kurva standar dibuat dengan menambahkan larutan standar dengan konsentrasi yang telah ditentukan ke dalam sumur pelat mikro 96-well.

- Sampel plasma/serum tikus ditambahkan ke sumur pelat dengan volume yang sama, dilakukan minimal dalam duplikat untuk meningkatkan akurasi hasil.

b. Inkubasi

Inkubasi pelat mikro pada suhu ruang selama 1–2 jam untuk memungkinkan pengikatan antigen (TNF- $\alpha$  atau IL-1 $\beta$ ) dengan antibodi yang terikat pada pelat.

c. Pencucian

Pelat dicuci dengan buffer pencuci sebanyak 3–5 kali untuk menghilangkan bahan yang tidak terikat.

d. Penambahan Enzi

- Larutan enzim konjugat yang mengandung antibodi sekunder ditambahkan ke setiap sumur.
- Inkubasi dilakukan selama 30–60 menit pada suhu kamar agar terjadi reaksi pengikatan. m Konjugat

e. Pencucian Kembali

Pelat dicuci kembali sebanyak 3–5 kali untuk menghilangkan enzim konjugat yang tidak terikat.

f. Penambahan Substrat

Substrat enzim 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ditambahkan ke setiap sumur dan pelat diinkubasi selama 10–20 menit hingga terbentuk perubahan warna.

g. Penghentian Reaksi

Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan larutan penghenti, yang menyebabkan perubahan warna menjadi kuning stabil.

4. Pembacaan Absorbansi

- Absorbansi masing-masing sumur diukur menggunakan spektrofotometer microplate pada panjang gelombang 450 nm.

5. Analisis Data

- Nilai absorbansi sampel dibandingkan dengan kurva standar untuk menentukan konsentrasi IL-6 dan VEGF.
- Hasil dinyatakan dalam satuan pg/mL atau ng/mL sesuai dengan standar kalibrasi.
- Data dianalisis secara statistik untuk menentukan perbedaan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  antar kelompok perlakuan.

**4.8 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di *Laboratorium Semarang Cancer Center and*

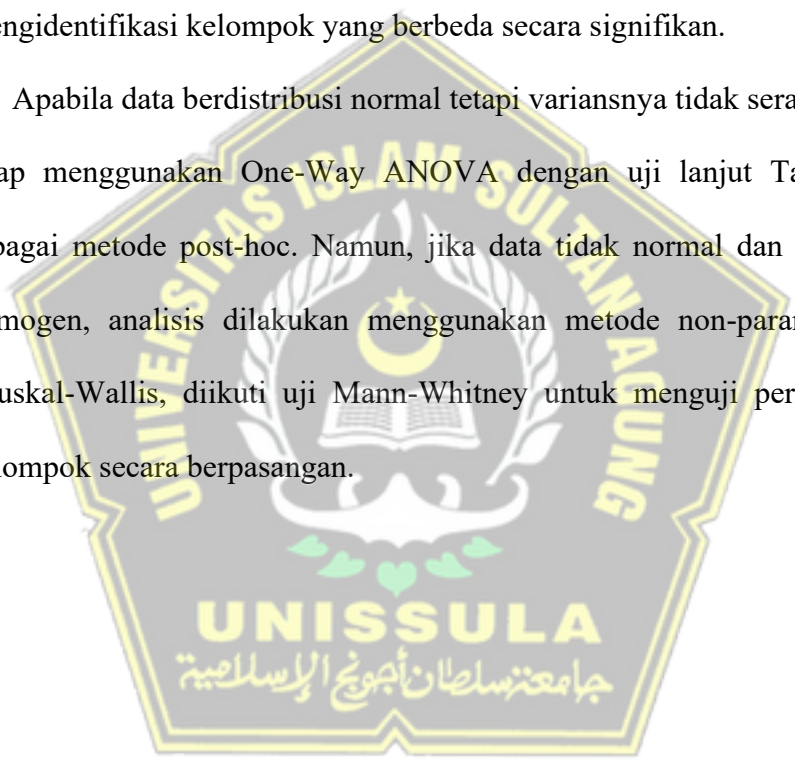
*Research (SCCR)* selama periode September – November 2025.

**4.9 Analisis Data**

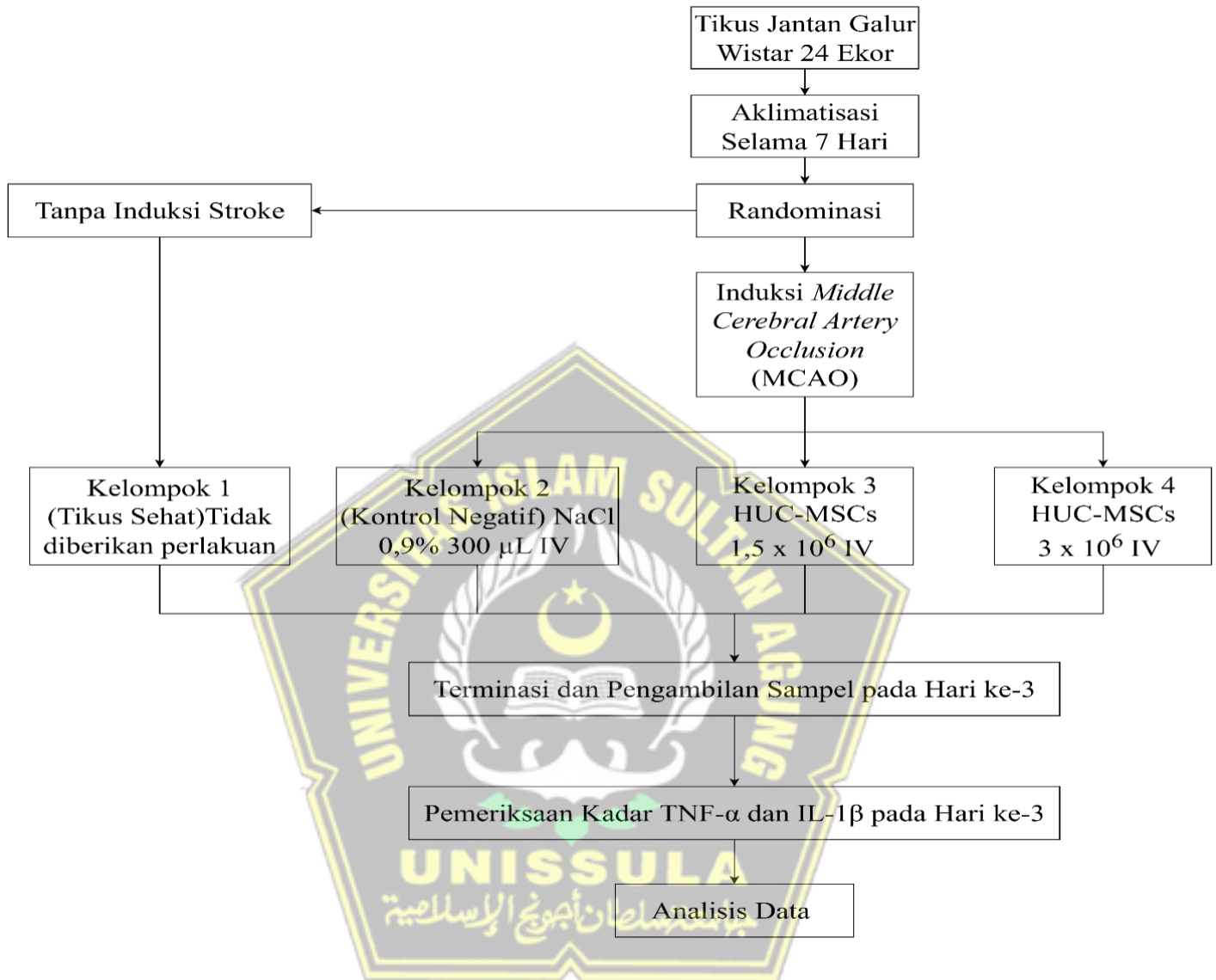
Data yang diperoleh dari penelitian ini akan diproses melalui tahap pembersihan, pengorganisasian, dan pengelolaan sebelum dianalisis menggunakan perangkat lunak statistik SPSS versi 26. Analisis awal meliputi statistik deskriptif untuk menggambarkan nilai kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada setiap kelompok perlakuan.

Kemudian, dilakukan uji normalitas data menggunakan Shapiro-Wilk untuk mengevaluasi apakah distribusi data mengikuti pola normal, serta uji homogenitas varians dengan Levene's Test untuk memastikan kesetaraan varians antar kelompok. Jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, analisis perbandingan antar kelompok akan dilakukan dengan One-Way ANOVA, dilanjutkan dengan uji Post-Hoc Tukey untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda secara signifikan.

Apabila data berdistribusi normal tetapi variansnya tidak seragam, analisis tetap menggunakan One-Way ANOVA dengan uji lanjut Tamhane's T2 sebagai metode post-hoc. Namun, jika data tidak normal dan varians tidak homogen, analisis dilakukan menggunakan metode non-parametrik, yaitu Kruskal-Wallis, diikuti uji Mann-Whitney untuk menguji perbedaan antar kelompok secara berpasangan.



#### 4.10 Alur Penelitian



**Gambar 4.2** Alur Penelitian

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

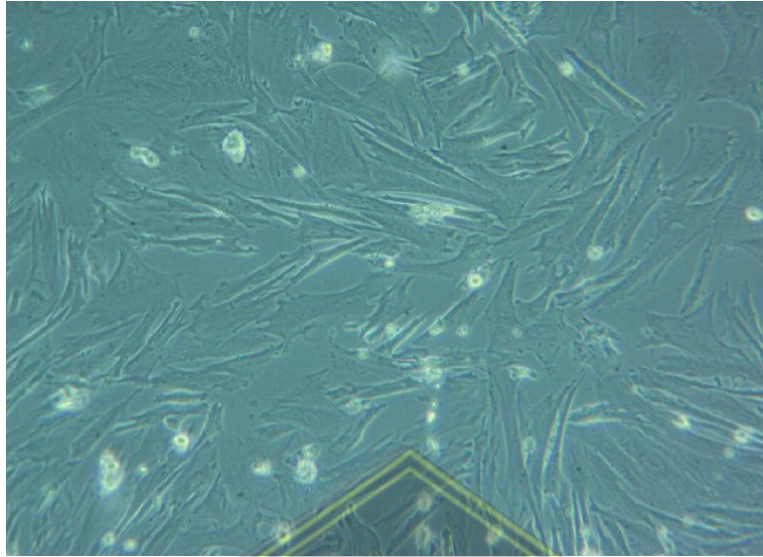
Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (HUC-MSCs) terhadap kadar Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) dan Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) pada tikus Wistar model stroke iskemik. Riset dijalankan di bulan September – Oktober di Laboratorium SCCR dan FK Unissula Semarang. Penelitian ini merupakan studi eksperimental in vivo dengan desain *Post Test Only Control Group Design*, menggunakan model tikus stroke iskemik akut.

Rancangan penelitian yang diterapkan adalah *Rancangan Acak Lengkap* (RAL), yang terdiri dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan akan diberikan *Hypoxic Preconditioned Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (HUC-MSCs)* sedangkan kelompok kontrol akan diberi perlakuan standar. Setelah pemberian perlakuan, kedua kelompok akan dievaluasi untuk mengukur kadar sebagai biomarker proinflamasi.

##### 5.1.1 Isolasi MSC dari *Umbilical Cord* dan induksi *Hypoxic Preconditioned*.

Seluruh proses isolasi dilakukan di dalam *biosafety cabinet* kelas dengan penambahan media yang terdiri dari DMEM (*Dulbeccos's modified eagle medium*), fungizone, penstrep dan FBS, hasil isolasi kemudian dilakukan kultur dalam *flask* plastik. Setelah euthanasia tikus jantan Wistar, yang diambil tali pusat secara aseptik, dan setelah 72 jam pada media komplit yang terdiri dari DMEM, penicillinstreptomycin, FBS 10%, dan fungizone, validasi MSC dilakukan dengan menganalisis ekspresi marker *cluster of differentiation* (CD).

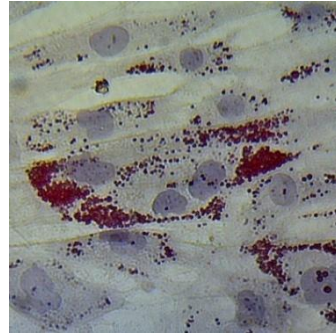
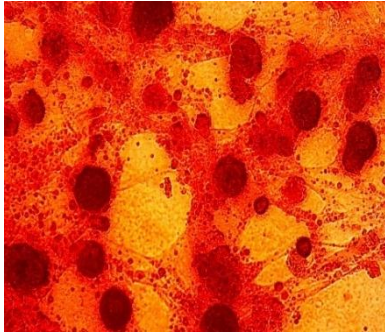
Validasi MSC dilakukan setelah 72 jam. Pemeriksaan mikroskopis hasil kultur MSC pada konfluensi 80%-90. Validasi MSC dilakukan dengan menganalisis ekspresi marker *cluster of differentiation* (CD). Pemeriksaan mikroskopis hasil kultur MSC pada konfluensi 80% menunjukkan sel-sel menempel pada dasar tabung dengan bentuk sel seperti *spindle-like* (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. MSC pada konfluensi 80% menunjukkan gambaran sel-sel seperti *spindle-like*.

Dengan pewarnaan Alizarin Red menghasilkan endapan berwarna merah jingga yang menandakan adanya deposit kalsium, ciri khas jaringan tulang. Dari temuan ini menunjukkan bukti bahwa MSC memiliki kemampuan osteogenic yang kuat pada Gambar 5.2 a.

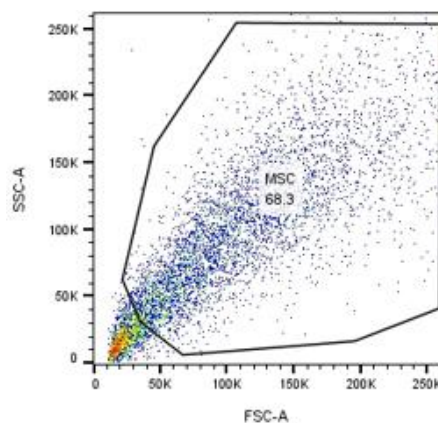
Pada pewarnaan Oil Red O terlihat pewarna menempel pada vakuola lipid yang terbentuk didalam sitoplasma sel, sehingga menghasilkan warna merah menyala. Hal ini menandakan bahwa MSC berhasil mengalami diferensiasi adipogenik. Gambar 5.



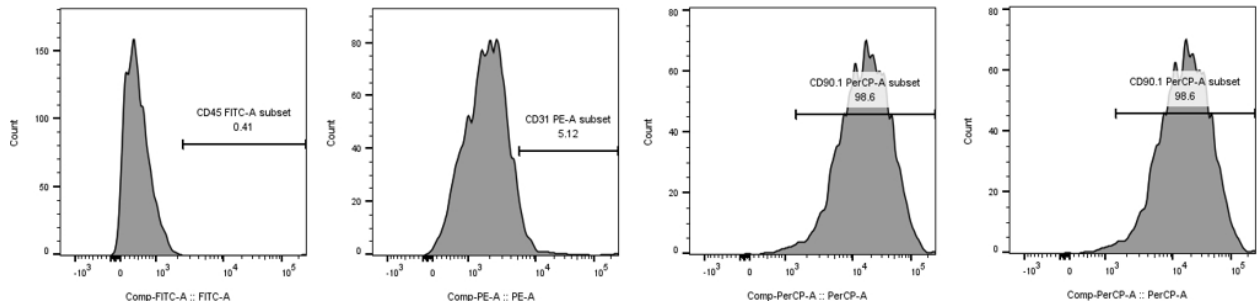
Gambar 5.2a Diferensiasi Osteogenesis. Alizarin-red staining.

Gambar 5.2b Diferensiasi Adipogenik. Oil-red O staining

Grafik Scatter Plot menunjukkan 68,3% dari total populasi sel berada dalam rentang karakteristik morfologi yang khas untuk MSC yakni dengan ukuran sedang dan kompleksitas sedang. Hal ini menandakan bahwa Sebagian besar kultur yang dianalisis termasuk ke dalam populasi MSC yang homogen dan murni. (Gambar 5.3). Pada uji Flow Cytometry histogram menunjukkan hasil ekspresi CD45 0,41%, CD31 5,12%, yang menandakan bahwa populasi sel ini bebas dari sel leukosit(bukan sel hematopoietic) dan tidak terkontaminasi sel endotel, sehingga dapat disimpulkan sel ini bukan berasal dari garis keturunan hematopoietic maupun endotel. Penanda CD 90,1 (PerCP-A) 98,6% dan CD 90,1 (duplikasi histogram) 98,6% menunjukkan positif kuat, yang memperkuat identifikasi bahwa sel tersebut adalah kumpulan MSC murni. (Gambar 5.4).



Gambar 5.3. Grafik Scatter Plot.



Gambar 5.4. Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90,1 PerCP, CD 90,1 (duplikasi histogram).

Setelah validasi Mesenchymal Stem Cells (MSCs) selesai dan memastikan bahwa sel memenuhi kriteria identitas, viabilitas, stabilitas, serta bebas kontaminasi, selanjutnya dilakukan Hypoxic Preconditioning (HPC) sebagai tahap optimasi fungsi biologis sel. Pada tahap ini, MSC yang telah stabil dipaparkan pada lingkungan dengan kadar oksigen rendah untuk meniru kondisi fisiologis niche sel punca di dalam tubuh. MSC ditempatkan pada chamber dengan aliran oksigen yang kemudian dengan penambahan aliran nitrogen perlahan, konsentrasi oksigen dipertahankan sebesar 5% melalui pemantauan oksigenmeter. Kondisi ini dipertahankan selama 24 jam dengan suhu 37°C.

Pemilihan dosis  $1,5 \times 10^6$  sel (K3) dan  $3 \times 10^6$  sel (K4) pada kelompok perlakuan didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa dosis sel punca mesenkimal (MSC) yang lebih rendah dapat memberikan efek terapeutik yang signifikan dalam perbaikan jaringan dan pengurangan inflamasi pada stroke iskemik, tanpa menimbulkan efek samping yang berbahaya. Dosis pertama (K3) dipilih untuk mengeksplorasi efek terapeutik dengan jumlah sel yang moderat, sementara dosis kedua (K4) dipilih untuk menguji potensi maksimal dalam mempercepat regenerasi dan meningkatkan angiogenesis. Dengan membandingkan kedua dosis ini, penelitian ini bertujuan untuk menemukan dosis optimal yang dapat

memberikan efek terapeutik terbaik dalam mengatasi kerusakan jaringan otak pasca-stroke, sambil memastikan keseimbangan antara efektivitas dan keamanan.

### **5.1.3.Induksi dan Validasi Model Hewan Stroke.**

Model hewan stroke iskemik diinduksi dengan metode Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) yang digunakan secara luas untuk mereplikasi kondisi oklusi arteri serebri media pada manusia, yang merupakan penyebab tersering stroke iskemik. Secara konseptual, prosedur ini bertujuan menimbulkan penghentian aliran darah serebral secara terkontrol pada wilayah kortikal dan subkortikal tertentu sehingga terjadi hipoksia–iskemia, kegagalan metabolik neuron, eksitotoksisitas glutamat, stres oksidatif, serta respons inflamasi sekunder. Model ini dapat merepresentasikan fase akut hingga subakut stroke, sehingga relevan untuk mengevaluasi efektivitas intervensi neuroprotektif dan regeneratif.

Prosedur ini diawali dengan induksi anestesi pada tikus Wistar menggunakan isoflurane–oksigen, kemudian hewan diposisikan pada meja hangat untuk menjaga suhu tubuh tetap stabil sambil dilakukan pemantauan aliran darah otak (CBF) secara bilateral menggunakan laser-Doppler, dengan probe ipsilateral untuk memastikan keberhasilan induksi iskemia dan probe kontralateral untuk mendeteksi komplikasi perdarahan. Keberhasilan model ditetapkan bila terjadi penurunan CBF  $\geq 50\%$  hanya pada hemisfer ipsilateral, sedangkan penurunan pada kedua hemisfer menjadi kriteria eksklusi. Induksi iskemia dimulai dengan pembedahan leher untuk mengekspos arteri karotis, diikuti pemasukan benang monofilamen melalui arteri karotis menuju percabangan arteri serebri media hingga terjadi penurunan CBF sebagai tanda oklusi berhasil, kemudian oklusi dipertahankan selama 60 menit dengan pemantauan CBF berkala, dan diakhiri dengan pelepasan benang secara perlahan untuk memicu reperfusi spontan.

Validasi model hewan stroke dilakukan dengan pewarnaan TCC (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride) yang merupakan sebuah metode standar untuk membedakan jaringan yang hidup dan yang mengalami iskemia atau infark.. Hasil pewarnaan menunjukkan perbedaan yang jelas antara jaringan otak yang sehat dan jaringan otak yang mengalami iskemia (Gambar 5.5a dan Gambar 5.5b).



**Gambar 5.5** Gambar pewarnaan TCC. **a**, Tampak potongan otak dengan warna merah homogen (merata) di seluruh bagian. Tidak ada sumbatan aliran darah (iskemia) dan tidak ada tanda-tanda kematian jaringan (infark). **b**, terlihat perbedaan yang mencolok dengan munculnya area pucat atau putih di salah satu sisi otak. Ini menandai adanya kematian jaringan (infark).

### **Analisis Kadar TNF $\alpha$ dan IL-1 $\beta$**

Untuk menilai peran HUC-MSK pada stroke akut, dilakukan pemeriksaan kadar TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , di hari ke-3 setelah pemberian HUC-MSK pada 2 kelompok yang telah diinduksi iskemia selama 3 hari. 1 kelompok yang diinduksi stroke tanpa intervensi HUC-MSK, dan 1 kelompok control. Kelompok K1 adalah kelompok control tanpa perlakuan, kelompok K2 adalah kelompok yang diinduksi stroke selama 3 hari tanpa pemberian intervensi, kelompok K3, adalah kelompok yang diinduksi stroke dengan intervensi dosis HUC-MSK 1,5 juta sel, dan kelompok K4, adalah kelompok dengan induksi stroke dengan intervensi pemberian HUC MSC 3 juta sel.

Pengamatan kadar TNF $\alpha$  pada masing-masing kelompok perlakuan yakni kelompok kontrol sehat, menunjukkan kadar TNF $\alpha$  paling rendah, yakni mencerminkan kondisi fisiologis tanpa inflamasi. Sebaliknya pada kelompok kedua yang diinduksi stroke tanpa intervensi menunjukkan kadar TNF $\alpha$  tertinggi. Pada kelompok ketiga menunjukkan kadar TNF $\alpha$  lebih rendah dari kelompok kedua, yang berarti terdapat penurunan inflamasi pasca pemberian intervensi 1,5 juta sel. Pada kelompok terakhir rerata kadar TNF $\alpha$  paling rendah yang berarti pada intervensi dengan 3 juta sel HUC-MSK menunjukkan efek anti inflamasi yang paling besar.

Pada pengukuran kadar IL-1 $\beta$  pada ke 4 kelompok menunjukkan temuan yang sama dengan TNF $\alpha$ , pada kelompok ketiga yang diberikan HUC-MSK sebesar 1,5 juta menunjukkan kadar IL-1 $\beta$  yang lebih rendah dibanding kelompok yang diinduksi stroke tanpa intervensi. Pada kelompok 4 yang di intervensi dengan HUC-MSK 3 juta sel menunjukkan kadar IL-1 $\beta$  yang paling rendah. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian 3 juta sel HUC-MSK memberikan efek anti

### 5.1.2. Deskripsi hasil pengukuran kadar TNF $\alpha$ dan IL-1 $\beta$ .

### 5.1.3. Analisa Statistik Data TNF $\alpha$

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
TNF $\alpha$	K1	.164	6	.200*	.966	6	.865
	K2	.186	6	.200*	.913	6	.455
	K3	.235	6	.200*	.905	6	.407
	K4	.202	6	.200*	.865	6	.205
IL1 $\beta$	K1	.236	6	.200*	.927	6	.556
	K2	.196	6	.200*	.926	6	.549
	K3	.194	6	.200*	.925	6	.540
	K4	.270	6	.195	.907	6	.420

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.1 Hasil uji normalitas.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
TNF $\alpha$	K1	6	50.6650	8.05480	3.28836	42.2120	59.1180	40.14	61.57
	K2	6	114.6900	15.09684	6.16326	98.8468	130.5332	96.71	132.44
	K3	6	88.4983	2.39011	.97576	85.9901	91.0066	85.71	91.71
	K4	6	52.2383	5.52601	2.25598	46.4391	58.0375	46.43	58.57
	Total	24	76.5229	28.58722	5.83534	64.4516	88.5942	40.14	132.44
IL1 $\beta$	K1	6	12.9700	5.88340	2.40189	6.7957	19.1443	5.36	20.55
	K2	6	60.7883	4.33690	1.77053	56.2370	65.3396	53.55	65.36
	K3	6	24.5300	7.43816	3.03662	16.7241	32.3359	16.64	37.36
	K4	6	18.5617	1.32703	.54176	17.1690	19.9543	16.36	19.91
	Total	24	29.2125	19.70418	4.02210	20.8922	37.5328	5.36	65.36

Tabel 5.2. Data deskriptif.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TNF $\alpha$	6.038	3	20	.004
IL1 $\beta$	2.829	3	20	.065

Tabel 5.3. Hasil uji homogenitas ( $p > 0,05$  homogen)

Uji normalitas menunjukkan bahwa data kadar TNF- $\alpha$  terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), namun uji homogenitas menunjukkan **data tidak homogen**, sehingga selanjutnya digunakan uji ANOVA satu arah diikuti

dengan **post-hoc Tamhane**. Hasil ANOVA memperlihatkan perbedaan bermakna antar kelompok ( $p < 0,05$ ), dan analisis post-hoc menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan model stroke (K2) dengan kelompok perlakuan K3 dan K4, dengan nilai tertinggi signifikansi pada kelompok K4 ( $p < 0,001$ )

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TNF $\alpha$	Between Groups	17151.058	3	5717.019	69.499	.000
	Within Groups	1645.219	20	82.261		
	Total	18796.277	23			
IL1b	Between Groups	8377.309	3	2792.436	101.074	.000
	Within Groups	552.552	20	27.628		
	Total	8929.860	23			

**Tabel 5.4.** Hasil uji ANOVA

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: TNF $\alpha$   
Tamhane

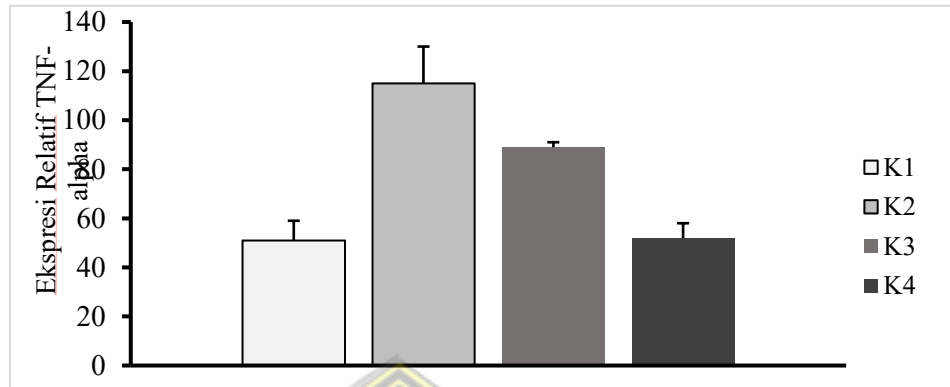
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	K2	-64.02500*	6.98563	.000	-88.5827	-39.4673
	K3	-37.83333*	3.43007	.000	-51.1433	-24.5233
	K4	-1.57333	3.98783	.999	-14.9945	11.8479
K2	K1	64.02500*	6.98563	.000	39.4673	88.5827
	K3	26.19167*	6.24002	.045	.6606	51.7227
	K4	62.45167*	6.56317	.000	37.7514	87.1519
K3	K1	37.83333*	3.43007	.000	24.5233	51.1433
	K2	-26.19167*	6.24002	.045	-51.7227	-.6606
	K4	36.26000*	2.45796	.000	27.2725	45.2475
K4	K1	1.57333	3.98783	.999	-11.8479	14.9945
	K2	-62.45167*	6.56317	.000	-87.1519	-37.7514
	K3	-36.26000*	2.45796	.000	-45.2475	-27.2725

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Tabel 5.5.** Hasil Uji Analisis Post Hoc Tamhane dengan nilai signifikansi  $P < 0,05$

Gambar grafik ekspresi relatif TNF $\alpha$  memperlihatkan nilai relative TNF $\alpha$  tertinggi pada kelompok K2, yakni kelompok model stroke yang diperiksa tanpa pemberian HUC-MSC, sedangkan nilai terendah pada kelompok K4 yakni kelompok dengan pemberian HUC-MSC dosis 3 juta sel. Artinya, HUC-MSC menekan ekspresi TNF- $\alpha$  berdasarkan dosis, yakni semakin tinggi dosis MSC, semakin besar penurunan kadar TNF- $\alpha$ .

**Gambar 5.6** Grafik batang ekspresi relative TNF $\alpha$ .



#### 5.1.4. Analisa Statistik Data IL-1 $\beta$

Normalitas menunjukkan data kadar IL-1 $\beta$  sesuai hasil uji normalitas dan uji homogenitas pada tabel 5.1 dan tabel 5.2 menunjukkan data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ). Oleh karena itu, analisis data dilanjutkan dengan ANOVA satu arah diikuti dengan post-hoc LSD. Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok ( $p < 0,05$ ), sedangkan hasil post-hoc LSD memperlihatkan bahwa kadar IL-1 $\beta$  menurun signifikan pada kelompok K3 dan lebih signifikan lagi pada K4 dibandingkan kelompok kontrol model stroke tanpa perlakuan (K2), dengan tingkat signifikansi  $p < 0,001$ .

### Multiple Comparisons

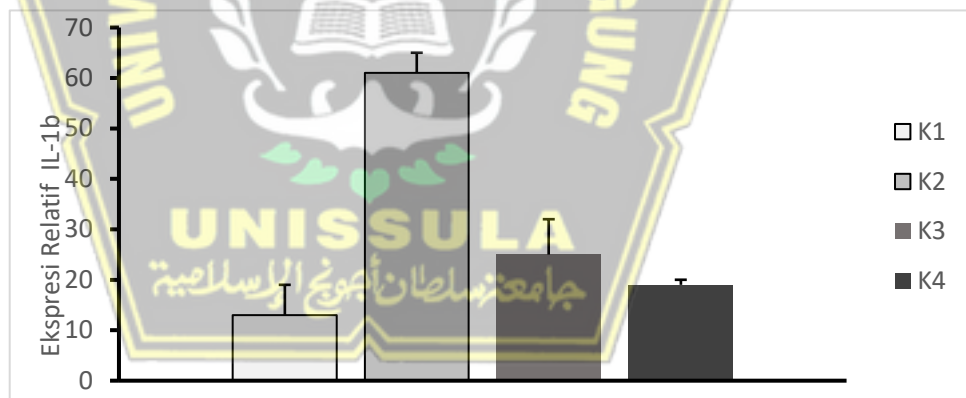
Dependent Variable: IL1b

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	K2	-47.81833*	3.03467	.000	-54.1485	-41.4881
	K3	-11.56000*	3.03467	.001	-17.8902	-5.2298
	K4	-5.59167	3.03467	.080	-11.9219	.7385
K2	K1	47.81833*	3.03467	.000	41.4881	54.1485
	K3	36.25833*	3.03467	.000	29.9281	42.5885
	K4	42.22667*	3.03467	.000	35.8965	48.5569
K3	K1	11.56000*	3.03467	.001	5.2298	17.8902
	K2	-36.25833*	3.03467	.000	-42.5885	-29.9281
	K4	5.96833	3.03467	.063	-.3619	12.2985
K4	K1	5.59167	3.03467	.080	-.7385	11.9219
	K2	-42.22667*	3.03467	.000	-48.5569	-35.8965
	K3	-5.96833	3.03467	.063	-12.2985	.3619

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Tabel 5.6** Hasil uji analisis post-hoc LSD dengan signifikansi nilai  $P < 0.05$



**Gambar 5.7** Grafik batang ekspresi relative IL-1 $\beta$ .

Gambar grafik ekspresi relatif IL-1 $\beta$  memperlihatkan nilai relative IL-1 $\beta$  tertinggi pada kelompok K2, yakni kelompok model stroke yang diperiksa tanpa pemberian HUC-MSC, sedangkan nilai terendah pada kelompok K4 yakni kelompok dengan pemberian HUC-MSC dosis 3 juta sel. Artinya, HUC-MSC menekan ekspresi IL-1 $\beta$  berdasarkan dosis, yakni semakin tinggi dosis MSC, semakin besar penurunan kadar IL-1 $\beta$ .

## 5.2. PEMBAHASAN

Stroke iskemik dimulai dengan oklusi arteri serebral, umumnya arteri serebral media atau *middle cerebral artery* (MCA), yang menyebabkan penurunan suplai oksigen dan nutrisi ke area otak yang terdampak.<sup>29</sup> Setelah kejadian stroke iskemik, sitokin pro-inflamasi seperti TNF $\alpha$  dan IL1 $\beta$  dilepaskan oleh makrofag, mikroglia, dan sel endotel setelah terjadinya iskemia otak dan selanjutnya terlibat dalam proses inflamasi yang memperburuk kerusakan jaringan otak.<sup>30</sup> Peradangan yang dipicu oleh sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *Interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ) memperburuk kerusakan jaringan melalui aktivasi sel mikroglia dan infiltrasi leukosit, yang pada gilirannya meningkatkan kerusakan oksidatif dan apoptosis neuron.<sup>31</sup>

Hasil deskriptif penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol sehat (K1) memiliki kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  paling rendah, mencerminkan kondisi fisiologis tanpa proses inflamasi. Sebaliknya, kelompok stroke tanpa intervensi (K2) menunjukkan kadar kedua sitokin paling tinggi, yang menandakan aktivasi inflamasi akut akibat cedera iskemik. Pada penelitian oleh Bourne dkk, pada kondisi stroke akut – subakut, terjadi peningkatan konsentrasi sitokin inflamasi IL-1 $\beta$ , dan tumor nekrosis factor (TNF)- $\alpha$  pada daerah infark dalam 3 jam setelah onset dan bertahan bahkan meningkat setelah 24 jam.<sup>62</sup>

Analisis statistik pada TNF- $\alpha$  melalui uji ANOVA satu arah dengan post-hoc Tamhane, menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ( $p < 0,05$ ), dengan signifikansi tertinggi pada kelompok K4 ( $p < 0,001$ ). Hal ini mengindikasikan bahwa HP-UC-MSc secara signifikan menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ . Serupa dengan penelitian oleh Yu H dkk di tahun 2020 pada studi in vitro/in vivo menunjukkan bahwa MSC pada kondisi hipoksia berefek mengurangi mediator pro-inflamasi termasuk TNF- $\alpha$  melalui mekanisme aktivasi HIF-1 $\alpha$ .<sup>63</sup> Begitu pula penelitian oleh Schepici G, dkk menunjukkan bahwa preconditioning (termasuk hipoksia) menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  melalui mekanisme HIF-1 $\alpha$  dan mekanisme parakrin.<sup>64</sup>

Pada fase akut stroke, TNF- $\alpha$  berfungsi untuk mengaktifkan mikroglia dan makrofag yang menghasilkan lebih banyak TNF- $\alpha$  dan sitokin pro-inflamasi lainnya. Salah satu jalur utama yang terlibat dalam proses ini adalah aktivasi makrofag tipe M1, yang lebih banyak memproduksi sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , yang pada gilirannya memperburuk inflamasi dan kerusakan jaringan. IL-1 $\beta$  berfungsi menginduksi ekspresi molekul adhesi (ICAM-1, VCAM-1) dan kemokin yang menarik leukosit ke daerah cedera, memperparah kerusakan neuron ini melalui aktivasi jalur NF- $\kappa$ B. Selain itu, TNF- $\alpha$  dapat menyebabkan disfungsi *blood-brain barrier* (BBB), meningkatkan permeabilitasnya dan memungkinkan infiltrasi lebih banyak sel imun dan zat yang merusak ke dalam jaringan otak yang terinfeksi.<sup>5,32</sup> Seperti yang ditemukan pada enurut studi oleh Chang dkk pemberian HUC-MSCs pada model stroke tikus dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  hingga 60% dalam 72 jam melalui sekresi Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dan Interleukin-10 (IL-10) oleh MSC, yang menekan diferensiasi makrofag proinflamasi (M1) menjadi fenotipe antiinflamasi (M2).<sup>65</sup>

Penurunan kadar IL-1 $\beta$  pada kelompok perlakuan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa HUC-MSCs juga ditemukan pada penelitian sebelumnya.. Xin et al. melaporkan bahwa MSC yang dipreparasi dalam kondisi hipoksia mampu menghambat ekspresi gen NLRP3 dan IL-1 $\beta$  pada model tikus stroke melalui peningkatan kadar microRNA-146a dan penurunan NF- $\kappa$ B p65.<sup>66</sup>

Pada stroke, aliran darah ke otak terganggu sehingga menyebabkan hipoksia dan kerusakan jaringan. Segera setelahnya, level IL-1 $\beta$  meningkat secara signifikan di otak. IL-1 $\beta$  diproduksi terutama oleh mikroglia yang teraktivasi dan sel-sel sistem imun lainnya yang terlibat dalam respons inflamasi. Sitokin ini dilepaskan oleh mikroglia aktif dan neuron yang mengalami stres oksidatif. IL-1 $\beta$  berfungsi meningkatkan permeabilitas sawar darah-otak, merangsang produksi prostaglandin, dan menginduksi apoptosis neuron melalui aktivasi caspase-1 dan NLRP3.<sup>23</sup> IL-1 $\beta$  juga diketahui meningkatkan permeabilitas *blood-brain barrier* (BBB), yang memungkinkan masuknya lebih banyak sel inflamasi dan molekul berbahaya ke

dalam jaringan otak serta berperan dalam aktivasi apoptosis sel saraf yang terpengaruh, yang memperburuk kerusakan jaringan dan meningkatkan luas infark.<sup>5,24</sup>

Pada stroke, aliran darah ke otak terganggu sehingga menyebabkan hipoksia dan kerusakan jaringan. Segera setelahnya, level IL-1 $\beta$  meningkat secara signifikan di otak. IL-1 $\beta$  diproduksi terutama oleh mikroglia yang teraktivasi dan sel-sel sistem imun lainnya yang terlibat dalam respons inflamasi. Sitokin ini dilepaskan oleh mikroglia aktif dan neuron yang mengalami stres oksidatif. IL-1 $\beta$  berfungsi meningkatkan permeabilitas sawar darah-otak, merangsang produksi prostaglandin, dan menginduksi apoptosis neuron melalui aktivasi caspase-1 dan NLRP3.<sup>23</sup> IL-1 $\beta$  juga diketahui meningkatkan permeabilitas *blood-brain barrier* (BBB), yang memungkinkan masuknya lebih banyak sel inflamasi dan molekul berbahaya ke dalam jaringan otak serta berperan dalam aktivasi apoptosis sel saraf yang terpengaruh, yang memperburuk kerusakan jaringan dan meningkatkan luas infark.<sup>5,24</sup>

Pada kelompok yang mendapatkan intervensi HP-UC-MSC dosis 1,5 juta sel (K3) terjadi penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dibandingkan K2. Penurunan yang lebih besar ditemukan pada kelompok HP-UC-MSC dosis 3 juta sel (K4), yang memiliki kadar sitokin terendah di antara kelompok stroke. Pola ini menunjukkan adanya efek dose-dependent, di mana peningkatan dosis sel meningkatkan efek antiinflamasi. Dengan demikian, data penelitian ini menunjukkan bahwa terapi HUC-MSCs efektif menekan mediator utama inflamasi pascastroke. Peningkatan dosis MSC (dari  $1,5 \times 10^6$  menjadi  $3 \times 10^6$  sel) memperlihatkan efek yang lebih signifikan, menandakan hubungan dosis-respon positif antara jumlah sel dan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$ . Pada penelitian model hewan dengan penggunaan Hypoxia MSC pada iskemia-reperfusion paru menunjukkan bahwa pemberian Hypoxia-MSC dengan dua dosis (low vs high) menurunkan TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada cairan bronkoalveolar, Studi ini memperkuat konsep bahwa preconditioning

hipoksia meningkatkan potensi antiinflamasi MSC dan bahwa efek tersebut dapat meningkat dengan dosis sel.<sup>67</sup>

Hasil penelitian ini sejalan dengan sejumlah studi sebelumnya. Penelitian oleh Liu et al, menunjukkan bahwa pemberian HUC-MSCs menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  secara signifikan pada tikus yang mengalami middle cerebral artery occlusion (MCAO). Efek penurunan lebih tinggi pada MSC yang dikondisikan dalam hipoksia dibandingkan normoksia.<sup>68</sup>

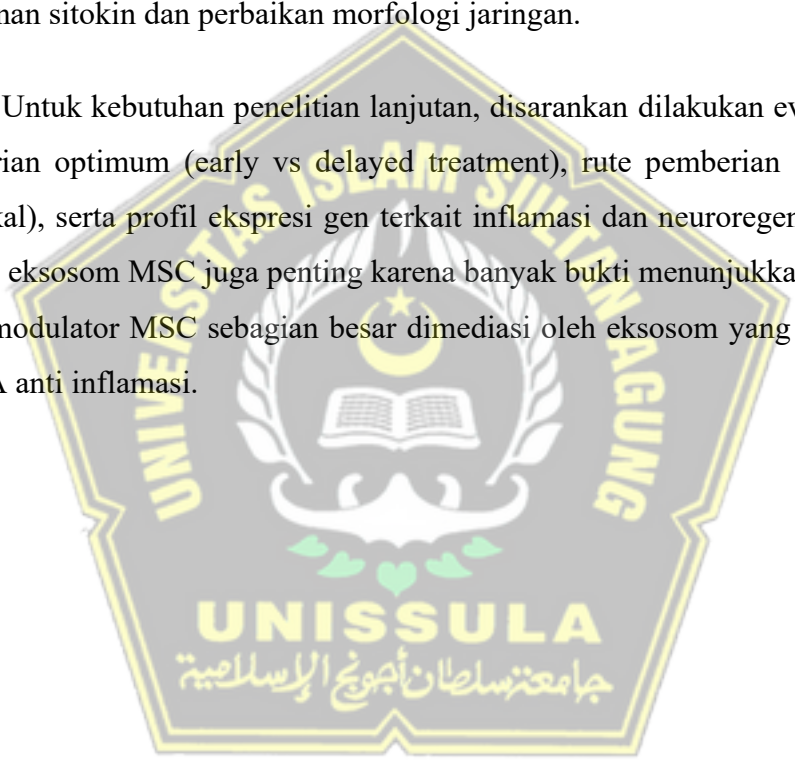
Mekanisme utama efek HUC-MSCs dalam menekan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  melibatkan beberapa jalur biologis seperti Imunomodulasi dan polarisasi makrofag. MSC mengsekresikan IL-10, TGF- $\beta$ , dan Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) yang mendorong transisi makrofag dari fenotipe M1 (proinflamasi) ke M2 (antiinflamasi).<sup>69</sup> Perubahan ini mengurangi produksi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  secara sistemik dan lokal di area infark otak. HUC-MSCs melepaskan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), dan Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), yang memperbaiki suplai darah dan mendukung regenerasi neuron.<sup>64</sup> Faktor-faktor ini juga menekan produksi sitokin proinflamasi melalui aktivasi PI3K/Akt dan STAT3 pathway. Efek preconditioning hipoksia Prekondisi hipoksia meningkatkan ekspresi Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), yang memperkuat kemampuan sel dalam bertahan hidup dan menekan stres oksidatif. HIF-1 $\alpha$  juga menginduksi ekspresi HO-1 (heme oxygenase-1) dan CXCL12, yang berperan dalam rekrutmen sel imun antiinflamasi serta perbaikan jaringan.<sup>70</sup>

Secara keseluruhan temuan pada penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa Hypoxic Preconditioned HUC-MSCs memiliki potensi lebih besar dibandingkan MSC biasa dalam menekan dan TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Efek ini terkait dengan kondisi hipoksia yang memicu aktivasi HIF-1 $\alpha$  yang menginduksi berbagai mekanisme yang menekan kedua marker pro-inflamasi tersebut. Sehingga secara klinis hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi MSC dapat menjadi

pendekatan potensial untuk neurorestorasi pascastroke iskemik, baik sebagai terapi tunggal maupun kombinasi dengan terapi reperfusi seperti RtPA.<sup>71</sup>

Namun penelitian ini belum mengevaluasi durasi efek terapeutik HUC-MSCs dalam jangka panjang, sehingga belum diketahui apakah penurunan sitokin bersifat sementara atau berkelanjutan. Kedua, pemeriksaan histopatologis otak dan imunohistokimia terhadap ekspresi penanda inflamasi belum dilakukan secara menyeluruh, sehingga belum menggambarkan hubungan langsung antara penurunan sitokin dan perbaikan morfologi jaringan.

Untuk kebutuhan penelitian lanjutan, disarankan dilakukan evaluasi waktu pemberian optimum (early vs delayed treatment), rute pemberian (intravena vs intratekal), serta profil ekspresi gen terkait inflamasi dan neuroregenerasi. Kajian tentang eksosom MSC juga penting karena banyak bukti menunjukkan bahwa efek imunomodulator MSC sebagian besar dimediasi oleh eksosom yang mengandung miRNA anti inflamasi.



## **BAB VI**

### **KESIMPULAN**

#### **6.1 Kesimpulan.**

Didasarkan atas temuan riset, didapat simpulan yang meliputi:

1. Pemberian Hypoxic Preconditioned HUC-MSCs secara fisiologis menurunkan kadar sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada model tikus stroke iskemik.
2. Efek terapi lebih optimal pada dosis  $3 \times 10^6$  sel, sehingga menunjukkan potensi besar terapi stem cell yang dipre-kondisikan hipoksia dalam mengurangi respon inflamasi pasca stroke iskemik.

#### **6.2 Saran**

Rekomendasi bagi riset berikutnya antara lain:

**6.2.1** Melakukan penelitian lebih lanjut terhadap kurva dosis yang lebih lengkap (mis.  $0.5 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ) untuk mencari dosis minimal efektif dan dosis toksik.

**6.2.2** Melakukan pemeriksaan dengan variasi waktu pemberian: segera pasca-stroke (0–6 jam), subakut (24–72 jam), dan kronik (7 hari) untuk menentukan jendela terapeutik terbaik.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Capriotti T, Murphy T. Ischemic Stroke. In: Home Healthcare Now. 2016. p. 259–66.
2. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–24.
3. Liu G, Wang D, Jia J, Hao C, Ge Q, Xu L, et al. Neuroprotection of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells (hUC-MSCs) in Alleviating Ischemic Stroke-Induced Brain Injury by Regulating Inflammation and Oxidative Stress. *Neurochem Res.* 2024 Oct 18;49(10):2871–87.
4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) 2018 Nasional. 2019.
5. Zhu H, Hu S, Li Y, Sun Y, Xiong X, Hu X, et al. Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol.* 2022 Jan 31;13.
6. Wytrykowska A, Prosba-Mackiewicz M, Nyka WM. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL6 levels in gingival fluid and serum of patients with ischemic stroke. *J Oral Sci.* 2016 Dec 1;58(4):509–13.
7. Li J, Zhang Q, Wang W, Lin F, Wang S, Zhao J. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke: A look into treatment mechanism and therapeutic potential. Vol. 268, *Journal of Neurology.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 4095–107.
8. Guo Y, Peng Y, Zeng H, Chen G. Progress in Mesenchymal Stem Cell Therapy for Ischemic Stroke. Vol. 2021, *Stem Cells International.* Hindawi Limited; 2021.
9. Xie B, Gu P, Wang W, Dong C, Zhang L, Zhang J, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation on hypoxic ischemic encephalopathy [Internet]. Vol. 8, *Am J Transl Res.* 2016. Available from: [www.ajtr.org](http://www.ajtr.org)
10. Huang J, Kin PU, Yang F, Ji Z, Lin J, Weng Z, et al. Human pluripotent stem cell-derived ectomesenchymal stromal cells promote more robust functional recovery than umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells after hypoxic-ischaemic brain damage. *Theranostics.* 2022;27(1):143–66.

11. Bao H, Mao S, Hu X, Li L, Tao H, Zhou J, et al. Exosomal miR-486 derived from bone marrow mesenchymal stem cells promotes angiogenesis following cerebral ischemic injury by regulating the PTEN/Akt pathway. *Sci Rep.* 2024 Dec 1;14(1).
12. Huang Z, Jiang J, Peng Q, Jin M, Dong Y, Li X, et al. Preclinical safety and efficacy evaluation of the intrathecal transplantation of GMP-grade human umbilical cord mesenchymal stem cells for ischemic stroke. *Neural Regen Res.* 2026 Mar;21(3):1172–82.
13. Liu J, Liang X, Li M, Lin F, Ma X, Xin Y, et al. Intramyocardial injected human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (HucMSCs) contribute to the recovery of cardiac function and the migration of CD4+ T cells into the infarcted heart via CCL5/CCR5 signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Dec 1;13(1).
14. Xia Y, Ling X, Hu G, Zhu Q, Zhang J, Li Q, et al. Small extracellular vesicles secreted by human iPSC-derived MSC enhance angiogenesis through inhibiting STAT3-dependent autophagy in ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Jul 22;11(1).
15. Kim HY, Kim TJ, Kang L, Kim YJ, Kang MK, Kim J, et al. Mesenchymal stem cell-derived magnetic extracellular nanovesicles for targeting and treatment of ischemic stroke. *Biomaterials.* 2020 Jun 1;243.
16. Xu R, Bai Y, Min S, Xu X, Tang T, Ju S. In vivo monitoring and assessment of exogenous mesenchymal stem cell-derived exosomes in mice with ischemic stroke by molecular imaging. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:9011–23.
17. Shi FP, Wang XH, Zhang HX, Shang MM, Liu XX, Sun HM, et al. MiR-103 regulates the angiogenesis of ischemic stroke rats by targeting vascular endothelial growth factor (VEGF). *Iran J Basic Med Sci.* 2018 Mar 1;21(3):318–24.
18. Silva LB, dos Santos Neto AP, Maia SMAS, dos Santos Guimarães C, Quidute IL, Carvalho A de AT, et al. The Role of TNF- $\alpha$  as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. *Open Dent J.* 2019 Oct 7;13(1):332–8.
19. Xue Y, Zeng X, Tu WJ, Zhao J. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : The Next Marker of Stroke. Vol. 2022, *Disease Markers.* Hindawi Limited; 2022.

20. Sobowale OA, Parry-Jones AR, Smith CJ, Tyrrell PJ, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 in Stroke: From Bench to Bedside. *Stroke*. 2016 Aug 1;47(8):2160–7.
21. Wang Y, Che M, Xin J, Zheng Z, Li J, Zhang S. The role of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in intervertebral disc degeneration. Vol. 131, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2020.
22. Clausen BH, Clausen BH, Wrenfeldt M, Wrenfeldt M, Høgedal SS, Frich LH, et al. Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Jun 5;8(1).
23. Pawluk H, Woźniak A, Grzešek G, Kołodziejska R, Kozakiewicz M, Kopkowska E, et al. The role of selected pro-inflammatory cytokines in pathogenesis of ischemic stroke. Vol. 15, *Clinical Interventions in Aging*. Dove Medical Press Ltd.; 2020. p. 469–84.
24. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil XE. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2019;316:135–53. Available from: [www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org)
25. Purroy F, Montalà N. Epidemiology of stroke in the last decade: a systematic review. Vol. 73, *Revista de Neurologia*. *Revista de Neurologia*; 2021. p. 321–36.
26. Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology*. 2021 Nov 16;97(20):S6–16.
27. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins SO, Pandian J, Lindsay P, et al. World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025. *International Journal of Stroke* [Internet]. 2025 Feb 3;20(2):132–44. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/17474930241308142>
28. Ekkert A, Šliachtenko A, Grigaitė J, Burnytė B, Utkus A, Jatužis D. Ischemic Stroke Genetics: What Is New and How to Apply It in Clinical Practice? Vol. 13, *Genes*. MDPI; 2022.
29. Li Y, Yang GY. Pathophysiology of Ischemic Stroke. In: *Translational Research in Stroke*. 2017. p. 51–75.

30. Orellana-Urzúa S, Rojas I, Líbano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. In: *Current Pharmaceutical Design*. 2020. p. 4246–60.
31. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. Vol. 38, *Neurological Sciences*. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2017. p. 1167–86.
32. Bernardo-Castro S, Sousa JA, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, et al. Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. Vol. 11, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
33. Cai W, Dai X, Chen J, Zhao J, Xu M, Zhang L, et al. STAT6/Arg1 promotes microglia/ macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice. *JCI Insight*. 2019 Oct 17;4(20).
34. Kowalski RG, Haarbauer-Krupa JK, Bell JM, Corrigan JD, Hammond FM, Torbey MT, et al. Acute Ischemic Stroke after Moderate to Severe Traumatic Brain Injury. *Stroke*. 2017 Jul 1;48(7):1802–9.
35. Zhang X, Guo Y, Fang K, Huang X, Lan D, Wang M, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in ischemic stroke: A meta-analysis of preclinical studies. *Brain Res Bull*. 2025 Feb;221:111219.
36. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017 Apr 1;35(4):851–8.
37. Xunian Z, Kalluri R. Biology and therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes. Vol. 111, *Cancer Science*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 3100–10.
38. Ibraheim H, Giacomini C, Kassam Z, Dazzi F, Powell N. Advances in mesenchymal stromal cell therapy in the management of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Feb 1;12(2):141–53.
39. Toh WS, Lai RC, Zhang B, Lim SK. MSC exosome works through a proteinbased mechanism of action. Vol. 46, *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Ltd; 2018. p. 843–53.
40. Witwer KW, Van Balkom BWM, Bruno S, Choo A, Dominici M, Gimona M, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small

- extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles*. 2019 Jan 1;8(1).
41. Lee BC, Kang I, Yu KR. Therapeutic features and updated clinical trials of mesenchymal stem cell (Msc)-derived exosomes. Vol. 10, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2021. p. 1–18.
  42. Mendt M, Rezvani K, Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. Vol. 54, *Bone Marrow Transplantation*. Nature Publishing Group; 2019. p. 789–92.
  43. Shan XQ, Luo YY, Chang J, Song JJ, Hao N, Zhao L. Immunomodulation: The next target of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the context of ischemic stroke. *World J Stem Cells*. 2023 Mar 26;15(3):52–70.
  44. Liu C, Yang TH, Li HD, Li GZ, Liang J, Wang P. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells are a potential treatment for ischemic stroke. *Neural Regen Res*. 2023 Oct 1;18(10):2246–51.
  45. Hu J, Chang Y, Peng C, Huang S, Li G, Li H. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived Neurospheres Promote Long-term functional recovery But Aggravate Acute Phase Inflammation in Experimental Stroke. *Neuroscience*. 2022 Jan;480:217–28.
  46. Wei R, Yang M, Cao Y, Qiu S, Fan X, Fang M, et al. Efficacy and Potential Mechanisms of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Ischemic Stroke in Animal Models: A Meta-Analysis. *CNS Neurosci Ther*. 2025 Apr 1;31(4).
  47. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? Vol. 11, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd; 2020.
  48. Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. Vol. 28, *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. Mary Ann Liebert Inc.; 2022. p. 966–77.
  49. Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Camacho-Cardenosa M, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Casado-Díaz A. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J Stem Cells*. 2022;14(7):453–72.
  50. Almeria C, Weiss R, Roy M, Tripisciano C, Kasper C, Weber V, et al. Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular

- Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Oct 23;7.
51. Zhang Y, Ma L, Su Y, Su L, Lan X, Wu D, et al. Hypoxia conditioning enhances neuroprotective effects of aged human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium against cerebral ischemia in vitro. Vol. 1725, *Brain Research*. Elsevier B.V.; 2019.
  52. Toyoshima A, Yasuhara T, Date I. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke. *Acta Med Okayama* [Internet]. 2017;71(4):263–8.  
Available from:  
<http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=85027265213&partnerID=8YFLogxK>
  53. Shen Z, Tang X, Zhang Y, Jia Y, Guo X, Guo X, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cell therapies for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cells Transl Med.* 2024 Sep 1;13(9):886–97.
  54. Jingli Y, Jing W, Saeed Y. *Ischemic Brain Stroke and Mesenchymal Stem Cells: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential*. Vol. 2022, Stem Cells International. Hindawi Limited; 2022.
  55. Moñivas Gallego E, Zurita Castillo M. Mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke trials. A systematic review. Vol. 27, *Regenerative Therapy*. Japanese Society of Regenerative Medicine; 2024. p. 301–6.
  56. Gong P, Zhang W, He Y, Wang J, Li S, Chen S, et al. Classification and Characteristics of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Therapeutic Mechanisms and Applications against Ischemic Stroke. Vol. 2021, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2021.
  57. Maridas DE, Rendina-Ruedy E, Le PT, Rosen CJ. Isolation, culture, and differentiation of bone marrow stromal cells and osteoclast progenitors from mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2018 Jan 6;2018(131).
  58. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Jul 2;9:3445–54.
  59. Reno Intan P, Noviantari A. Penggunaan Mencit dan Tikus Sebagai Hewan Model Penyakit Stroke. In: *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. 2022.
  60. Pittenger, M. F., et al. . *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 284(5411), 143–147. 1999.

61. Zuk, P. A., et al. . *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Engineering*, 8(5), 677–685. 2002.
62. Bourne JH, Suthya AR, Wanrooy BJ, et al. Microglia are prominent producers of inflammatory cytokines during the hyperacute phase of ischemic stroke. *Commun Biol.* 2025;8:1193.
63. Yu H, Xu Z, Qu G, Wang H, Lin L, Li X, et al. Hypoxic preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells-derived conditioned medium in switching microglia toward anti-inflammatory polarization in ischemia/reperfusion. *Cell Mol Neurobiol.* 2021;41(3):505-524.
64. Schepici G, Gugliandolo A, Mazzon E. Mesenchymal stromal cells preconditioning: a new strategy to improve neuroprotective properties. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4):2088.
65. Cheng Q, Zhang Z, Zhang S, Yang H, Zhang X, Pan J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation. *Brain Res.* 2015;1594:293-304.
66. Zhang Z, Zou X, Zhang R, Xie Y, Feng Z, Li F, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a-5p reduces microglial-mediated neuroinflammation via suppression of the IRAK1/TRAF6 signaling pathway after ischemic stroke. *Aging (Albany NY).* 2021;13(2):3060-3079.
67. Liu YY, Chiang CH, Hung SC, Chian CF, Tsai CL, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion-induced lung injury. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187637.
68. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(5):834-851.
69. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(9):653-664.

70. Wei ZZ, Zhu YB, Zhang JY, McCrary MR, Wang S, Zhang YB, et al. Priming of the cells: hypoxic preconditioning for stem cell therapy. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(19):2361-2374.

71. Liu J, He J, Huang Y, Ge L, Xiao H, Zeng L, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate microglial pyroptosis after intracerebral hemorrhage. *Ann Transl Med*. 2021;9(17):1362.

