

**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP
KADAR TGF- β PADA PENYEMBUHAN LUKA
FASE INFLAMASI DAN PROLIFERASI**

**Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur
Wistar Jantan yang Dieksisi pada hari ke 3, 6 dan 9**

**EFFECT OF HYPOXIA PRECONDITIONED MSC
ON TGF-B LEVEL IN WOUND HEALING
INFLAMMATION AND PROLIFERATION PHASE
IN RATS.**

**Experimental Study In Vivo on White Male Wistar
Rat that excision onday 3, 6, and 9.**

¹Nandiah Fatimah*, ²Agung Putra, ³Azizah Hikmah Savitri

^{1,2,3}Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang

*Corresponding Author:

fatimah26nandiah@gmail.com

ABSTRAK

Luka akut yang normalnya dapat sembuh dengan cepat bisa saja berubah menjadi kronis dan menghasilkan jaringan parut sehingga membutuhkan terapi alternatif. Salah satu terapi alternatifnya adalah Mesechymal Stem Cell (MSC) normoksia. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.

Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimental post test only control group design. Sampel penelitian ini merupakan 20 ekor tikus putih jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel dibagi menjadi empat kelompok berisi sham, kontrol dengan phospat buffer saline, MSC normoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel, dan MSC hipoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel. Analisa data menggunakan uji beda uji One Way Anova.

MSC hipoksia tidak berpengaruh terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi berdasarkan p value = 0,083.

Kesimpulan dari peneliian ini adalah tidak didapatkan pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.

Kata kunci : luka akut, MSC, MSC hipoksia, TGF- β

ABSTRACT

Acute wound should be heal naturally except some of situation where the wound continous to be chronic and produce scars, so the wound need alternative therapy One of the alternative theraphy is normoxia Mesenchymal Stem Cell (MSC). The aim of this research is to get known the effect of hypoxia MSC on TGF- β level in wound healing inflammation and proliferation phase.

The methods on this research is experimental research by post test only control group design. The sample of this research is 20 white male wistar rats that fulfil the inclusion and exclusion criterias. The samples divided into four groups, the sham, the control with phospat buffer saline, normoxia MSC with 1.5×10^6 cells dose, and hypoxia MSC with 1.5×10^6 cells dose consecutively. The data analyse using One Way Anova.

Hypoxia MSC has no effect on TGF- β level in wound healing inflammation and proliferation phase based on p value = 0.083.

The conclusion of this study is hypoxia MSC has no effect on TGF- β level in wound healing inflammation and proliferation phase

Keywords : *acute wound, MSC, hypoxia MSC, TGF- β*

PENDAHULUAN

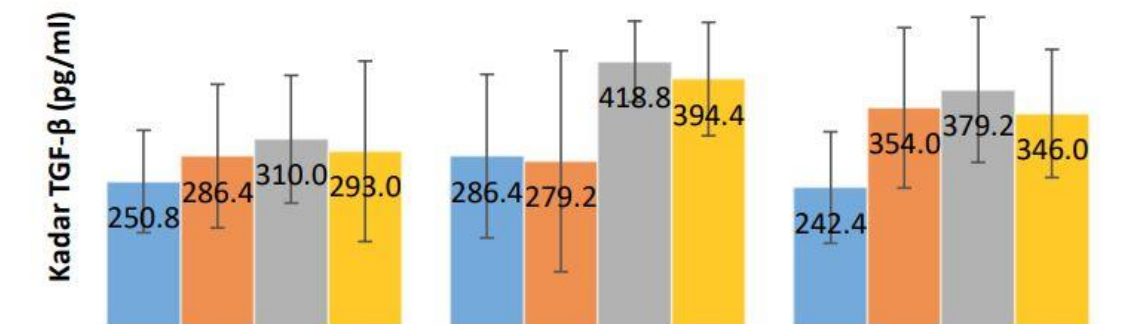
Luka adalah hilangnya kontinuitas epidermis, yang disebabkan oleh cedera mekanis, kimiawi, biologis, atau termal. Penyembuhan luka kulit adalah proses fisiologis yang sangat terorganisir yang memulihkan integritas kulit setelah cedera (Hu *et al.*, 2014). Permasalahan muncul ketika penyembuhan luka terganggu sehingga menyebabkan luka berkembang menjadi kronik dan munculnya jaringan parut. Metode yang saat ini paling banyak dikaji untuk menyembuhkan luka adalah mesenchymal stem cell (MSC) karena memiliki kemampuan diferensiasi serta mampu mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan yang berguna bagi penyembuhan luka, termasuk Transforming Growth Factor beta (TGF beta) (Aydemir *et al.*, 2016). Namun di sisi lain, penelitian terkini menyebutkan bahwa MSC yang dikultur dalam kondisi normoksia tidak mampu bertahan hidup pada area luka yang memiliki kondisi hipoksia. Oleh karena itu diperlukan metode untuk meningkatkan kemampuan bertahan hidup MSC pada area luka

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan "post test only control group design" dengan menggunakan hewan coba. Sampel pada penelitian adalah 20 tikus putih jantan galur Wistar. Cara pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *randomized sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dirandomisasi dan dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu: Kelompok I (sham, tidak diberikan perlakuan), Kelompok II (kontrol, pemberian phospat buffer saline /PBS), Kelompok III (pemberian MSC normoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel), Kelompok IV (pemberian MSC hipoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel).

Prosedur penelitian dengan cara isolasi MSC dari *umbilical cord*, kultur sel, pemanenan sel, penghitungan sel, pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan *Flow Cytometry*, prosedur hipoksia, perlakuan pada hewan coba, penghitungan kadar TGF- β lalu analisa data dengan cara data yang akan diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, selanjutnya dilakukan uji deskriptif meliputi variabel bebas yang menggunakan skala data rasio dan variabel tergantung yang menggunakan skala data rasio. Setelah dilakukan uji deskriptif kemudian dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji Shapiro Wilk dan uji varian data menggunakan uji Levene. Bila didapatkan sebaran data normal ($p > 0,05$) dan varian data sama ($p > 0,05$), maka akan dilakukan uji beda uji One Way Anova. Bila uji One Way Anova diperoleh nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Bila terdapat sebaran data tidak normal ($p < 0,05$) dan varian tidak sama ($p < 0,05$), maka dilakukan uji Kruskal Wallis. Bila uji Kruskal Wallis diperoleh nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

HASIL PENELITIAN



Tabel 4.1. Hasil Uji *Shapiro Wilk* dan *Levene Test*

Hari Pengamatan	Jenis Perlakuan	<i>p-value</i>	
		<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene Test</i>
Hari ke-3	Sham	0,494	0,801
	Kontrol	0,447	
	P1	0,619	
	P2	0,413	
Hari ke-6	Sham	0,889	

	Kontrol	0,391
		0,092
	P1	0,645
	P2	0,876
Hari ke-9	Sham	0,293
	Kontrol	0,966
		0,806
	P1	0,830
	P2	0,083*

Keterangan: * = setelah ditransformasi ke log₁₀

Tabel 4.2. Hasil Uji *One Way Anova*
Perbedaan Kadar TGF- β antar Kelompok pada Tiap Waktu Pengamatan

Hari pengamatan	<i>p-value</i>	Keterangan
Hari ke-3	0,814	Tidak signifikan
Hari ke-6	0,123	Tidak signifikan
Hari ke-9	0,160	Tidak signifikan

PEMBAHASAN

Hasil deskriptif penelitian ini menunjukkan bahwa dalam beberapa waktu pengamatan, kadar TGF- β pada kelompok kontrol relatif lebih tinggi daripada di kelompok sham, sehingga dapat diartikan bahwa pembuatan luka eksisi cenderung menyebabkan peningkatan kadar TGF- β . TGF- β cenderung tinggi pada kelompok kontrol karena sejak jam pertama pembuatan perlukaan termasuk dalam fase inflamasi dari proses penyembuhan luka yang normal (Al-Shaibani *et al.*, 2016). Pada fase inflamasi TGF- β terekspresi tinggi karena banyak disekresi oleh makrofag akibat munculnya molekul-molekul DAMP oleh kerusakan atau kematian sel sebagai dampak dari perlukaan (Yolanda *et al.*, 2014).

Injeksi MSC dalam dosis $1,5 \times 10^6$ baik dalam kondisi normoksia maupun hipoksia menghasilkan kadar TGF- β yang juga cenderung lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini terjadi karena MSC memiliki peran imunomodulator yang dapat menstimuli perubahan makrofag tipe I (M1) menjadi makrofag tipe II (M2). M2 selain mensekresi molekul-molekul antiinflamasi seperti IL-10 juga berperan dalam mensekresi TGF- β (Isakson *et al.*, 2015; Putra *et al.*, 2018).

Pada injeksi MSC hipoksia, kadar TGF- β yang teramati cenderung lebih rendah daripada di kelompok injeksi MSC normoksia. Hal tersebut disebabkan karena dalam kondisi

hipoksia MSC diregulasi oleh sinyal HIF-1 α (Hawkins *et al.*, 2013). HIF-1 α menurunkan kadar ROS di mitokondria MSC sehingga meningkatkan aktivasi NF κ B. HIF-1 α juga menstimuli sintesis protein PrPC (Silva *et al.*, 2018). Aktivasi NF κ B dan produksi PrPC meningkatkan faktor pertumbuhan salah satunya TGF- β (Madrigal *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). Peningkatan TGF- β dalam kondisi luka berpotensi menghasilkan percepatan proses penyembuhan ke fase berikutnya yaitu fase proliferasi (Gilbert *et al.*, 2016).

Perbedaan kadar TGF- β yang tidak signifikan antar kelompok dan berbagai waktu pengamatan dapat disebabkan karena dosis perlakuan yang diberikan belum mencapai dosis terapi. Pada penelitian ini dosis MSC yang diberikan yaitu $1,5 \times 10^6$ sel. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Istiqomah *et al.* didapatkan hasil bahwa injeksi MSC normoksia dan hipoksia dalam dosis lebih tinggi yaitu 3×10^6 dapat menurunkan kadar TGF- β yang signifikan mulai dari hari ke-3, ke-6 dan ke-9 pada tikus wistar model luka eksisi (Istiqomah *et al.*, 2022). Penurunan kadar TGF- β tersebut menunjukkan bahwa injeksi MSC mempercepat peralihan dari fase inflamasi ke fase proliferasi. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa pemberian MSC hipoksia sebanyak 3×10^6 dapat mempercepat proses penutupan luka yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar PDGF dan densitas kolagen pada hari ke-6 dan 9 setelah perlukaan (Daryanti *et al.*, 2021).

Perbedaan kadar TGF- β antar perlakuan dan waktu pengamatan yang tidak bermakna juga dapat terjadi karena TGF- β terekspresi di tiap-tiap fase proses penyembuhan luka dan terlibat dalam regulasi berbagai proses perbaikan jaringan seperti produksi ECM, protease, penghambat protease, migrasi, kemotaksis, proliferasi makrofag, fibroblas granulasi jaringan, sel endotel epitel serta kapiler melalui pensinyalan SMAD (Valluru *et al.*, 2011). Sebab tersebut menjadi salah satu keterbatasan penelitian ini yaitu tidak ada data terkait SMAD yang dapat mengkonfirmasi lama fase inflamasi serta fase proliferasi.

Injeksi MSC hipoksia dalam dosis $1,5 \times 10^6$ pada model tikus luka eksisi ini tidak menghasilkan perbedaan kadar TGF- β yang signifikan ketika dibandingkan dengan tikus luka eksisi yang diinjeksi MSC normoksia, maupun pada tikus luka eksisi yang tidak diobati dan tikus normal. Penyebab yang mungkin adalah karena dosis MSC yang digunakan belum mencapai dosis terapi atau dapat juga karena fase dimana kadar TGF- β banyak terekspresi sudah terlewati dan terjadi percepatan proses penyembuhan luka yang masih perlu dibuktikan dengan penelitian lebih lanjut menggunakan marker penyembuhan luka lainnya misalnya dari jumlah fibroblas, kadar kolagen, pembuluh darah baru dan lain-lain.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. MSC hipoksia tidak berpengaruh terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi.
2. Kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi di kelompok sham pada pengamatan hari ke-3, ke-6 dan ke-9 masing-masing adalah sebesar $250,8 \pm 71,8$; $286,4 \pm 114,5$ dan $242,4 \pm 78$ pg/ml.

3. Kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi di kelompok kontrol (tikus luka eksisi) pada pengamatan hari ke-3, ke-6 dan ke-9 masing-masing adalah sebesar $286,4 \pm 100,6$; $279,2 \pm 154,8$ dan $354,0 \pm 112,3$ pg/ml.
4. Kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi di kelompok tikus luka eksisi yang diinjeksi MSC normoksia pada pengamatan hari ke-3, ke-6 dan ke-9 masing-masing adalah sebesar $310,0 \pm 89,4$; $418,8 \pm 56,6$ dan $379,2 \pm 101,7$ pg/ml.
5. Kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase inflamasi dan proliferasi di kelompok tikus luka eksisi yang diinjeksi MSC hipoksia pada pengamatan hari ke-3, ke-6 dan ke-9 masing-masing adalah sebesar $293,0 \pm 126,4$; $394,4 \pm 79,4$ dan $346,0 \pm 89,8$ pg/ml.

Saran

Pada penelitian mendatang dapat dilakukan pengamatan mengenai pengaruh injeksi MSC hipoksia dalam dosis $1,5 \times 10^6$ terhadap proses-proses yang terkait dengan perbaikan jaringan yang diinisiasi oleh TGF- β melalui pensinyalan SMAD seperti produksi ECM, protease, penghambat protease, tingkat migrasi, tingkat kemotaksis, jumlah makrofag, fibroblas granulasi jaringan, sel endotel epitel serta kapiler.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shaibani, M.B.H., Wang, X., Lovat, P.E. & Dickinson, A.M. 2016. Cellular Therapy for Wounds: Applications of Mesenchymal Stem Cells in Wound Healing. *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*.
- Astawa INM. 2018. *Dasar Dasar Patobiologi Molekuler Apoptosis Dan Onkogenesis*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Aydemir I, Öztürk S, Sönmez KP, Tuglu MI. 2016. Mesenchymal stemcells in skin wound healing. *Anatomy*. 10:228-234.
- Balitbang Kemenkes RI, 2013, *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*, Balitbang Kemenkes RI, Jakarta.
- Gilbert RWD, Vickaryous MK, Vilorio-Petit AM. 2016. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J. Dev. Biol.* 4(2).
- Glenn JD, Whartenby KA. 2014. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 6:526–39.
- Silva LHA, Antunes MA, Santos CCD, Weiss DJ, Cruz FF, Rocco PRM. 2018. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. *Stem Cell Research & Therapy*. 9(45).

- Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Sa'dyah NAC, Tjipta A, Chodidjah. 2020. The role of hypoxic mesenchymal stem cells conditioned medium in increasing vascular endothelial growth factors (vegf) levels and collagen synthesis to accelerate wound healing. *Indones. J. Cancer Chemoprevent.* 11(3):134-143.
- Textor JA, Clarck KC, Walker NJ, Aristizobal FA, Kol A, Lejeune SS, Bledsoe A, Davidyan A, Gray SN, Bohannon-Worsley LK, Borjesson DL. 2018. Allogeneic stem cells alter gene expression and improve healing of distal limb wounds in horses. *Stem Cells Translational Medicine.* 7:98-108.
- Valluru, M., Staton, C.A., Reed, M.W.R. & Brown, N.J. 2011. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Frontiers in Physiology*, 2(November): 1–12.
- Yolanda M, Maria A, Amaia F, Marcos PB, Silvia PL, Dolores E, Jesús O. 2014. Adult stem cell therapy in chronic wound healing. *J Stem Cell Res Ther* 4:1.
- Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. 2019. Hypoxia enhances self- renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Univ Med* 2019;38:16