

TESIS

**EFEKTIVITAS PENYEMBUHAN OTOT KERANGKA
PASCA CEDERA DENGAN TERAPI ALLOGENIC
BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL
(BM-MSC) PADA KELINCI WHITE
NEW-ZEALAND (*Oryctolagus cuniculus*)
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



Oleh :

AGUNG PRASETYO LEGOWO
NIM 061044001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**EFEKTIVITAS PENYEMBUHAN OTOT KERANGKA
PASCA CEDERA DENGAN TERAPI *ALLOGENIC
BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL
(BM-MSC)* PADA KELINCI *WHITE
NEW-ZEALAND (Oryctolagus cuniculus)***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

AGUNG PRASETYO LEGOWO

NIM 060944001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

**Efektivitas Penyembuhan Otot Kerangka Pasca Cedera dengan Terapi
Allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) pada Kelinci *White
New-Zealand (Oryctolagus cuniculus)***

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



Surabaya, 27 Februari 2013

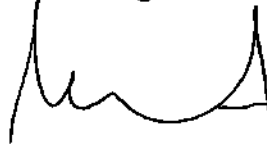
AGUNG PRASETYO LEGOWO

NIM 060944001

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 27 Februari 2013

Oleh:
Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

NIP. 195910031987011001

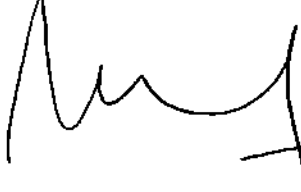
Pembimbing



Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes.

NIP. 195908081987012001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

NIP. 195910031987011001

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 27 Februari 2013

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Eduardus Bimo Aksono, Drh., M.Kes.

Anggota : 1. Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, Drh., M.Sc.

2. Dr. Socharsono, Drh., M.Si.

3. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

4. Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes.

Surabaya, 27 Februari 2013

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D.

NIP. 195612161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **Efektivitas Penyembuhan Otot Kerangka Pasca Cedera dengan Terapi *Allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC)* pada Kelinci *White New-Zealand (Oryctolagus cuniculus)*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Romziah Sidik, Drh., Ph.D., dan Ketua Program Studi S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh., atas kesempatan mengikuti pendidikan di Program Studi S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh., selaku pembimbing pertama dan Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes., selaku pembimbing kedua atas segala bimbingan, saran dan motivasi yang tiada henti.

Dr. Eduardus Bimo Aksono, Drh., M.Kes., selaku komisi penilai I, Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, Drh., M.Sc., selaku komisi penilai II, Dr. Soeharsono, Drh., M.Si., selaku komisi penilai III.

Seluruh Staf pengajar S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan Magister.

Seluruh Staf laboratorium Stem Cell – Institut of Tropical Disease Universitas Airlangga atas partisipasi dan motivasi selama menjalankan penelitian.

Seluruh Staf laboratorium Patologi - Departemen Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bimbingan selama penelitian.

Bapak terhormat Bambang Haryono, S.Sn. dan Ibu tersayang Nurdyaningsih, S.Pd., adik terhebat Arga Satria W., atas dukungan materi, motivasi dan do'a.

Istri tercinta Eka Marta P.R., Amd. Keb., anak tercinta M.Raffi A. Buana, bapak Drs. Sundarianto, M.Pd., ibu Lilik Sumarmi, S.Pd., atas semangat dan do'a.

Pimpinan dan seluruh Staf La'Femur Pet House Surabaya, seluruh musuh dan sahabat yang aku sayangi atas dukungan dan segala do'a.

Besar harapan penulis agar tulisan ini memberi manfaat bagi yang membaca.

Surabaya, Februari 2013

Penulis

RINGKASAN

RINGKASAN

Efektivitas Penyembuhan Otot Kerangka Pasca Cedera dengan Terapi *Allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC) pada Kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*)

Kerusakan struktur sabut otot seringkali digantikan formasi jaringan fibrous sehingga menurunkan kontraksi dan fungsi otot. Otot kerangka mempunyai sel satelit yang mampu berdiferensiasi menjadi sel miosit tetapi sering tumpang tindih dengan pembentukan jaringan fibrous. Beberapa penelitian mengungkapkan keberhasilan *autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC) dalam terapi berbagai penyakit degenerasi dan perbaikan jaringan, tetapi pada *allogenic* belum banyak diketahui. BM-MSC diketahui memiliki imunogenisitas rendah yang memungkinkan aplikasi *allogenic* tanpa reaksi penolakan. BM-MSC mengekspresikan antigen permukaan CD105⁺ dan CD45⁻. BM-MSC dapat berdiferensiasi menjadi osteosit, kondrosit, adiposit, tenosit dan miosit serta mempunyai kemampuan menuju target dan akan memperbaiki jaringan yang mengalami cedera.

Penelitian ini bertujuan untuk menilai efektivitas penyembuhan otot kerangka pasca cedera dengan terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC) pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*). Efektivitas terapi dinilai berdasarkan lama waktu penyembuhan luka dan jumlah sel radang, angiogenesis dan mioblas pada daerah penyembuhan (*healing centre*) dengan pengamatan histopatologis menggunakan pewarnaan HE.

BM-MSC yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari donor dalam satu spesies (*allogenic*). Ekspansi *Allogenic* BM-MSC dilakukan secara *in vitro* pada media α - Minimum Essential Medium (α -MEM). Keberhasilan kultur MSC dikonfirmasi dengan pemeriksaan imunositokimia dan *flowcitometry*.

Delapan belas ekor kelinci *White New-Zealand* jantan dibagi dalam dua kelompok perlakuan P dan K dengan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design*, dibuat cedera manipulatif pada otot gluteus eksternus dengan panjang dan dalam 1x1cm. Sembilan ekor kelinci kelompok P diinjeksi lokal dengan 2×10^6 *allogenic* BM-MSC. Kelompok K terdiri dari sembilan ekor kelinci digunakan sebagai kontrol perlakuan tanpa terapi. Pengamatan makroskopis hari ke-1 sampai 14 dilakukan untuk melihat kesembuhan cedera. Hari ke-14 dilakukan biopsi jaringan 1x1x1cm yang digunakan untuk preparat histopatologi. Data yang diperoleh dianalisis multivariansi menggunakan *Hotelling's trace* (*multiple independent T-Test*).

Hasil penelitian menunjukkan keberhasilan kultur MSC yang dikonfirmasi dengan hasil positif pewarnaan imunositokimia dan analisis *flowcytometry*. Sel imunoreaktif memancarkan warna hijau (CD105⁺). Analisis *flowcytometry* menunjukkan sekelompok sel dengan penanda CD105⁺ *confluent* 95%. Hasil analisis multivariansi menunjukkan perbedaan nyata antara perlakuan dan kontrol. Terapi *allogenic* BM-MSC menunjukkan waktu penyembuhan cedera lebih cepat dari

kelompok kontrol. Waktu penyembuhan luka pada kelompok perlakuan diperoleh rerata 7,44 hari sedangkan pada kelompok kontrol rata-rata dalam 12,67 hari. Terapi *allogenic* BM-MSC menunjukkan rata-rata jumlah sel radang 22,89 lebih sedikit dari kontrol sebanyak 35,11. Pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) kelompok perlakuan diperoleh jumlah rata-rata 23,11 dan kelompok kontrol 34,22. Jumlah mioblas kelompok perlakuan lebih banyak dengan rata-rata 94,56 sedangkan pada kelompok kontrol hanya 38,33.

Kesimpulan penelitian ini adalah terapi *allogenic* BM-MSC efektif dalam penyembuhan cedera otot kerangka pada kelinci dibandingkan tanpa terapi. Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan terapi *allogenic* BM-MSC dengan terapi lain yang telah sukses dilakukan pada kasus cedera otot kerangka.

SUMMARY

The Effectiveness of Skeletal Muscle Healing after Injury with Allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) in White New-Zealand Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

Destruction of myofiber structure often repair with scar and fibrous formation result decrease muscle contraction and function. Skeletal muscle have original quiescent satellite cell that capable to differentiate in to myocyte, but often overlap with fibrous formation. Recent study shown good deal in application of autologus Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) on regeneratif diseases and tissue engineering but still curious in allogenic. BM-MSC have low immunogenicity that allow allogenic application without rejection. BM-MSC expressing surface marker CD105⁺ and CD45⁻. BM-MSC have capabilities to differentiate into mesenchyme lineage such as osteocyte, chondrocyte, adipocyte, tenocyte and myocyte and home to site of injury then begin repair damaged tissue.

The aim of this research were to find out the effectiveness of skeletal muscle healing after injury with allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) in White New-Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Therapy effectiveness beside on the day that wound completely healed and total number of inflammatory cell, angiogenesis and myoblast on the healing centre with histopathological examination in HE staining.

This research were used BM-MSC from another animal in one species (allogenic). In vitro expand of allogenic BM-MSC were used α - Minimum Essential Medium (α -MEM) as culture medium. Succesful MSC growth confirmed with immunocytochemistry and flowcytometry.

Eighteen male white New-Zealand rabbit devided into two equal groups P and K with Randomized Post Test Only Control Group Design. an Artificial injury was made by incission gluteus eksternus muscle about 1x1cm in lenght and deepness. Nine rabbit in P group injected with 2×10^6 BM-MSC from donor and in other group as control with any therapy. Makroskopik evaluation from day 1 until the day that wound completely healed. Muscle tissue biopsy 1x1x1 cm taken in day 14 then fixed with HE staining for histopathological examination. All data were collected and analyzed with Hotelling's trace (multiple independent T-Test).

This research showed succesfull MSC culture that was confirmed with immunocytochemistry and flowcytometry analysis. immunoreactive cell expressing green color in fousesence microscope (CD105⁺). Flowcytometry result population cell with CD105⁺ marker confluent 95%. Multivariate analysis result significant different between treatment and control group. Allogenic BM-MSC therapy showed faster healing time than control. Mean of healing time in treatment group 7,44 day, while control as mean 12,67 day. Inflammatory cell count as mean result 22,89 cell in treatment group then 35,11 in control. Angiogenesis as mean 23,11 founded in

treatment group and 34,22 in control. Mean count of myoblast cell 94,56 in treatment group and 38,33 in control.

Result of this research showed application of allogenic BM-MSC effective against skeletal muscle healing after injury in rabbit than without therapy. Furthermore, important to compare treatment using allogenic BM-MSC with another successful therapy in skeletal muscle healing.

**THE EFFECTIVENESS OF SKELETAL MUSCLE HEALING AFTER
INJURY WITH ALLOGENIC BONE MARROW MESENCHYMAL
STEM CELL (BM-MSC) IN WHITE NEW-ZEALAND
RABBIT (*Oryctolagus cuniculus*)**

Agung Prasetyo Legowo

ABSTRACT

Destruction of myofiber structure often repair with scar and fibrous formation result decrease muscle contraction and function. Recent study shown good deal in application of autologus Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) on regeneratif diseases and tissue engineering. BM-MSC have low immunogenicity that allow allogenic application without rejection. BM-MSC have capabilities to differentiate into osteocyte, chondrocyte, adipocyte, tenocyte and myocyte. Eighteen male white New-Zealand rabbit devided into two equal groups P and K with Randomized Post Test Only Control Group Design. Nine rabbit in P group injected with 2×10^6 allogenic BM-MSC after artificial injury on gluteus externus muscle and other as control. Macroscopic evaluation from day 1 until the day that wound completely healed. Histopathological examination with HE staining to count number of inflamatory cell, angiogenesis and myoblast. Statistical analized with Hotelling's trace, result significant different ($p > 0,05$) between allogenic BM-MSC treatment and control. Allogenic BM-MSC treatment decrease number inflamatory cell, angiogenesis and increase number of myoblast then healing time better than control. It can be concluded that application of allogenic BM-MSC effective to skeletal muscle healing after injury.

Key words : allogenic BM-MSC, rabbit, skeletal muscle healing

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
PRASARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2. Tujuan khusus.....	8
1.4 Manfaat Penelitian.....	9
1.4.1 Manfaat teoritis.....	9
1.4.2 Manfaat praktis.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Otot Kerangka.....	10
2.2 Cedera Otot Kerangka.....	11
2.3 Patofisiologi Cedera dan Penyembuhan Otot Kerangka.....	12
2.3.1 Degenerasi.....	15
2.3.2 Inflamasi.....	16
2.3.3 Regenerasi.....	17
2.3.4 Fase fibrosis.....	18
2.4 Problema Penyembuhan Cedera Otot Kerangka.....	19

2.5	Stem Cell.....	21
2.6	Mesenchymal Stem Cell.....	23
2.6.1	Isolasi mesenchymal stem cell.....	24
2.6.2	Karakteristik fenotip.....	25
2.6.3	Karakteristik diferensiasi.....	26
2.6.4	Respon imun mesenchymal stem cell dengan sel host.....	27
2.6.5	Mekanisme homing.....	28
2.6.6	Aplikasi terapeutik dengan mesenchymal stem cell.....	28
2.7	Kelinci putih New-Zealand.....	29
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..		30
3.1	Kerangka Konseptual.....	30
3.2	Hipotesis Penelitian.....	33
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....		35
4.1	Tempat Penelitian Dan Waktu Penelitian.....	35
4.1.1	Tempat penelitian.....	35
4.1.2	Waktu penelitian.....	35
4.2	Rancangan Penelitian.....	35
4.3	Sampel Dan Besar Sampel.....	36
4.4	Variabel Dan Definisi Operasional.....	37
4.4.1	Variabel penelitian.....	37
4.4.1.1	Variabel bebas.....	37
4.4.1.2	Variabel tergantung.....	37
4.4.1.3	Variabel kendali.....	37
4.4.2	Definisi Operasional Penelitian.....	37
4.4.2.1	Dosis injeksi BM-MSC.....	37
4.4.2.2	Lama waktu penyembuhan.....	38
4.4.2.3	Jumlah sel radang.....	38
4.4.2.4	Jumlah angiogenesis.....	38
4.4.2.5	Jumlah mioblas.....	38
4.5	Prosedur Penelitian.....	39
4.5.1	Aspirasi bone marrow.....	39
4.5.2	Kultur mesenchymal stem cell.....	39
4.5.3	Pewarnaan imunositokimia.....	41
4.5.4	Analisis flowcytometry.....	41
4.5.5	Mobilisasi BM-MSC ke daerah cedera.....	42
4.5.6	Biopsi jaringan otot.....	42
4.5.7	Pewarnaan jaringan dengan HE.....	42
4.6	Alur Kerja Penelitian.....	44

4.7	Pengamatan dan Analisis Data.....	45
BAB 5	HASIL PENELITIAN.....	46
5.1	Isolasi Dan Identifikasi BM-MSC	46
5.2	Karakterisasi BM-MSC	48
5.2.1	Hasil pewarnaan imunositokimia	48
5.2.2	Hasil analisis floctometri	49
5.3	Hasil pemeriksaan dan analisis data.....	49
BAB 6	PEMBAHASAN.....	56
6.1	Isolasi Dan Identifikasi BM-MSC.....	56
6.2	Karakterisasi BM-MSC.....	57
6.2.1	Pewarnaan imunositokimia.....	57
6.2.2	Analisis floctometri.....	58
6.3	Lama Waktu Penyembuhan Cedera.....	58
6.4	Pemeriksaan Histopatologi Jaringan Otot.....	60
6.4.1	Jumlah sel radang.....	61
6.4.2	Angiogenesis.....	63
6.4.3	Mioblas.....	65
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
7.1	Kesimpulan.....	67
7.2	Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA.....		68
LAMPIRAN.....		75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Data perbandingan kelompok perlakuan dan kontrol.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Susunan Otot Kerangka.....	10
2.2 Proses Penyembuhan Cedera.....	14
2.3 Ilustrasi Proses Penyembuhan Otot Kerangka.....	19
2.4 Diferensiasi <i>Inner Cell Mast</i> (ICM).....	22
2.5 Diferensiasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	23
2.6 Diferensiasi BM-MSC.....	26
4.1 Gambar Skema Rancangan Penelitian.....	35
4.2 Gambar Skema Alur Kerja Penelitian.....	44
5.1. Hasil Sentrifugasi Ficol.....	46
5.2 Hasil Pengamatan Kultur <i>Stem Cell</i>	47
5.3 Pengamatan Mikroskop Flouresence	48
5.4 Grafik Flowcytometry.....	49
5.5 Diagram Hasil Penelitian.....	50
5.6 Perbandingan Kesembuhan Kulit.....	51
5.7 Respon Penyembuhan Pada Pada Kelompok Kontrol.....	52
5.8 Healing Center Kelomok Kontrol.....	53
5.9 Respon Penyembuhan Pada Kelompok Perlakuan.....	53
5.10 Perbandingan Morfologi Sel Otot Muda.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Pemeriksaan Histopatologi.....	75
2. Analisis Multivariate.....	84
3. Sertifikat Laik Etik.....	90

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

APC	: Antigen Presenting Cell
BM-HSC	: Bone Marrow - Hematopoetic Stem Cell
BM-MSC	: Bone Marrow - Mesenchymal Stem Cell
BMSC's	: Bone Marrow derived Stem Cell's
Ca²⁺	: Calcium
CCR	: Chemokine Reseptor
CD	: Cluster Differentiation
COX	: Cikloxygenase
CXCR	: Chemokine Reseptor
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC	: Flouresence Isothiocyanate
HE	: Hematoxylin Eosin
HEGF	: Heparin Like Endhotelialgrowth Factor
HIF	: Hipoxia Inducible Factor
HLA	: Human Leukocyte Antigen
ICM	: Intra Cellular Matrix
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin
MCP	: Monocyte Chemoattractant Protein
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MSC	: Mesenchymal Stem Cell
NGF	: Nervous Growth Factor
NK	: Natural Killer
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	: Phospate Buffer Saline
PDGFR	: Platelet Derived Growth Factor Receptor
TGF	: Tumor Growth Factor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
SDF	: Stromal cell-Derived Factor

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Otot kerangka merupakan jaringan terbesar pada mamalia dengan berat 45% - 55% dari total berat tubuh dengan fungsi vital sebagai alat penopang dan penggerak kerangka (Angione *et al.*, 2011). Sebagian besar bagian terluar tubuh mamalia tersusun atas jaringan otot. Cedera pada otot kerangka baik berat maupun ringan, merupakan peristiwa yang selalu menyertai dan menduduki peringkat yang pertama pada setiap kejadian kecelakaan yang mengakibatkan trauma fisik. Penanganan medis pasca cedera pada jaringan otot kerangka selama ini cenderung kurang spesifik, karena umumnya hanya bersifat menghambat kerusakan jaringan lebih lanjut tanpa mengembalikan komposisi seperti semula. Komplikasi dan keterlambatan proses penyembuhan cedera otot sering mengakibatkan pembentukan jaringan fibrous dan jaringan ikat lain sebagai pengganti sabut otot yang rusak, sehingga mengakibatkan menurunnya daya kontraksi otot sebagai fungsi utama jaringan (Morrisey *et al.*, 2002).

Proses penyembuhan cedera otot meliputi empat tahapan penting yang sering tumpang tindih yaitu; degenerasi, inflamasi, regenerasi dan fibrosis (Falanga, 2005). Tahap paling krusial dalam proses penyembuhan cedera otot adalah fase regenerasi. Regenerasi merupakan suatu proses yang ditandai oleh penggantian jaringan rusak menjadi jaringan yang sama, tetapi proses ini sering mengalami kegagalan yang mengakibatkan terjadinya fibrosis lebih awal. Kegagalan proses regenerasi diduga akibat ketidakseimbangan sitokin, respon sel

radang setempat dan kegagalan angiogenesis (Boulton *et al.*, 2005). Pembentukan jaringan fibrous selalu menyertai proses penyembuhan cedera otot, namun demikian jaringan fibrous yang berlebihan menyebabkan daya kontraksi otot menurun.

Penelitian menggunakan sel punca (*stem cell*) sebagai metode baru terapi regeneratif berbasis sel mengalami perkembangan yang signifikan lebih dari dua dekade terakhir. *Stem cell* merupakan sel progenitor yang bersifat multipoten sehingga mampu berdiferensiasi menjadi beberapa macam jaringan. *Stem cell* dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa seperti tulang periosteum, tulang trabekula, jaringan lemak, pulpa gigi serta sumsum tulang. Salah satu *stem cell* dewasa yang merupakan bagian dari *Bone Marrow Derived Stem Cell's* (BMSC's) yaitu *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC). BM-MSC telah banyak dikembangkan sebagai model terapi beberapa macam penyakit, namun demikian secara umum pemanfaatan *stem cell* sebagai metode terapi berbasis sel, masih perlu terus dikembangkan dan dievaluasi guna mencapai hasil yang lebih optimal (Wu *et al.*, 2007).

Pemanfaatan BM-MSC pada cedera otot kerangka merupakan model terapi terkini yang memungkinkan terjadinya penyembuhan yang lebih baik dimana sabut otot yang rusak dapat digantikan seperti semula. Menurut Pittenger *et al.* (2002), BM-MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, kondrosit, adiposit, tenosit dan miosit. BM-MSC mempunyai kemampuan untuk masuk sirkulasi menuju target menyesuaikan diri dengan lingkungan mikro, yang

selanjutnya akan memperbaiki kerusakan yang terjadi (McTaggart dan Atkinson, 2007; Miguel *et al*, 2001; Rantam dkk, 2009; Zubko dan Frishman, 2009).

Beberapa hal penting tentang pemanfaatan BM-MSC telah berhasil diungkap, yaitu antara lain tentang teknik isolasi, karakterisasi serta kontrol terhadap diferensiasinya, namun demikian, dalam rangka pemanfaatannya untuk pengobatan, masih terdapat banyak permasalahan yang harus diketahui. Permasalahan penting tersebut meliputi mekanisme respon imun *host* terhadap sel yang diimplantasikan, *homing mechanism* yaitu mekanisme yang menjelaskan tentang perjalanan sel yang diimplantasikan hingga sampai ke lokasi jaringan yang cedera sebagai target, serta pengaruh berbagai senyawa lokal (*micro environment*) terhadap proses diferensiasi dari sel yang diimplantasikan (Barry dan Murphy, 2003). Keberhasilan terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* didasarkan pada ada tidaknya penolakan dan integrasinya dengan sel *host*. *Autologus Mesenchymal Stem Cell* telah sukses digunakan secara klinis, tetapi pada *allogenic Mesenchymal Stem Cell* belum diperlihatkan secara jelas (Chidgey *et al.*, 2008; Stojanoski *et al.*, 2008; Baratawijaya, 2010). BM-MSC mempunyai sifat imunogenisitas rendah serta plastisitas yang tinggi. BM-MSC diketahui mengekspresikan MHC-II negatif, CD 40, CD 80 dan CD 86 yang sangat rendah, sehingga memungkinkan transplantasi *allogenic* tanpa agen imunosupresan (Igura, 2004).

Karakteristik fenotip *Bone Marrow derived Stem Cell's* (BMSC's) perlu diketahui sebelum diaplikasikan pada sel *host*. *Bone marrow* mempunyai dua derivat *stem cell* dengan karakteristik fenotip berbeda yaitu *Bone Marrow* –

Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) dan *Bone Marrow – Hematopoetic Stem Cell* (BM-HSC). Karakteristik fenotip *Mesenchymal Stem Cell* diketahui berdasarkan pada ekspresi *Cluster of Differentiation* (CD) pada permukaan sel. Menurut Dominici (2006), berdasarkan ketentuan *International Society for Cellular Therapy*, *Mesenchymal Stem Cell* harus memenuhi beberapa kriteria tertentu. Kriteria tersebut antara lain; MSC mampu untuk melekat pada dasar petri disk dengan kondisi standar, persentase sel dengan fenotip CD positif harus lebih dari 95 %, yang terdiri dari CD 105, CD 73, CD 90 dan prosentase sel dengan fenotip CD negatif harus kurang dari ≤ 2 %, yang terdiri dari CD 45, CD 34 atau CD 11b, CD 79 α atau HLA-DR3.

Metode imunositokimia dengan pengamatan mikroskop fluoresen, secara umum digunakan untuk identifikasi fenotip BMSCs, tetapi metode ini hanya memberikan informasi kualitatif sebatas terekspresi atau tidaknya *surface marker* yang diekspresikan. *Flowcytometry* memberikan ruang yang luas untuk pemeriksaan imunofenotip. Metode ini mampu mengidentifikasi dan menghitung jumlah populasi sel yang dianalisis. Menurut Davis *et al.*, (2008), *flowcytometry* memungkinkan pengukuran multivariansi dari sub populasi sel pada populasi sel heterogen. Metode ini memungkinkan pemeriksaan sampel dalam jumlah sedikit seperti *bone marrow*.

Secara *in vitro* imunogenisitas dari *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* dapat diketahui berdasarkan inkorporasinya terhadap *Pheripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC). *Allogenic* BM-MSC memiliki imunogenisitas rendah dengan menghambat respon sel limfosit-T (Troeger *et al.*, 2005; Setiawan, 2006).

PBMC merupakan sumber informasi yang ideal untuk penilaian kinetik imunoreaktivitas individu yang mencerminkan situasi penolakan pada transplantasi. Sebagian besar tes berhubungan dengan respon sel limfosit-T, karena sel limfosit-T memiliki peran utama dalam respon kekebalan *allogenic* BM-MSC (Purwatiningsih, 2012). Apabila tidak terjadi reaksi dengan PBMC maka dapat dilanjutkan secara *in vivo* pada hewan coba.

Penelitian pemanfaatan *allogenic* BM-MSC sebagai terapi dalam berbagai penyakit kardiovaskuler, neural dan ortopedik telah banyak dilaporkan, namun penggunaan *allogenic* BM-MSC sebagai model terapi cedera otot kerangka masih sangat jarang dilaporkan. Li *et al.* (2005), melaporkan bahwa faktor determinan dari BM-MSC dalam perbaikan sel ditentukan oleh karakteristik biologis dan diferensiasinya. Diketahui bahwa BM-MSC yang diinjeksikan intravena, dapat bermigrasi melalui pembuluh darah dan mencapai daerah yang mengalami kerusakan, dimana selanjutnya akan mengurangi terjadinya apoptosis dan meningkatkan proliferasi sel endogen pada tikus putih yang mengalami cedera otak. Hasil penelitian ini sekaligus menunjukkan keberhasilan sel implan terhadap reaksi lokal hingga integrasi antara yang dimplantasikan dengan jaringan *host* dapat dicapai.

Proses penyembuhan cedera merupakan sebuah proses alami yang menguntungkan yang melibatkan beberapa respon vaskuler dan seluler, tetapi respon inflamasi yang berlebihan deposisi kolagen dan jaringan ikat meningkat serta invasi beberapa sel radang seperti makrofag dan netrofil diperpanjang (Mc Gavin, 2007). Makrofag dan netrofil bekerja memfagosit mikroorganisme dan

debris jaringan mati. Pada inflamasi normal netrofil hanya bekerja dari beberapa saat, sedangkan makrofag lebih dominan setelah itu. Meskipun infiltrasi sel radang tersebut penting dalam proses penyembuhan itu sendiri namun dalam kenyataannya menimbulkan manifestasi klinis yang mengganggu serta memperlambat proses penyembuhan cedera tersebut (Price dan Wilson, 2002). Inflamasi perlu ditekan sehingga respon seluler yang terjadi tidak berlebihan. Respon vaskuler menyebabkan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) pada daerah yang mengalami cedera yang melibatkan beberapa faktor pertumbuhan. Angiogenesis berperan penting di awal proses inflamasi sebagai penyuplai oksigen dan nutrisi (Davies, 2012). Penyembuhan yang diharapkan dari cedera otot yaitu terbentuknya kembali sel otot baru (mioblas) menggantikan sel otot yang rusak sehingga komposisi dan fungsi sel otot tidak terganggu. Otot kerangka mempunyai sel satelit yang mampu berdiferensiasi menjadi sel mioblas tetapi prosesnya lambat sehingga sering tumpang tindih dengan pembentukan jaringan fibrous. Beberapa indikator penyembuhan cedera otot tersebut perlu diketahui sebagai penentu efektivitas terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC)*.

1.2 Rumusan Permasalahan

Berdasarkan latar belakang tersebut terdapat permasalahan yaitu: Bagaimanakah efektivitas penyembuhan otot kerangka pasca cedera dengan terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC)* pada kelinci *White New-Zealand (Oryctolagus cuniculus)*?

Penilaian efektivitas tersebut berdasarkan indikator penyembuhan cedera yaitu perbedaan lama waktu penyembuhan, jumlah sel radang, jumlah angiogenesis dan jumlah mioblas antara perlakuan terapi *allogenic* BM-MSC dan kontrol tanpa terapi yang dapat dirumuskan sebagai berikut yaitu;

1. Apakah pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan lama waktu penyembuhan pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi?
2. Apakah pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan jumlah sel radang pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi?
3. Apakah pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan jumlah angiogenesis pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi?
4. Apakah pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan jumlah mioblas pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi?

1. 3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui gambaran regenerasi jaringan otot kerangka pasca cedera manipulatif pada otot kerangka kelinci yang diterapi dengan *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC) berdasarkan lama waktu penyembuhan, jumlah sel radang, angiogenesis dan mioblas.

Tujuan khusus

1. Menentukan efektivitas penyembuhan cedera berdasarkan pengamatan patologi anatomi perbedaan lama waktu penyembuhan pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand (Oryctolagus cuniculus)* dengan terapi *allogenic* BM-MSC dan kontrol tanpa terapi secara makroskopis.
2. Menentukan efektivitas penyembuhan cedera berdasarkan jumlah pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dengan pengamatan mikroskopis preparat histopatologi dengan metode pewarnaan HE di daerah penyembuhan (*healing centre*) pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand (Oryctolagus cuniculus)* dengan terapi *allogenic* BM-MSC dan kontrol tanpa terapi.
3. Menentukan efektivitas penyembuhan cedera berdasarkan jumlah infiltrasi sel radang (makrofag dan netrofil) dengan pengamatan mikroskopis preparat histopatologi dengan metode pewarnaan HE di daerah penyembuhan (*healing centre*) pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand (Oryctolagus cuniculus)* dengan terapi *allogenic* BM-MSC dan kontrol tanpa terapi.
4. Menentukan efektivitas penyembuhan cedera berdasarkan jumlah sel otot muda (mioblas) dengan pengamatan mikroskopis preparat histopatologi dengan metode pewarnaan HE di daerah penyembuhan (*healing centre*) pasca cedera otot kerangka pada pada kelinci *White New-Zealand*

(*Oryctolagus cuniculus*) dengan terapi *allogenic* BM-MSC dan kontrol tanpa terapi.

1. 4 Manfaat Hasil Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

1. Memberikan wawasan ilmiah dan penjelasan tentang *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* dalam aplikasinya sebagai terapi cedera otot kerangka sehingga menjadi ide baru untuk penelitian pada cedera jenis otot yang lain.
2. Diharapkan menjadi dasar pemikiran penelitian selanjutnya tentang *Mesenchymal Stem Cell* dalam penanganan penyakit degeneratif dan *tissue engineering*.

1.4.2 Manfaat praktis

1. Terapi *Mesenchymal Stem Cell* dapat diaplikasikan pada beberapa kasus penyakit otot kerangka degeneratif dan traumatik.
2. BM-MSC dapat digunakan sebagai pilihan terapi pendukung penyembuhan pasca operasi pada hewan yang mengakibatkan cedera pada jaringan otot karena kemampuannya dalam menstimulasi regenerasi sel secara cepat dan tepat.

BAB 2

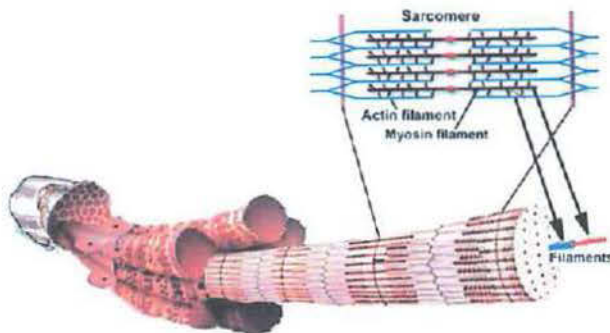
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Otot Kerangka

Otot kerangka merupakan jaringan dengan berbagai fungsi vital dalam tubuh. Fungsi utama otot kerangka adalah sebagai pendukung rangka membentuk postur tubuh yang memungkinkan pergerakan dan perpindahan. Kontraksi berkesinambungan dari otot pernapasan (otot intercostae dan diafragma) adalah hal penting bagi kehidupan individu. Otot juga berperan penting dalam regulasi homeostasis, metabolisme glukosa dan berperan dalam pemeliharaan suhu tubuh (McGavin, 2007).

Sel otot kerangka merupakan sel silinder memanjang yang disebut mioisit atau miofiber. Miofiber dibungkus oleh lapisan yang disebut lamina basalis. Inti sel otot terletak di tepi sarkoplasma (sitoplasma otot). Otot kerangka mempunyai unit fungsional terkecil yang disebut sarkomer yang tersusun atas ikatan aktin dan miosin. Sarkomer adalah penyusun miofibril. Beberapa miofibril menyusun sabut otot. Kumpulan beberapa sabut otot menjadi satu vesikel otot (Shen, *et al*, 2004).



Gambar 2.1 Susunan otot kerangka terdiri dari satu unit fungsional terkecil yang disebut sarkomer (Shen *et al.*, 2004)

2.2 Cedera Jaringan Otot Kerangka

Cedera otot merupakan terputusnya kontinuitas jaringan pada otot yang bisa disebabkan oleh trauma atau penyakit otot lainnya. (Sjamsuhidajat dan Jong, 2005). Keparahan cedera tergantung dari besarnya trauma yang diterima oleh jaringan (Pavletic, 2002). Cedera pada jaringan otot kerangka secara umum dapat dibagi menjadi dua yaitu cedera tertutup dan cedera terbuka. Cedera tertutup yaitu cedera tanpa diikuti oleh kerusakan pada jaringan kulit setempat, contohnya kontusio yaitu cedera akibat benturan. Cedera terbuka adalah cedera yang terjadi mulai dari daerah kulit bila diikuti oleh kerusakan jaringan dibawahnya, termasuk cedera karena insisi dan akibat benda tajam dengan tepi luka rata (Thomson, 1984; Slatter, 1985).

Penyebab terjadinya cedera pada otot kerangka antara lain karena beberapa hal seperti; cedera robek, tusukan, tembakan, gigitan, hancur dan avulsio. Cedera robek dapat terjadi karena benda tajam atau tumpul. Cedera tusukan disebabkan oleh benda tajam dan runcing. Ciri cedera tusukan yaitu lebar luka lebih kecil dibandingkan dalamnya. Cedera tembak disebabkan oleh peluru. Ciri khas pada cedera tembak yaitu cedera tembak masuk dan cedera tembak keluar, luka yang terjadi berbentuk bulat dan meruncing di bagian dalamnya. Cedera akibat gigitan terjadi disebabkan oleh binatang berbisa atau tidak berbisa. Ciri luka gigitan yaitu kecil tapi dalam, tergantung dari faktor penyebab dan hewan yang menggigit. Cedera hancur dapat ditandai dengan hancurnya semua jaringan yang terkena. Cedera avulsio ditandai dengan adanya kulit dan jaringan bawah kulit yang terkelupas (Sjamsuhidajat dan Jong, 2005).

2.3 Patofisiologi Cedera dan Penyembuhan Otot Kerangka

Cedera pada jaringan otot kerangka terjadi akibat benturan oleh benda tumpul, goresan, jatuh atau kecelakaan sehingga menyebabkan kontinuitas jaringan terputus (Price dan Wilson 2006). Pada awalnya respon tubuh menghadapi cedera adalah terjadinya proses peradangan atau inflamasi. Reaksi peradangan akan terjadi apabila jaringan terputus. Reaksi peradangan itu sebenarnya adalah peristiwa yang dikoordinasikan dengan baik yang dinamis dan berkelanjutan untuk menimbulkan reaksi antar sel sehingga jaringan harus hidup dan harus dimikrosirkulasi secara fungsional. Jika jaringan yang nekrosis luas, maka reaksi peradangan tidak ditemukan di tengah jaringan yang hidup, dengan sirkulasi yang utuh terjadi pada tepi antara jaringan mati dan hidup (Guyton dan Hall 2005).

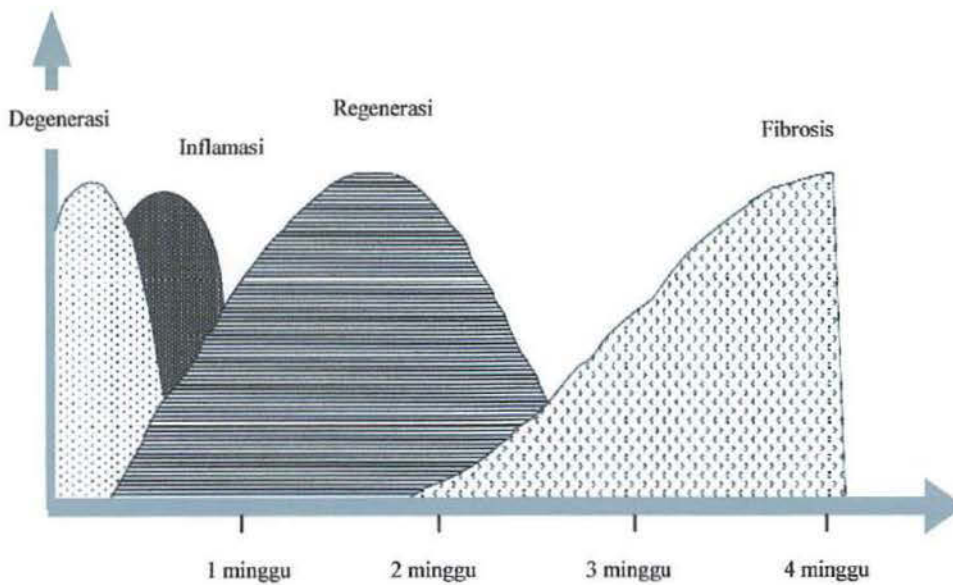
Cedera pada jaringan otot mengaktifkan kaskade plasmin dan kinin. Kaskade kinin menghasilkan *peptide* vasoaktif yang berperan meningkatkan permeabilitas endotel, enzim dari kaskade kinin juga mengaktifkan kaskade komplemen. Kaskade plasmin penting dalam remodeling matriks ekstraseluler yang menyertai penyembuhan luka, enzim dari kaskade plasmin juga mengaktifkan kaskade komplemen. Aktivasi komplemen menimbulkan migrasi leukosit seperti polimorfonuklear, limfosit, dan monosit, meninggalkan sirkulasi (ekstravasasi) yang diatur oleh sitokin dan *homing* ke tempat infeksi atau cedera. Ekstravasasi dan *homing* juga diatur oleh sitokin yang dihasilkan sel mast setempat (diaktifkan oleh komplemen) dan makrofag (diaktifkan oleh produk bakteri) (Baratawidjaja, 2001).

Sitokin berperan penting dalam reaksi imun non spesifik, inflamasi dan respon imun pada jaringan yang mengalami cedera. Adanya respon inflamasi menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah sel-sel radang (Farida, 2003). Beberapa sitokin tersebut antara lain seperti IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β , dan TNF α . Sitokin yang berperan dalam proses inflamasi merupakan indikasi dari berjalan atau tidaknya proses inflamasi itu sendiri.

Sesaat setelah timbul cedera akan terjadi vasokonstriksi pembuluh darah di daerah sekitar luka (Swaim 1980; Harvey *et al*, 1990). Hal ini berguna untuk mengontrol terjadinya hemoragi lebih lanjut. Pengontrolan terhadap terjadinya hemoragi merupakan langkah yang penting untuk mengoptimalkan penyembuhan luka (Harvey *et al*, 1990). Fase ini juga merupakan fase destruksi material peradangan. Tahap destruksi terjadi setelah 6 jam dan berlangsung hingga 12 jam setelah terjadinya luka. Pada tahap ini terjadi peningkatan permeabilitas kapiler, aktivitas leukosit dan makrofag meningkat. Leukosit bermigrasi ke daerah luka karena rangsangan kemotaksis yang berfungsi untuk memfagosit bakteri. Proses pembersihan jaringan akan dipercepat oleh aktivitas makrofag (Peacock dan van Winkle, 1976).

Proses penyembuhan cedera merupakan proses kompleks yang secara garis besar dapat dibagi menjadi empat fase yang saling tumpang tindih. Proses tersebut meliputi fase degenerasi, inflamasi, regenerasi dan fibrosis (gambar 2.2). Degenerasi merupakan tahap paling awal proses yaitu proses terjadinya cedera itu sendiri. Segera setelah degenerasi terjadi, tubuh merespon dengan proses inflamasi. Fase ini memicu peningkatan respon pembuluh darah yang ditandai

dengan proses pembekuan darah, hemostatis, termasuk di dalamnya infiltrasi leukosit sebagai pertahanan terhadap mikroorganisme dan pelepasan mediator peradangan (*sitokine release*). Fase regenerasi terjadi setelah fase inflamasi ditandai dengan proliferasi sel-sel epitel untuk menutupi area cedera. Pada fase ini terbentuk jaringan granulasi yang berfungsi meningkatkan proliferasi fibroblas, kolagen, pembentukan pembuluh darah baru dan matriks ekstra seluler. Fase remodeling adalah proses pembentukan jaringan seperti bentuk dan fungsi awal (Ambrosio, 2007). Fase remodeling yang tidak sempurna membentuk diikuti fibrosis yang berlebihan.



Gambar 2.2 Proses penyembuhan cedera, secara umum dibagi 4 tahap, yaitu; degenerasi, inflamasi, regenerasi dan fibrosis (Ambrosio, 2007).

2.3.1 Degenerasi

Kerusakan otot melibatkan gangguan di dalam serabut otot yang meliputi jaringan penghubung, selaput plasma serta lamina basalis. Kerusakan yang terjadi menyebabkan keluarnya kalsium dari plasma menuju cairan ekstra seluler. Influx kalsium dan pengaktifan protease menyebabkan nekrosis fokal pada daerah miofiber karena proses autodigesti. Nekrosis ini terjadi awal setelah trauma terjadi dan hanya sekitar 2 jam dapat teramati (Rantanen *et al*, 1995). Daerah yang mengalami nekrosis ditutup oleh formasi sarkolema sebagai bentuk proteksi dari autodigesti myofiber yang disebut *contraction zone* (Hurme *et al*, 1991).

Terjadinya influx kalsium karena kerusakan struktur internal miofiber menyebabkan kerusakan ultrastruktural dalam jaringan otot itu sendiri. Pelepasan kalsium intraseluler menyebabkan aktivasi kalpain. Kalpain menghancurkan miofibrin aparatus sehingga terjadi proteolisis dan perubahan bentuk. Disisi lain kalpain diketahui berperan penting dalam aktivasi sel-sel regeneratif yang pada mulanya dalam keadaan diam (Raynaud *et al*, 2004).

Degenerasi ditandai adanya bengkak lokal dan hematoma pada daerah cedera. Fase ini memerlukan peran pembuluh darah untuk memobilisasi makrofag, sel mononuklear dan limfosit sel-T, sedangkan netrofil hanya berperan beberapa saat saja sebelum digantikan oleh makrofag. Makrofag berperan pertama dalam proses fagosit debris jaringan otot serta sebagai faktor pelepasan mediator peradangan (sitokin) antara lain; IL-6, IL-8 dan TNF- α .

Sitokin ini berperan penting dalam merangsang permeabilitas pembuluh darah dan peradangan (Ambrosio *et al*, 2007).

2. 3. 2 Inflamasi

Tahap inflamasi merupakan tahap pertama dari proses penyembuhan. Inflamasi merupakan respon vaskuler dan seluler terhadap kerusakan jaringan untuk memfagositosis bakteri, jaringan nekrotik, serta netralisasi iritasi (Marzoeki, 1993). Pada tahap ini terjadi kerusakan struktur miofiber yang diiringi dengan influks kalsium (Ca^{2+}) yang menyebabkan pelepasan enzim phospholipase A2. Enzim tersebut memecah phospholipid menjadi asam arakhidonat yang segera ditransformasi menjadi prostaglandin melalui jalur siklooksigenase. Enzim siklooksigenase 2 (COX2) berperan dalam menyebabkan rasa sakit dan peradangan selama proses penyembuhan cedera (Mense 1991; Hedenberg *et al*, 2001). Secara fisik tahap ini ditandai dengan adanya rasa sakit, kemerahan, panas dan pembengkakan serta gangguan fungsi (Price dan Wilson, 2003).

Cedera pada jaringan otot tidak hanya terjadi pada sel otot saja. Pembuluh darah sekitar daerah cedera juga mengalami kerusakan. Kerusakan pembuluh darah ini menyebabkan terjadinya hematoma yang memicu pelepasan netrofil, makrofag yang telah teraktifasi dan limfosit sel-T. Netrofil berperan dalam fagositosis dan pelepasan enzim protease yang berguna dalam pembersihan debris jaringan ikat. Fungsi lain dari netrofil yaitu melepaskan sitokin yang memberi sinyal kepada monosit. Monosit selanjutnya berubah

menjadi makrofag yang bertugas memfagosit debris. Makrofag juga berperan dalam sitokin *networking* yang mengatur peradangan (Miyagawa *et al*, 1995). Makrofag juga diketahui mampu melepas faktor pertumbuhan seperti H-EGF (*heparin – binding EGF like growth factor*) yang berperan dalam proses diferensiasi miotubulus. HEGF juga memberi peran penting pada sel otot untuk bertahan pada kondisi stres oksidatif (Horikawa *et al*, 1999).

2. 3. 3 Regenerasi

Sel miofiber merupakan sel *irreversible* setelah proses mitosis, artinya kerusakan pada sel ini tidak bisa tergantikan. Namun demikian ada mekanisme intrinsik yang mampu meregenerasi miofiber. Proses regenerasi miofiber tergantung pada aktivasi sel satelit. Sel satelit yang berada di lamina basalis mampu memperbanyak diri dan berdiferensiasi menjadi miofiber. Kerusakan segmen miofiber membuat sel satelit teraktivasi. Bersamaan dengan makrofag membersihkan debris, sel satelit teraktivasi dan melakukan persiapan regenerasi segmen miofiber yang rusak. Selama masa cedera sel ini mulai aktif dan berproliferasi. (McGavin, 2007).

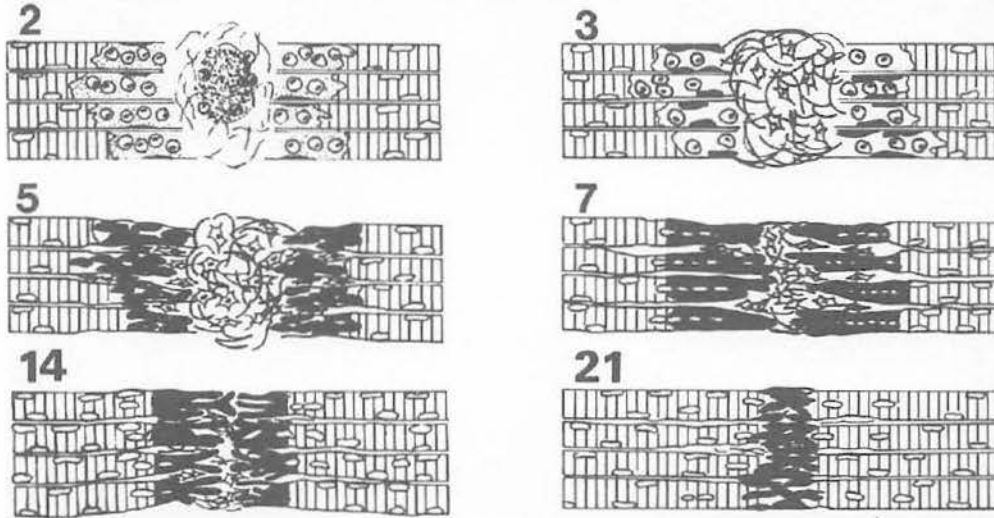
Fase regenerasi sel otot terjadi mulai hari ke tujuh sampai sekitar hari ke sepuluh setelah terjadi cedera. Fase ini ditandai dengan pembersihan sel – sel nekrotik dan pengaktifan *quiescent satellite cells* oleh faktor pertumbuhan. Beberapa penelitian menyebutkan aktivasi sel satelit mungkin terlihat hari ke tiga setelah terjadinya cedera (Hurme *et al*, 1991). Faktor pertumbuhan seperti *fibroblas growth factor* (FGF), *hepatosit growth factor* (HGF), *nervus growth*

factor (NGF) dan *insulin like growth factor* (IGF-1) telah diketahui mempunyai peran dalam proliferasi sel satelit dan diferensiasi sel satelit menjadi mioblas. Dilain pihak miostatin yang merupakan bagian dari TGF- β , merupakan regulator yang bekerja negatif dalam proses regenerasi otot kerangka dengan menghambat aktivasi dari sel satelit.

2. 3. 4 Fase fibrosis

Sesaat setelah terjadi cedera pada otot kerangka, bagian yang mengalami kerusakan akan diisi oleh hematoma. Fibrin dan fibrinogen menyelimuti daerah cedera membentuk jaringan granulasi muda. Ekstra seluler matriks teraktivasi pada jaringan granulasi dan memproduksi kolagen. Kolagen tipe I dan III adalah kolagen utama yang ditemukan di otot, kedua jenis kolagen ini diketahui meningkat setelah terjadi cedera otot. Formasi jaringan ikat biasanya terjadi 2-3 minggu setelah cedera. Jaringan ikat yang persisten menyebabkan hambatan regenerasi otot yang sempurna.

Penyembuhan otot kerangka seringkali diikuti pembentukan jaringan parut, sebagai akibat deposisi jaringan ikat. Pada kenyataannya deposisi jaringan ikat tersebut menurunkan kontraksi otot itu sendiri yang selanjutnya dapat menurunkan fungsi otot secara keseluruhan. (Croisier, 2004). Ambrosio *et al* (2007) menyatakan bahwa TGF - β 1 berperan penting dalam pembentukan kaskade fibrosis. TGF - β 1 dilepaskan bersamaan dengan infiltrasi limfosit, makrofag dan fibroblas pada lokasi cedera.



Gambar 2.3 Ilustrasi proses penyembuhan cedera pada jaringan otot kerangka. Hari ke-2 menunjukkan infiltrasi makrofag di daerah cedera membersihkan debris jaringan mati. Hari ke-3 aktivasi sel satelit dari lamina basalis. Hari ke-5 mioblas mulai menyatu membentuk miotubulus yang diikuti pembentukan jaringan ikat. Hari ke-7 sel otot muda (miobls) mulai terbentuk. Hari ke-14 formasi jaringan ikat mulai berkurang. Hari ke -21 miofiber bersatu dengan jaringan ikat mebuat formasi baru (Tero *et al*, 2005).

2.4 Problema penyembuhan cedera otot kerangka

Proses penyembuhan dari sel otot terjadi dengan mengganti sel yang rusak dengan yang baru dan sama sehingga fungsi tubuh atau jaringan akan pulih kembali dengan sempurna. Penyembuhan demikian disebut regenerasi. Sedangkan pada proses penyembuhan dari sel atau jaringan yang rusak akan diganti oleh jaringan parut atau jaringan ikat disebut organisasi (Sudiono *et al*, 1995). Otot kerangka termasuk dalam *undividing tissue regeneration* yaitu jaringan yang sulit mengalami regenerasi. Dalam proses penyembuhan jaringan otot kerangka akan selalu diikuti formasi jaringan ikat, hal ini menyebabkan fungsi otot tidak dapat kembali seperti semula.

Sel otot dewasa mempunyai natural *stem cell* yang disebut sel satelit yang terdapat pada lapisan endomisium. Sel satelit mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi mioblas akan tetapi sering tumpang tindih dengan pembentukan parut yang cepat (Gurtner *et al*, 2008). Penelitian yang dilakukan Kasemkijwattana *et al* (1998) menggunakan hewan coba mencit menunjukkan bahwa proses regenerasi sel-sel otot secara alami tidak terjadi secara keseluruhan. Daerah yang tidak mengalami perbaikan masih bisa terlihat 35 hari setelah terjadi cedera.

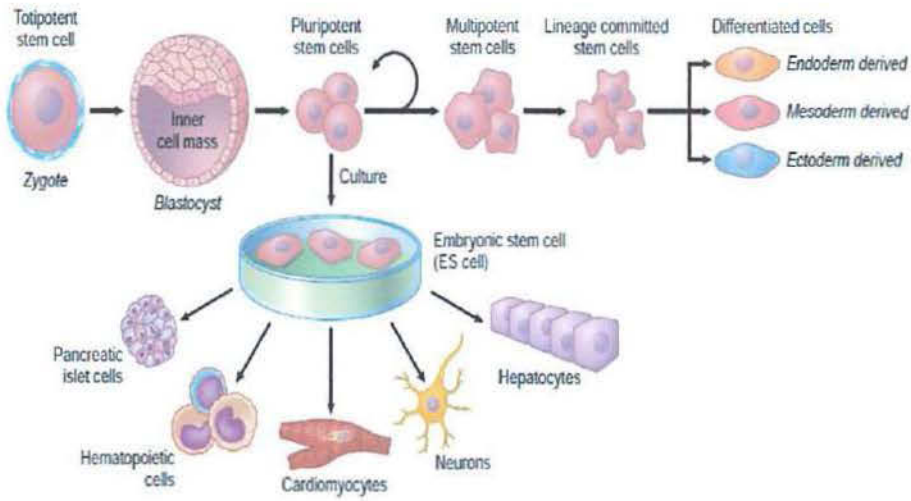
Regenerasi sel otot juga dipengaruhi oleh banyak tidaknya sel satelit yang mengalami kerusakan. Kerusakan sebagian miosit tanpa melibatkan kerusakan lamina basalis seperti pada kasus miopati karena metabolik atau keracunan, akan terjadi regenerasi yang sempurna. Akan tetapi pada kasus dengan banyak sel satelit yang rusak seperti pada kasus infrak dan radang yang hebat, situasinya akan sangat berbeda. Kasus ini tidak dapat meregenerasi otot normal kembali dan proses penyembuhannya akan digantikan oleh fibrosis (McGavin, 2007).

Komplikasi penyembuhan trauma otot dapat juga disebabkan infeksi mikroorganisme. Bakteri penyebab terjadinya infeksi luka diantaranya *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aerogenosa* dan *Bacillus subtilis*, yang dapat menyerang hewan dan manusia dalam bentuk akut atau kronis dengan cara melakukan penetrasi. Infeksi menyebabkan inflamasi yang tak kunjung sembuh penderita merasa tidak nyaman. Menurut Price dan Wilson (2002) luka yang masa penyembuhannya lama akan menghasilkan jaringan parut yang buruk.

2.5 *Stem Cell*

Stem cell adalah sel yang mempunyai kemampuan memperbaharui diri (*self renewal*) dan mampu berdiferensiasi menjadi berbagai turunan sesuai kondisi lingkungannya. Perbaruan diri yaitu kemampuan untuk memperbaharui atau meregenerasi dirinya sendiri. *Stem cell* mampu membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel. Diferensiasi yaitu kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel lain. *Stem cell* mampu berkembang menjadi berbagai jenis sel yang spesifik misalnya sel saraf, sel otot jantung, sel otot rangka, sel pankreas dan lain-lain (Setiawan, 2006; Rantam dkk.,2009).

Stem cell dapat bersifat *pluripotent* atau *multipotent* tergantung pada tipenya, tetapi hanya *stem cell* embrionik yang bersifat *totipotent*. *Stem cell* embrionik adalah *pluripotent* karena mereka mampu berdeferensiasi menjadi beberapa tipe jaringan, sedangkan *stem cell* dewasa hanya berdeferensiasi terbatas pada jaringan dimana mereka berasal seperti hepatosit pada liver dan sel punca hematopoetik dalam darah (Bongso dan Lee, 2005). Dalam kondisi tertentu beberapa sel dapat berdeferensiasi menjadi *multi lineage* sehingga menjadi multipotent. Hal ini terjadi pada *mesenchymal stem cell* yang ditemukan dalam sumsum tulang, jaringan lemak, kulit dan beberapa jaringan lainnya (Suroto, 2011).

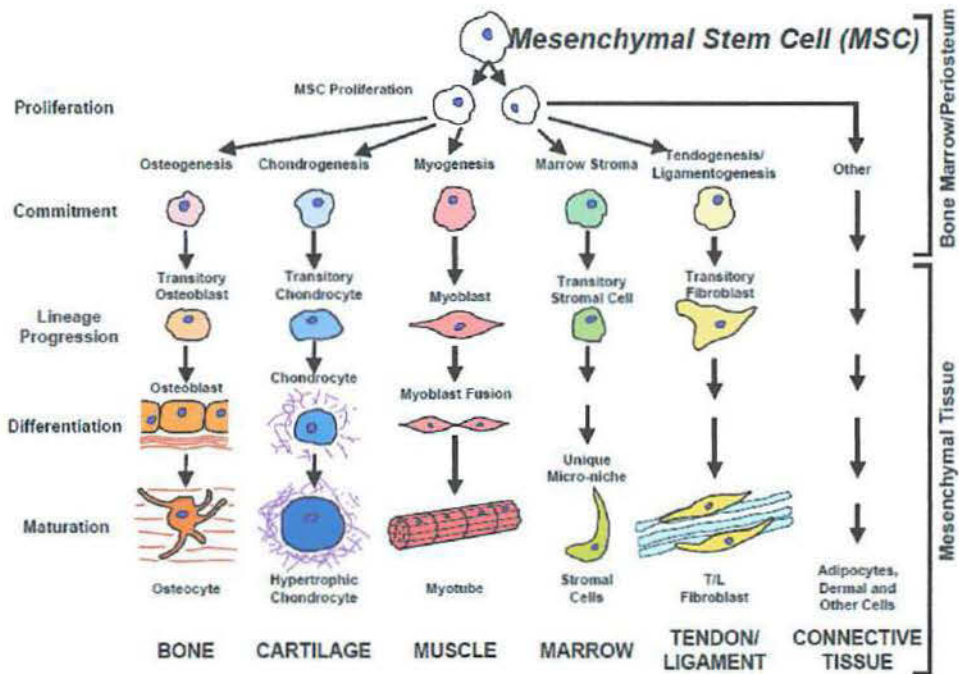


Gambar 2.4 Diferensiasi dari *inner Cell Mast* (ICM) blastosit manusia dari yang *totipoten*, *pluripoten*, dan *unipoten*. (Schroeder *et al.*, 2007).

Menurut Schroeder *et al* (2007), *stem cell* dibagi menjadi empat macam berdasarkan kemampuan berdiferensiasinya yaitu: *totipotent*, *pluripotent*, *multipotent*, *unipotent*. *Totipotent* merupakan *stem cell* yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel. Pembuahan antara sel telur dan sperma menghasilkan zigot yang merupakan contoh *stem cell* yang bersifat *totipoten* (gambar 2.4). *Pluripotent* merupakan jenis *stem cell* yang dapat berdiferensiasi menjadi tiga lapisan germinal yaitu ektoderm, mesoderm, dan endoderm, tapi tidak dapat menjadi jaringan ekstra embrionik seperti plasenta dan tali pusat. Sel yang termasuk *stem cell pluripotent* adalah embrionik *stem cell*. *Multipotent* merupakan jenis *stem cell* yang dapat berdiferensiasi menjadi banyak jenis sel, misalnya *hematopoietik stem cell*. *Unipotent* merupakan *stem cell* yang hanya dapat menghasilkan satu jenis sel.

2.6 Mesenchymal Stem Cell

Mesenchymal stem cell (MSC) awalnya disebut sebagai *colony forming unit-fibroblas* (CFU-F) atau *marrow stromal fibroblast* (MSF). Pada perkembangan selanjutnya disebut *marrow stroma cells* (MSC), *mesenchymal stem cell* atau *mesenchymal progenitor cells*. (Minguel *et al.*, 2001; Prockop *et al.*, 2008; Toubai *et al.*, 2009). *Mesenchymal stem cell* merupakan *stem cell* dewasa yang dapat diperoleh dari sum-sum tulang, periosteum, tulang trabekula, jaringan adiposa, sinovial, otot kerangka dan gigi desidual (Barry, 2004).



Gambar 2.5 Diferensiasi *mesenchymal stem cell* menjadi beberapa jaringan mesenkim (Caplan, 2008).

Mesenchymal stem cell yang berasal dari *Bone Marrow Derived Stem Cell's* (BMSC's) disebut *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC)

disebut juga sel progenitor multipoten yang mampu berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel jaringan seperti osteosit, kondrosit, adiposa, tenosit dan miosit (Caplan, 2008).

2.6.1 Isolasi *mesenchymal stem cell*

Mesenchymal stem cell pada manusia secara umum didapat melalui aspirasi sum-sum tulang dari tulang pelvis, iliaca, tulang tibia juga tulang femur (Murphy, 2002), tulang torak dan spina lumbal (Horwitz, 1999). Aspirasi pada hewan besar dilakukan pada tempat sum-sum yang sama, pada jenis pengerat secara umum dapat dipanen dari diafisis tulang tibia atau femur. *Stem cell* dapat ditanam pada plate dan ditumbuhkan dengan teknik kultur sel.

Kultur *mesenchymal stem cell* dapat mencapai empat kali duplikasi, bahkan ada yang dapat mencapai 15 kali duplikasi. Perbedaan kemampuan untuk duplikasi tergantung pada prosedur yang dipergunakan untuk kultur dan rendahnya jumlah *mesenchymal stem cell* dalam *bone marrow* (2-5 MSC dalam 1×10^6 sel *mononuclear*) tergantung berapa jumlah sel yang dibutuhkan. Pada kultur, *mesenchymal stem cell* tetap mempunyai *karyotipe* dan aktivitas telomerase normal, namun bila kultur dilakukan secara berlebihan maka fungsi sel akan terganggu dengan terjadinya *senescence* atau *apoptosis*. Kemampuan *mesenchymal stem cell* untuk tumbuh secara *in vitro* terbatas. Keadaan ini diduga adanya fenomena yang disebut *replicative senescence* (McTaggart dan Atkinson, 2007; Minguel *et al.*, 2001).

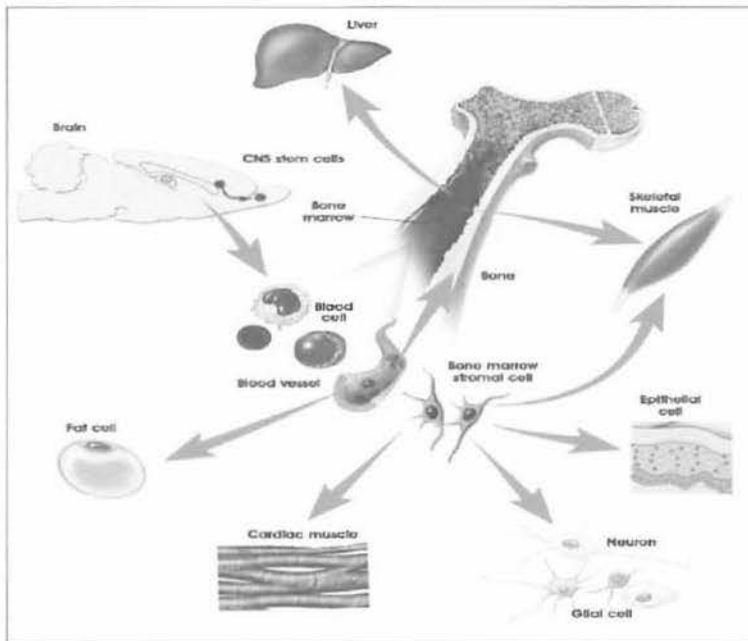
2.6.2 Karakteristik fenotip

Identifikasi *mesenchymal stem cell* berdasarkan *International Society for Cellular Therapy* harus memenuhi kriteria tertentu, antara lain : kemampuan untuk melekat pada dasar piring petri. Fenotip positif ($\geq 95\%$) terdiri dari CD105, CD73, CD90 dan negatif ($\leq 2\%$) terdiri dari CD45, CD34, atau CD11b, CD79 α atau HLA-DR. *In vitro* differensiasi menjadi osteoblas, adiposit, kondroblas dilihat dengan pewarnaan pada sel kultur atau pemeriksaan *imunofloresense* (Dominici *et al.*, 2006; Prasana *et al.*, 2010).

Mesenchymal stem cell juga mengekspresikan CD29, CD44, CD58, CD71, CD166, CD271, MHC I. *Mesenchymal stem cell* tidak atau mengekspresikan MHC II yang sangat rendah (Batten *et al.*, 2007; Chidgey *et al.*, 2008; Toubai *et al.*, 2009). MSC mengekspresikan komponen matriks ekstraseluler dan berbagai reseptor seperti proteoglikan, kolagen, laminin, dan reseptor hialuronidase. Gen penanda yang khas diekspresikan oleh *mesenchymal stem cell*, termasuk sitokin dan reseptor sitokin seperti interleukin IL-6 dan IL-6 reseptor IL-6R, IL-7 dan IL-7R, *tumor growth factor* (TGF) - β 1R dan TGF- β 2R, *basic fibroblast growth factor receptor* (bFGFR), dan *platelet derived growth factor receptor* (PDGFR). Ekspresi sitokin, faktor pertumbuhan, molekul matriks, dan reseptor berhubungan dengan fungsi *mesenchymal stem cell* yang berpartisipasi dalam meningkatkan *microenvironment* untuk diferensiasi sel (Ozturk dan Hu, 2011).

2.6.3 Karakteristik diferensiasi

Mesenchymal stem cell bersifat *multipoten*, dibawah kondisi yang sesuai dapat membentuk bermacam-macam sel termasuk osteoblas, adiposit, kondrosit, mioblas, hepatosit dan bahkan jaringan syaraf. *Mesenchymal stem cell* juga diduga mempunyai kemampuan untuk menyesuaikan diri dengan keadaan atau lingkungan yang baru (*plastisitas tinggi*). Bila terjadi suatu luka, *mesenchymal stem cell* akan meninggalkan *tissue niche*, masuk kedalam sirkulasi menuju target daerah luka tersebut (*home*), selanjutnya *mesenchymal stem cell* akan berdiferensiasi di target setelah berada di lingkungan mikro yang sesuai (Minguel *et al.*, 2001; Gregory dan Prockop, 2007; Rantam dkk., 2009; Prasana *et al.*, 2010).



Gambar 2.6 Diferensiasi *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* mejadi beberapa jenis sel diantaranya; sel lemak, sel otot jantung, sel syaraf, epitel dan sel otot kerangka (Jusuf, 2008).

2.6.4 Respon imun *mesenchymal stem cell* dengan sel host

Mesenchymal stem cell merupakan *hypoimmunogenic* dan dapat menghindarkan resepien dari penolakan imun. *Mesenchymal stem cell* mengekspresikan *major histocompatibility complex* (MHC) kelas- I dan tidak mengekspresikan molekul MHC kelas- II pada permukaan selnya, meskipun MHC kelas- II tidak diekspresikan pada *mesenchymal stem cell*, tetapi molekul pada MHC bisa distimulus oleh *interferon-gamma* (IFN- γ). *Mesenchymal stem cell* hanya mengekspresi MHC kelas- I, meskipun adanya stimulasi dan tetap melanjutkan untuk menjadi *nonimmunogenic*. Transplantasi *mesenchymal stem cell* dapat dilakukan transplantasi pada resepien *allogenic* tanpa adanya rejeksi imun (Batten *et al.*, 2007; Chidgey, 2008).

Mesenchymal stem cell tidak hanya menghindari atau mengeliminasi sistem imun, tetapi dapat mengekspresikan *alloreactivity*. Chen, dkk (2008) *Mesenchymal stem cell* pada perlakuan artritis, menunjukkan bahwa tidak terjadi reaksi imun. *Mesenchymal stem cell* setelah berdiferensiasi menjadi adiposa, osteoblas, dan kondrosit, proliferasi *allogenic* limfosit menyimpan memori sel T yang disebut CD4⁺ dan CD8⁺ yang ditemukan pada *mesenchymal stem cell*. Sel T pada *mesenchymal stem cell* memproliferasikan sel B, Sel NK (*Natural Killer*), dan sel dendrit yang pada saat terjadi proliferasi dan differensiasi terjadi pematangan fungsi sel imun dan menurunkan APC (*Antigen Presenting-Cells*) (Chen, 2008).

2.6.5 Mekanisme *homing*

Mesenchymal stem cell mempunyai kemampuan unik menuju jaringan yang cedera. Mekanisme ini disebut mekanisme *homing*, tetapi mekanisme ini belum sepenuhnya dipahami. Karakter penting dari MSC yaitu mengekspresi berbagai macam reseptor kemokin dan sitokin. Sehingga mampu menuju target inflamasi bersamaan dengan migrasi kemokin dan sitokin inflamasi. *Stromal cell-Derived Factor -1* (SDF-1) telah diketahui memegang peran penting mekanisme regenerasi MSC dan bagaimana MSC dapat mencapai target jaringan yang cedera (Askari, *et al*, 2003). *Chemokine Reseptor-4* (CXCR-4) yang dimediasi oleh *Hipoxya Inducible Factor -1*(HIF-1) menyebabkan peningkatan SDF-1 pada jaringan yang mengalami hipoxia. *Chemokine Reseptor-2* (CCR-2) dilaporkan Belema (2008) memegang peranan dalam migrasi *mesenchymal stem cell* pada kasus perbaikan sel – sel tulang. Wang *et al*. (2002) menunjukkan bahwa *chemokine monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) pada kasus iksemi otak mempromosikan migrasi *mesenchymal stem cell* yang diinjeksikan menuju daerah cedera.

2.6.6 Aplikasi terapeutik dengan *mesenchymal stem cell*

Mesenchymal stem cell adalah suatu sel untuk menggantikan, memperbaiki, meregenerasi dan memperl muda atau membuat menjadi muda pada sel dan jaringan yang mengalami luka, penyakit parkinson yang disebabkan oleh degenerasi progresif sel syaraf pada satu atau sel tipe yang lain (Chen, 2008). Penggunaan *Mesenchymal stem cell* telah dilaporkan oleh Orlic *et al*. (2001) pada

perbaikan otot jantung, fibrosis paru-paru, cedera spinal cord, kerusakan tulang dan perbaikan kartilago.

Pemberian *bone marrow mesenchymal stem cell* (BM-*MSC*) pada penyakit infark miokardial mampu meningkatkan fungsi jantung secara keseluruhan (Stamn *et al*, 2003). Penelitian yang dilakukan Gussoni (1999) menyimpulkan *Mesenchymal stem cell* juga mampu memperbaiki sel otot quadrisept pada mencit dengan gangguan distropi. Aplikasi BM-*MSC* pada terapi tikus pasca penyakit stroke menurunkan ukuran infark pada otak, merunutkan jumlah sel glia dan mempengaruhi pembentukan axon pada daerah lesi (Wu *et al*, 2007).

2.7 Kelinci Putih New - Zealand

Kelinci putih New - Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) adalah ras kelinci yang berasal dari New - Zealand, kelinci ini dikembangbiakkan sebagai kelinci penelitian, ternak dan peliharaan. Menurut Kartadisastra (1994), taksonomi kelinci adalah sebagai berikut :

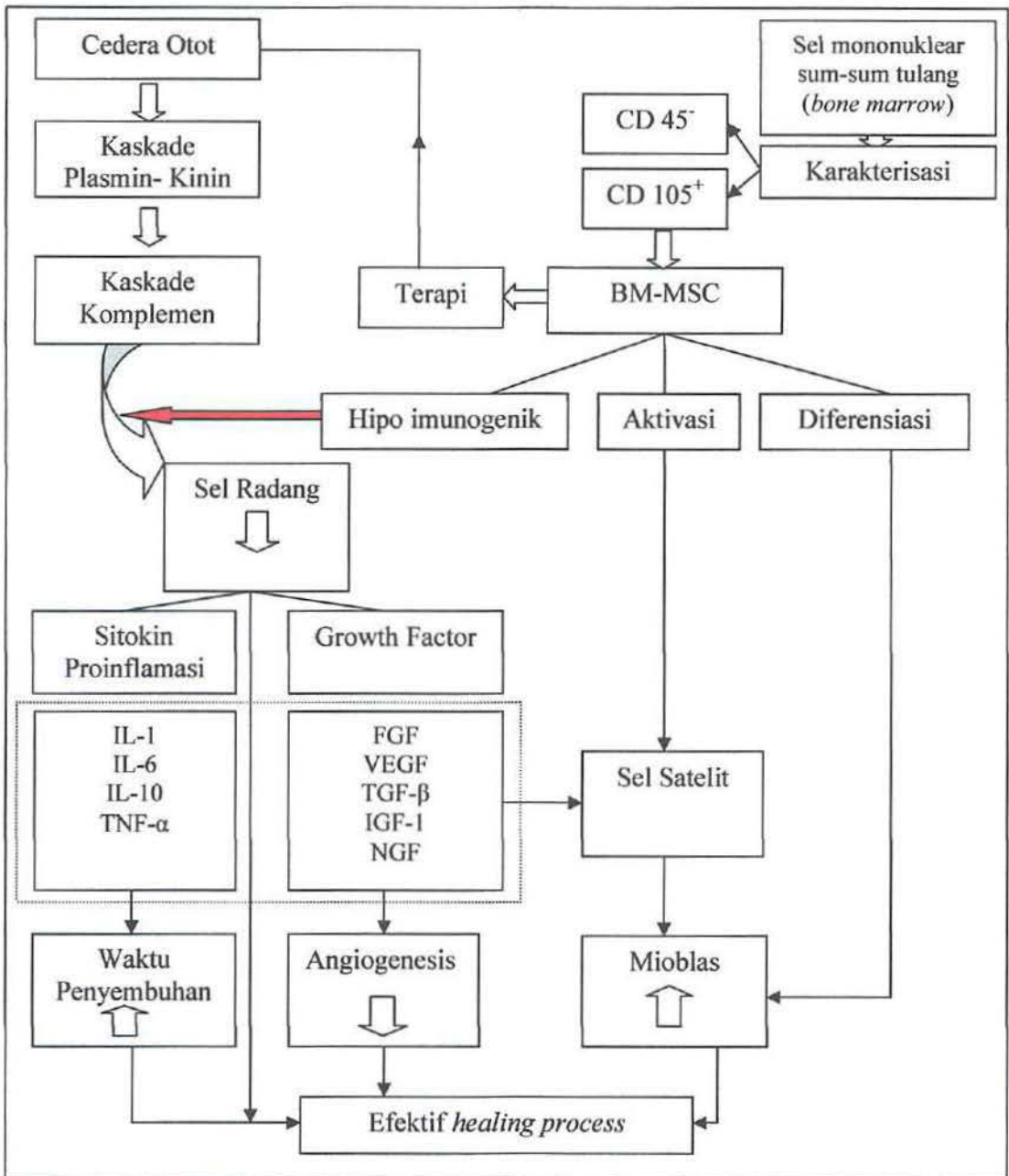
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Lagomorpha
Famili	: Leporidae
Sub Famili	: Leporidae
Spesies	: <i>Lepus spp</i> , <i>Oryctolagus spp</i>

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

Cedera mengaktifkan kaskade plasmin dan kinin. Kaskade plasmin diketahui berperan penting dalam remodeling matrik ekstraseluler yang berperan dalam proses penyembuhan luka. Plasmin juga menghasilkan enzim yang berperan dalam aktivasi kaskade komplemen. Kaskade kinin menghasilkan peptide vasoaktif yang berperan dalam peningkatan permeabilitas endotel. Beberapa enzim dalam kaskade kinin juga mengaktifkan kaskade komplemen. Aktivasi komplemen menimbulkan migrasi leukosit seperti polimorfonuklear, limfosit, dan monosit, meninggalkan sirkulasi (ekstravasasi) yang diperantarai oleh sitokin dan kemokin menuju area cedera (Baratawidjaja, 2001).

Sel radang yang berada pada area cedera melepaskan berbagai sitokin pro-inflamasi dan beberapa faktor pertumbuhan. Sitokin proinflamasi tersebut antara lain IL-1, IL-6, IL-10 dan TNF- α . IL-1 dilepaskan oleh makrofag yang teraktivasi dan mempunyai aktivitas luas dalam inflamasi. IL-1 berperan dalam terjadinya demam dan aktivasi sel limfoid, menyebabkan pelepasan sitokin lain oleh berbagai tipe sel (Jawetz, *et. al.*, 2001). TNF- α merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang dilepaskan oleh makrofag. TNF- α berperan dalam aktivasi sel, merangsang terjadinya apoptosis, dan menghambat perkembangan tumor, serta menstimulasi pelepasan *acute phase protein* (Jawetz, *et. al.*, 2001; Locksley, *et. al.*, 2001). Faktor pertumbuhan berperan penting dalam pembentukan jaringan baru pada daerah cedera. Faktor pertumbuhan seperti *fibroblas growth factor* (FGF), *hepatosit growth factor* (HGF), *nervus growth factor* (NGF) dan *insulin like growth factor* (IGF-1) telah diketahui mempunyai peran dalam proliferasi sel fibroblas dan sel satelit menyebabkan diferensiasi sel satelit menjadi mioblas.

Sedangkan *Vasculo Endothelial Growth Factor* (VEGF) berperan dalam pembentukan pembuluh kapiler baru (angiogenesis) pada daerah cedera.

Stem cell merupakan sel yang mempunyai sifat multipoten, belum terdiferensiasi (*undifferentiated cell*), mempunyai kemampuan untuk memperbaharui diri (*self-renewal*) dan menjadi sel spesifik (*differentiate*). *Stem cell* ditemukan pada berbagai jaringan tubuh, diantaranya adalah *bone marrow* atau sum-sum tulang. *Mesenchymal stem cell* pada manusia secara umum didapat melalui aspirasi sum-sum tulang dari tulang pelvis iliaca, tulang tibia juga tulang femur (Murphy, 2002).

Mesenchymal stem cell memiliki karakteristik fenotipe CD105 positif dan CD45 negatif. *Mesenchymal stem cell* bersifat *multipotent*, dibawah kondisi yang sesuai dapat membentuk bermacam-macam sel termasuk osteoblas, adiposa, kondrosit, mioblas, hepatosit, dan bahkan jaringan syaraf. *Mesenchymal stem cell* juga diduga mempunyai kemampuan untuk menyesuaikan diri dengan keadaan atau lingkungan yang baru (plastisitas tinggi). Bila terjadi suatu luka, *mesenchymal stem cell* akan meninggalkan *tissue niche*, masuk kedalam sirkulasi menuju target daerah luka tersebut (*homing*), selanjutnya *mesenchymal stem cell* akan berdiferensiasi di target setelah menyesuaikan dengan lingkungan mikro.

Mesenchymal stem cell mampu menggantikan, memperbaiki, meregenerasi dan memperl muda atau membuat menjadi muda pada sel dan jaringan yang mengalami luka, penyakit parkinson, yang disebabkan oleh degenerasi progresif pada satu atau sel tipe yang lain (Chen, 2008). Aplikasi BM-MSK pada cedera otot kerangka diharapkan mampu mempercepat kesembuhan luka hingga fungsi

gerak dapat kembali normal dalam waktu singkat. Efektivitas penyembuhan otot kerangka pasca cedera dengan terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC) dinilai berdasarkan beberapa parameter diantaranya; perbedaan jumlah infiltrasi sel radang netrofil dan makrofag, jumlah angiogenesis dan mioblas pada area cedera antara kelompok perlakuan dan kontrol.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan permasalahan tersebut maka dalam penelitian ini dapat ditarik hipotesis utama yaitu;

Terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MSC) efektif terhadap penyembuhan otot kerangka pasca cedera pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*). Penarikan hipotesis tersebut berdasarkan hipotesis penyerta yaitu antara lain;

1. Pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan lama waktu penyembuhan pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi.
2. Pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan jumlah sel radang pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi.
3. Pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan jumlah angiogenesis pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi.

4. Pemberian terapi *allogenic* BM-MSC efektif berdasarkan jumlah mioblas pasca cedera otot kerangka pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) dibandingkan kontrol tanpa terapi.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian

4.1.1 Tempat penelitian

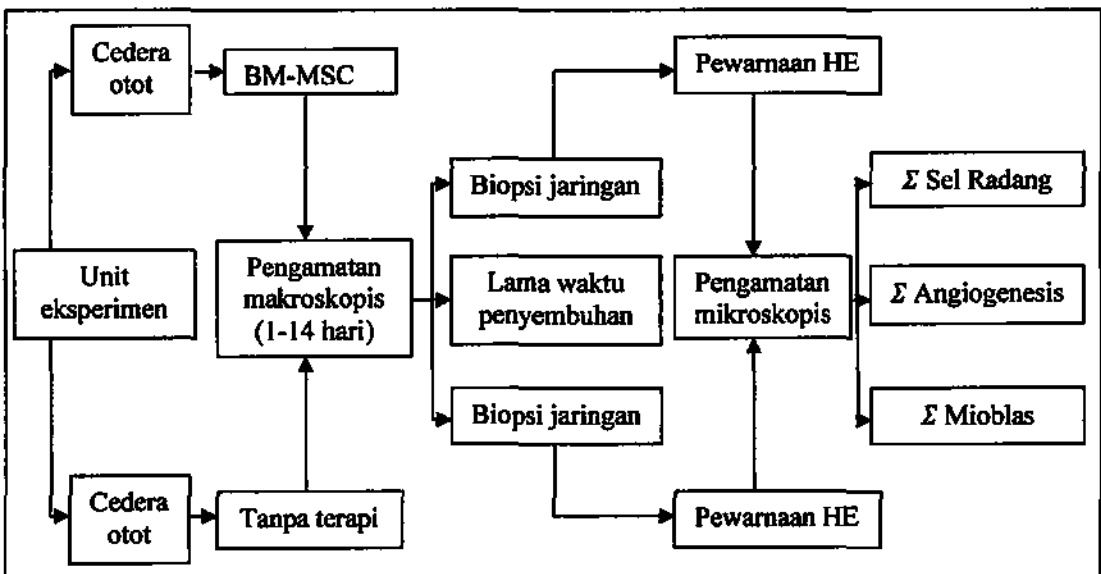
Penelitian ini dilakukan di *Laboratorium Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga* dan *Laboratorium Patologi - Departemen Patologi Veteriner Universitas Airlangga Surabaya*.

4.1.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2011 sampai bulan Desember 2012.

4.2 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 1999) dengan skema sebagai berikut:



Gambar 4.1 Gambar skema rancangan penelitian

Unit eksperimen dibagi dalam dua kelompok ditempatkan pada kandang individu dalam ruangan yang sama dengan pola pemberian pakan, minum, intensitas cahaya dan suhu yang sama. Masing – masing kelompok perlakuan dibuat cedera manipulatif pada otot *gluteus eksternus dexter*. Kelompok perlakuan diberikan terapi *allogenic* BM-MSC sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberikan terapi. Pengamatan lama waktu kesembuhan dibatasi dari hari ke-1 sampai hari ke-14. Hari ke-14 dilakukan biopsi pada daerah cedera untuk dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Pemeriksaan mikroskopis preparat histopatologi dilakukan untuk menghitung jumlah sel radang, angiogenesis dan mioblas.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Penelitian menggunakan kelinci jantan jenis *white* New - Zealand (*Oryctolagus cuniculus*), umur 4-6 bulan, dengan berat rata-rata 1500 gram. Besar sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 9 ekor, sesuai rumus Federrer sebagai berikut;

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

$$2(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 7,5$$

$$n \geq 8,5$$

Penelitian ini menggunakan kelinci dalam satuan individu, maka sampel yang digunakan adalah 9 ekor pada masing-masing kelompok perlakuan. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah memenuhi uji laik etik dengan nomor sertifikat 125-KE yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas

Kedokteran Hewan Universitas Airlangga – *Animal Care and Use Committee (ACUC)* tanggal 2 Mei 2011.

4.4 Variabel dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel penelitian

4.4.1.1 Variabel bebas

Dosis injeksi *allogenic Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell (BM- MSC)* sebanyak 2×10^6 sel.

4.4.1.2 Variabel tergantung

1. Lama waktu penyembuhan cedera otot.
2. Jumlah sel radang.
3. Jumlah angiogenesis.
4. Jumlah mioblas.

4.4.1.3 Variabel kendali

Isolasi *Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell (BM- MSC)*, media kultur, ras kelinci, jenis kelamin, berat badan, umur, jenis pakan dan minum, masa inkubasi.

4.4.2 Definisi operasional penelitian

4.4.2.1 Dosis injeksi *allogenic Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell (BM- MSC)* yaitu penentuan jumlah *mesenchymal stem sel* yang akan di injeksikan disekitar jaringan yang mengalami cedera berdasarkan kriteria menurut Dominici (2006), yaitu sebanyak 2×10^6 sel.

- 4.4.2.2 Lama waktu penyembuhan cedera otot adalah pengamatan fisik secara makroskopis terhadap lama waktu penyembuhan jaringan otot pasca cedera dalam satuan hari. Secara makroskopis luka dinyatakan sembuh ditandai dengan menutupnya luka, hilangnya tanda peradangan dan terkelupasnya keropeng pada permukaan kulit daerah insisi.
- 4.4.2.3 Jumlah sel radang adalah hasil perhitungan sel radang yang meliputi makrofag dan netrofil pada preparat histopatologi dengan pewarnaan HE. Pemeriksaan dilakukan secara mikroskopis dengan cara menghitung jumlah sel radang dalam 5 kali lapangan pandang berbeda pada daerah penyembuhan (*healing centre*) dengan mikroskop perbesaran 1000x.
- 4.4.2.4 Jumlah angiogenesis adalah hasil perhitungan pembuluh darah baru (angiogenesis) pada preparat histopatologi dengan pewarnaan HE. Pemeriksaan dilakukan secara mikroskopis dengan cara menghitung jumlah angiogenesis dalam 5 kali lapangan pandang berbeda pada daerah penyembuhan (*healing centre*) dengan mikroskop perbesaran 1000x.
- 4.4.2.5 Jumlah mioblas adalah hasil perhitungan sel otot muda (mioblas) pada preparat histopatologi dengan pewarnaan HE. Pemeriksaan dilakukan secara mikroskopis dengan cara menghitung jumlah mioblas dalam 5 kali lapangan pandang berbeda pada daerah penyembuhan (*healing centre*) dengan mikroskop perbesaran 1000x.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Aspirasi *bone marrow*

Kelinci dibersihkan dengan sabun cair pada daerah femur dexter. Pembiusan dilakukan menggunakan kombinasi ketamin (Ketamil[®]) dosis 30 mg/kg bb dan xylazin (Xyla[®]) dengan dosis 5 mg/kg bb yang diberikan secara intramuskuler. Observasi dilakukan hingga kelinci mencapai stadium III anestesi. Observasi dilakukan dengan auskultasi detak jantung, nafas dan pemeriksaan temperatur. Pembersihan bulu kelinci dilakukan di daerah femur bagian bawah dari tendon sampai tampak kedua epikondilus kanan kiri dengan mempergunakan silet steril. Pembersihan diteruskan kebagian bawah sampai tulang tibia bagian atas. Perforasi dilakukan dengan trokar antara epikondilus kanan dan kiri. Kemudian dilakukan aspirasi *bone marrow* dari trochanter mayor femur dexter menggunakan *disposable syringe* 10 ml yang sebelumnya telah diberi heparin. Aspirasi *bone marrow* dilakukan secara berulang sampai terkumpul cairan *bone marrow* sebanyak 4-5 ml. Pengobatan setelah aspirasi *bone marrow* menggunakan antibiotik cefadroxyl (Ceftriaxon[®]) dengan dosis 50 mg/hari secara intravena.

4.5.2 Kultur *mesenchymal stem cell*

Kultur *mesenchymal stem cell* dimulai dengan menyiapkan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) steril untuk pencucian sel. PBS steril ditambahkan kedalam tabung 15 ml yang mengandung sampel *bone marrow* hasil aspirasi. Sampel dituangkan melalui tepi tabung secara perlahan-lahan kedalam *Ficol-*

isopaque dengan densitas 1,077. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada temperatur 20°C selama 5 menit dengan kecepatan 1.600 rpm. Hasil sentrifugasi memisahkan lapisan sel mononuklear ditandai dengan bentukan seperti cincin putih (*buffy coat*). Kemudian *buffy coat* diambil dan dituangkan kedalam tabung disposable steril 15 ml. PBS ditambahkan untuk mencuci sel dan dilakukan sentrifugasi kembali. Supernatan dibuang sehingga didapatkan *pellet*. *Pellet* diresuspensi dengan medium penumbuh α - *Minimum Essential Medium* (α -MEM) secara perlahan sehingga membran sel tidak rusak. Suspensi dituang ke dalam *petri dish* steril dengan diameter 10 cm kemudian diperiksa dibawah mikroskop untuk memastikan gambaran sel. *Petri dish* dimasukkan dalam inkubator CO₂ dengan temperatur 37° C yang mengandung 5% CO₂. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk memastikan bahwa sel tumbuh dengan baik atau terkontaminasi.

Setelah 3 - 4 hari dilakukan pasase sebanyak 1 - 2 kali untuk mempercepat pertumbuhan. *Petri dish* berdiameter 10 cm yang berisi sel dan medium dikeluarkan dari inkubator. Medium diambil dengan pipet. Sel dicuci dengan 5 ml PBS steril sebanyak dua kali, dengan cara dituang dari tepi. Tripsin EDTA ditambahkan sebanyak 1,5 ml, selanjutnya dimasukkan kedalam inkubator selama 5 menit untuk memberi kesempatan sel akan lepas. Petri selanjutnya dikeluarkan dari inkubator, tripsin dalam petri dikurangi 1 ml sehingga tersisa 0,5 ml tripsin. Medium ditambahkan sebanyak 10 ml, dan selanjutnya dibagi menjadi dua bagian. Masing-masing 5 ml dituangkan ke dalam petri. Sehingga

dari satu petri menjadi dua petri. Dari dua petri awal akan diperoleh empat petri yang masing-masing mengandung 5 ml.

4.5.3 Pewarnaan imunositokimia

Kultur sel disentrifuse dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit pada suhu 23°C. Supernatan dibuang dan *pellet* ditambah 200 mikro PBS kemudian diresuspensi, dipindahkan pada tabung disposable 15ml yang steril dan ditambah PBS 10 ml. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 300 rpm selama 5 menit dengan suhu 23°C. *Pellet* yang diperoleh ditambahkan medium penumbuh α -MEM sebanyak 1ml. *Object glass* disiapkan dan dibersihkan dengan alkohol terlebih dahulu, kemudia sel ditanam pada *object glass*, kemudian difiksasi dengan metanol aceton dan diinkubasi selama 15 menit. Sel yang terfiksasi dicuci dengan PBS dan dibiarkan agak kering, kemudian dilakukan bloking dengan PBS yang mengandung FBS 1% dan diinkubasi selama 15 menit, kemudian dicuci dengan PBS kembali dan dibiarkan agak kering. Setelah itu masing-masing ditambahkan 5 mikro antibodi monoklonal Flouresence Isothiocyanate (FITC) anti CD 105, anti CD 45 dan diinkubasi selama 45 menit dalam suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluorescence.

4.5.4 Analisis *flowcytometri*

Stem cell yang telah tumbuh monolayer (*confluent* 90%) dilakukan tripsinasi 0,025% pada temperatur 37° C selama 2-3 menit. Single sel hasil

tripsinasi dicuci dan dihitung dengan *hemocytometer*. Sel yang diperlukan adalah 1000 sel. Setelah itu dilakukan fixasi dengan ethanol / aseton pada suhu 20° C. Setelah itu dicuci dengan PBS selanjutnya sel direaksikan dengan anti CD 105 dan anti CD 45, kemudian dilakukan analisis *flowcytometry* menggunakan alat *flowcytometer*.

4.5.5 Mobilisasi BM-MSC ke daerah cedera

Kelinci dianastesi umum dan dibuat luka pada daerah otot gluteus eksternus dengan scalpel hingga kedalaman 1 cm. Sebanyak 2×10^6 BM-MSC diinjeksikan ke daerah cedera. Luka ditutup kasa steril dan diplester.

4.5.6 Biopsi jaringan otot

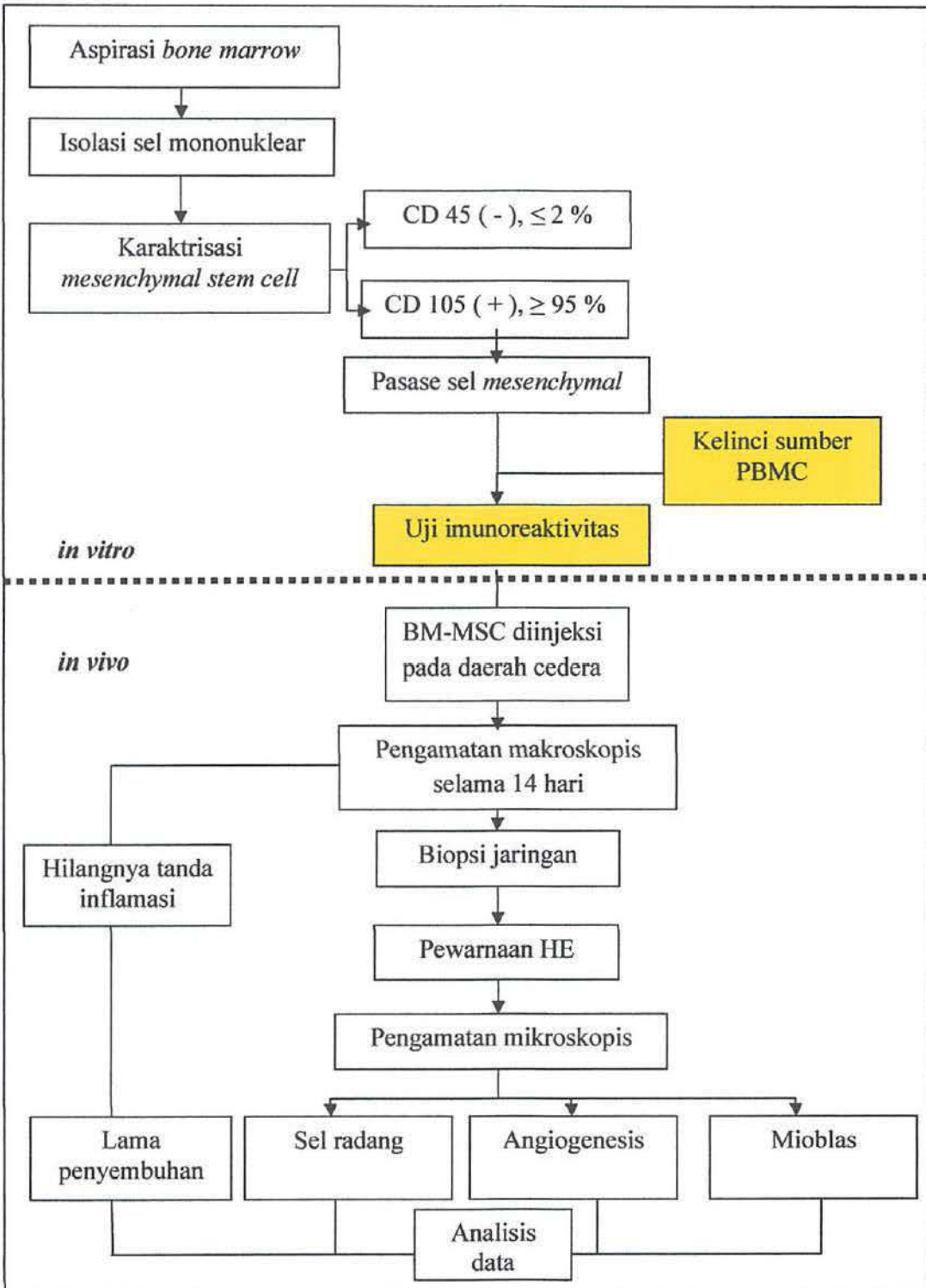
Biopsi jaringan dilakukan pada hari ke-14 setelah mobilisasi BM-MSC. Sebanyak 1x1x1 cm otot gluteus di potong di daerah cedera dengan kondisi kelinci yang telah teranastesi. Jaringan yang telah diambil dimasukkan kedalam media formalin 10%. Jaringan ini disimpan selama 24 jam sebelum dilakukan parafin block untuk pewarnaan.

4.5.7 Pewarnaan Jaringan Dengan HE

Jaringan otot yang telah direndam dalam formalin 10% selama 24 jam, dipotong kecil (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) dan dicuci dengan air mengalir. Proses selanjutnya yaitu proses dehidrasi cairan dalam jaringan dengan alkohol (70%-80%-96%-100%). Setelah itu jaringan dilakukan clearing menggunakan serial

Xylol (xylol I-xylol II). Tahapan selanjutnya yaitu bloking jaringan dengan parafin. Setelah parafin block kering dapat dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom. Hasil potongan direkatkan pada *object glass*. Selanjutnya dapat diwarnai dengan hematoxylin eosin. Setelah pewarnaan selesai ditutup dengan *cover glass*.

4.6 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.2 Gambar skema alur kerja penelitian

4.7 Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan makroskopis kesembuhan diamati dengan melihat luka pasca manipulatif pada kelinci setiap hari. Hasil pengamatan lama waktu kesembuhan merupakan data kuantitatif yang diperoleh melalui pengamatan luka tiap hari hingga luka telah menunjukkan tanda kesembuhan yang sempurna dalam hitungan hari. Secara makroskopis suatu bentukan cedera pada kulit dikatakan sembuh bila tanda – tanda peradangan telah hilang, kulit menutup sempurna dan terkelupasnya keropeng. (Thomson, 1984, Price and Wilson, 2002). Pengamatan mikroskopis dimaksudkan untuk menghitung jumlah sel – sel radang seperti makrofag, sel neutrofil, angiogenesis dan mioblas pada jaringan otot yang dilukai. Data yang didapat merupakan data kuantitatif yang diperoleh dengan cara menghitung jumlah sel-sel tersebut diatas dalam pewarnaan HE yang ditemukan dalam lima lapangan pandang yang berbeda pada pembesaran 1000x dengan mikroskop.

Dari hasil pengamatan akan dilakukan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov untuk melihat distribusi data. Data yang berdistribusi normal dan homogen kemudian diuji statistik dengan menggunakan metode analisis *multivariate* dengan uji *Hotellings Trace (multiple independent T-Test)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok pelakuan serta efektivitas terapi *allogenic BM-MSC*. Data yang diperoleh dikumpulkan dan diolah dengan *software SPSS version 15* untuk *microsoft windows*.

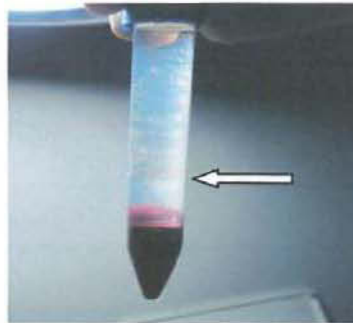
BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 HASIL PENELITIAN

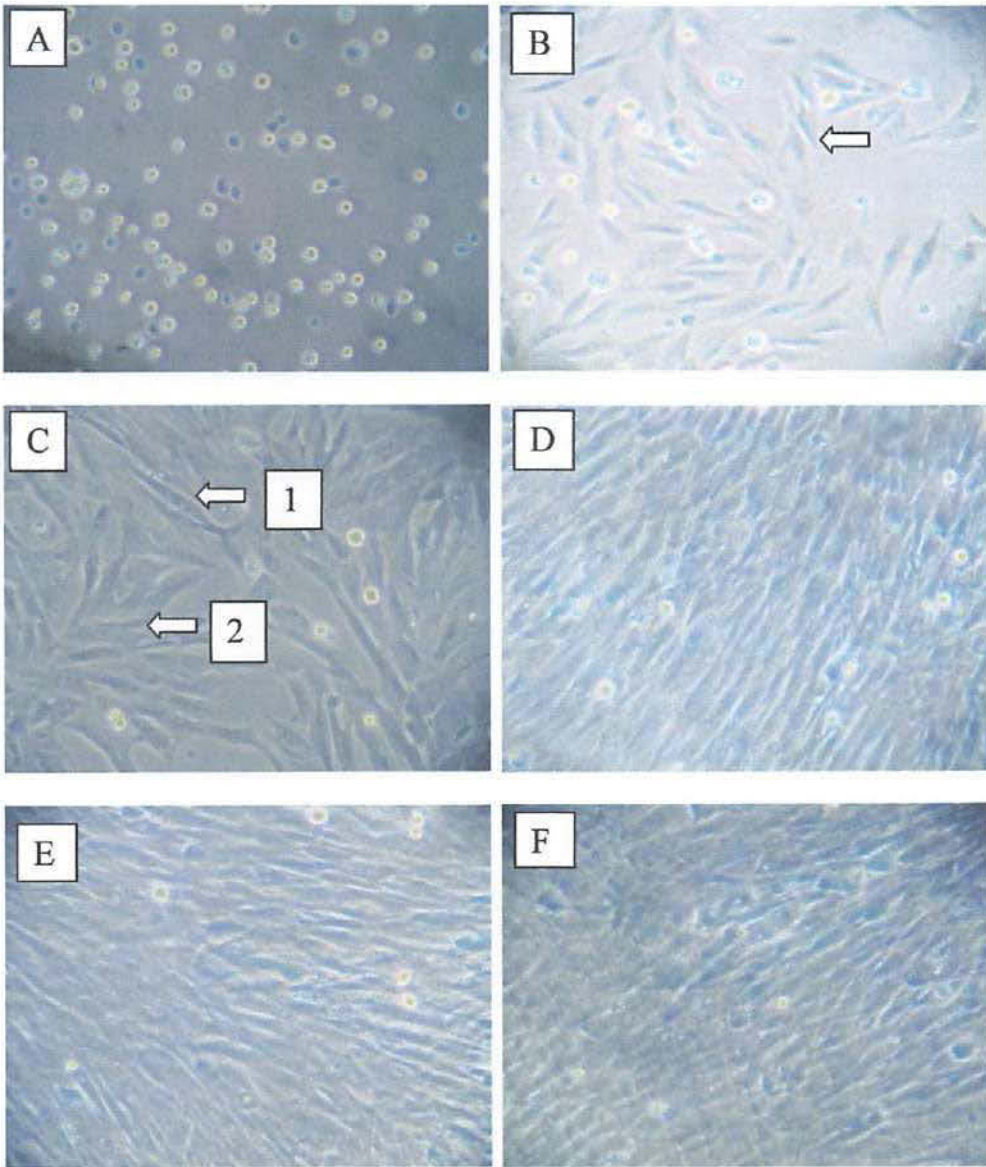
5.1 Isolasi dan identifikasi *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*

Aspirasi dilakukan pada kelinci donor di bagian trochanter tulang femur. Proses aspirasi *bone marrow* kelinci donor dilakukan dengan prosedur anestesi umum melalui standart aseptis operasi bedah mayor. *Stem cell* dari lapisan sel mononuklear hasil aspirasi tersebut selanjutnya dapat dipisahkan secara khusus dengan *Ficol gradient density* 1,077 menggunakan teknik sentrifuge. Hasil aspirasi *bone marrow* sebanyak 5 ml dengan *syringe* 10 ml yang telah diberikan heparin sebagai anti koagulan. Hasil *Ficol gradient density* 1.077 dengan sentrifugasi didapatkan sejumlah sel mononuklear membentuk lapisan seperti cincin (*buffy coat*).



Gambar 5.1 Hasil sentrifugasi *Ficol gradient density* 1.077 didapatkan lapisan sel mononuklear (*buffy coat*) seperti cincin putih yang ditunjukkan dengan tanda panah.

Sel mononuklear hasil aspirasi terdiri dari *hematopoeitic stem cell* dan *mesenchymal stem cell*. Sel mononuklear dikultur dalam medium penumbuh dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C dan dipasase sebanyak dua kali.



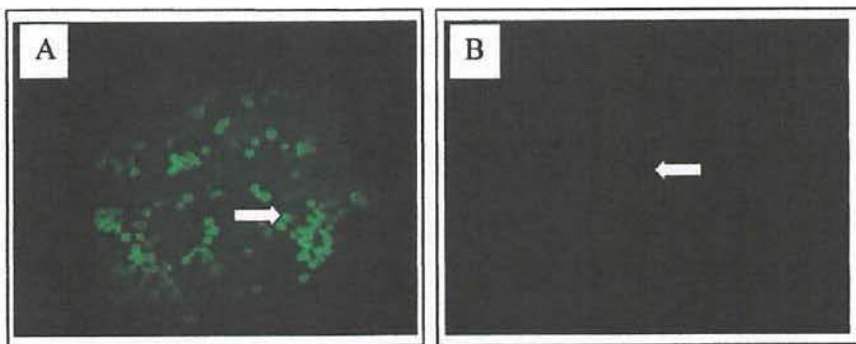
Gambar 5.2 Hasil pengamatan kultur *mesenchymal stem cell*. menggunakan mikroskop *inverted* dengan pembesaran 40x. A. Hari pertama, satu jam setelah kultur hanya tampak sel mononuklear, B. Hari kedua, *mesenchymal stem cell* melekat pada dasar *petri dish* seperti yang ditunjukkan tanda panah. C. Hari ketiga, sel berkembang menjadi bentukan ditunjukkan tanda panah 1. gelendong, 2. *rhomboidal*. D. Hari keempat pertumbuhan sel hampir memenuhi *petri dish*, E. Hari kelima sel confluent 90% dan F. Hari keenam, sel berkembang lebih matang memenuhi *petri dish* dan siap dipanen.

Sel mononuklear yang terdiri dari hematopoietik *stem cell* dan *mesenchymal stem cell* dapat dibedakan dengan melekat atau tidaknya sel dipermukaan dinding petri. Hematopoietik *stem cell* tidak melekat pada permukaan dinding petri yang selanjutnya secara bertahap dibersihkan dengan cara pencucian. Hasil ekspansi *mesenchymal stem cell* pada pasase ke – 3 hanya diambil sebanyak 2×10^6 untuk digunakan sebagai terapi cedera otot secara lokal.

5.2 Karakterisasi *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*

5.2.1 Hasil pewarnaan imunositokimia

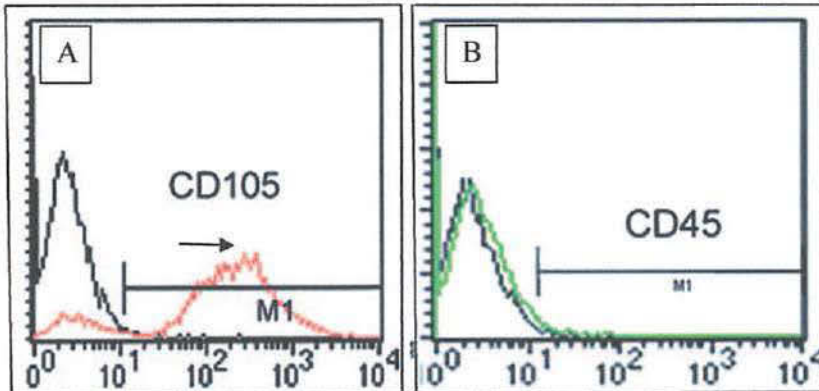
Karakterisasi *mesenchymal stem cell* dilakukan untuk memastikan sel yang telah dikultur merupakan *mesenchymal stem cell*. *Mesenchymal stem cell* mempunyai penanda permukaan sel CD105. Sel tersebut dapat diidentifikasi dengan menggunakan *Flourescein Isothiocyanate* (FITC) anti-human CD105. Keberadaan hematopoietik *stem cell* dalam kultur sel harus dipastikan. hematopoietik *stem cell* mempunyai penanda permukaan sel CD45. Hasil penelitian ini didapatkan ekspresi CD105⁺ yang ditandai dengan warna hijau. Sel yang tumbuh merupakan *mesenchymal stem cell*.



Gambar 5.3 Analisis fenotip BM-MSK dengan marker CD105 dan CD45 dilabel *FITC*. *Mesenchymal Stem Cell*, A). (CD105 positif) ditunjukkan perpendaran warna hijau sedangkan B tidak memendarkan warna (CD45 negatif).

5.2.2 Hasil analisis *flowcytometry*

Hasil analisis *flowcitometry* menunjukkan sel mononuklear yang diisolasi merupakan *mesenchymal stem cell* dengan penanda CD 105⁺ dan CD 45⁻ seperti yang ditunjukkan diagram di bawah ini :



Gambar 5.4 Analisis fenotipe dengan flowcytometri. Gambar A, grafik berwarna merah merupakan populasi sampel yang menunjukkan sekelompok sel yang ditandai dengan penanda anti CD 105 yang berarti sampel tersebut merupakan *Mesenchymal Stem Cell* (CD105⁺), sedangkan pada gambar B marker CD45 negatif.

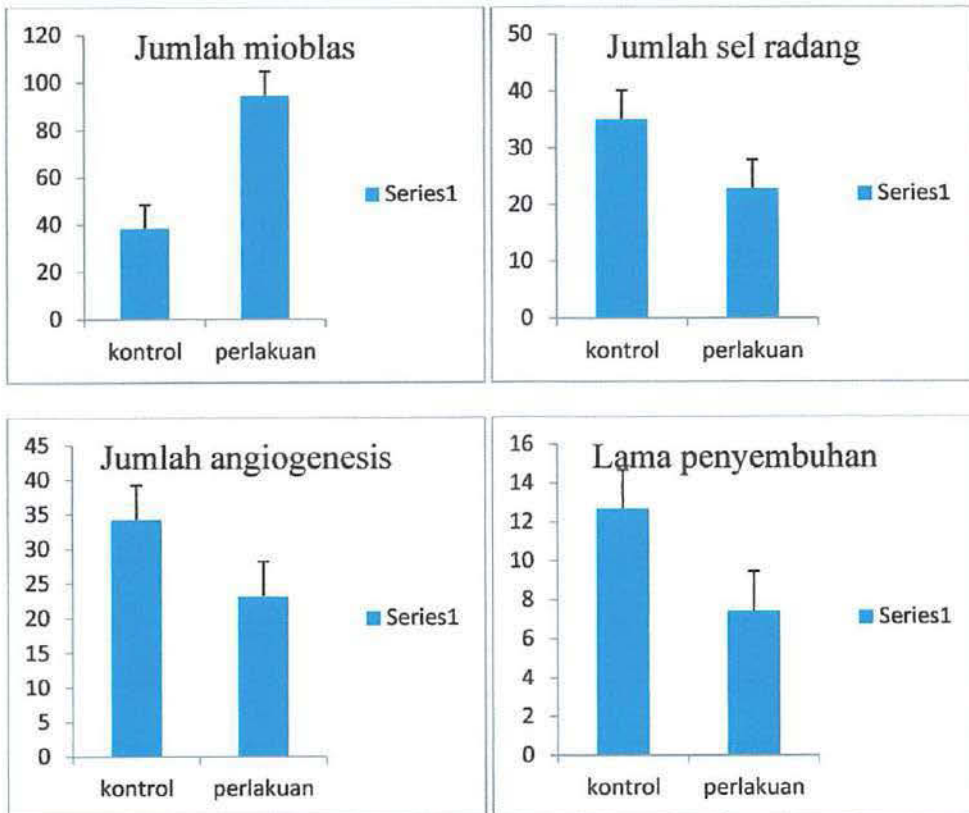
5.3 Hasil Pemeriksaan Dan Analisis Data

Hasil pemeriksaan makroskopis lama waktu penyembuhan cedera dan pemeriksaan mikroskopis terhadap jumlah sel radang, angiogenesis dan mioblas. Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif yang selanjutnya diolah menggunakan program SPSS dengan analisis *multivariate*. Berikut tabel hasil analisis data beserta diagram hasil penelitian.

Tabel 5.1 Data multivariansi kelompok perlakuan dan kontrol

Descriptive Statistics

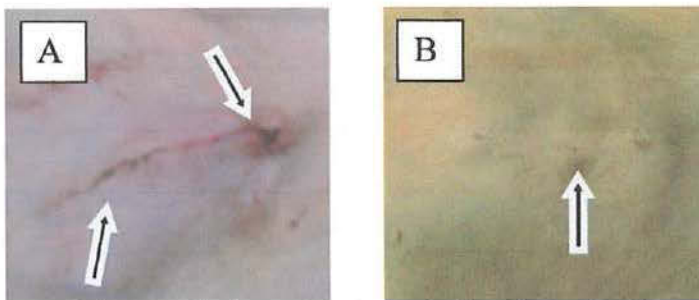
	PERLAKUAN	Mean	Std. Deviation	N
MYOBLAS	KONTROL	38,33	10,700	9
	PERLAKUAN	94,56	28,923	9
	Total	66,44	35,837	18
SELRADANG	KONTROL	35,11	5,925	9
	PERLAKUAN	22,89	3,822	9
	Total	29,00	7,934	18
ANGIOGENESIS	KONTROL	34,22	3,768	9
	PERLAKUAN	23,11	3,018	9
	Total	28,67	6,607	18
WAKTUPENYEMBUHAN	KONTROL	12,67	1,000	9
	PERLAKUAN	7,44	,882	9
	Total	10,06	2,838	18



Gambar 5.5 Diagram hasil penelitian

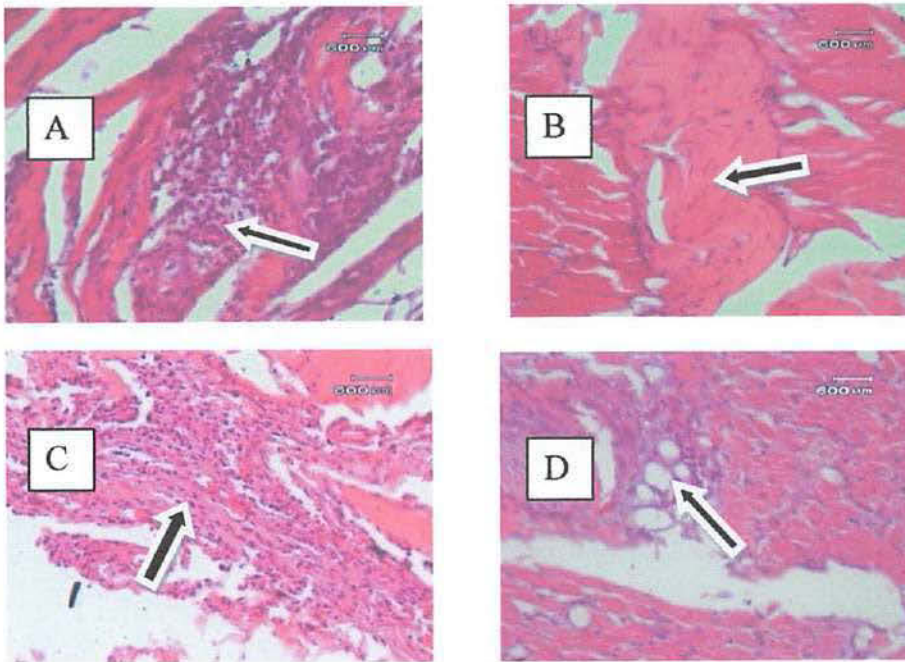
Penilaian dilakukan dengan pengamatan bekas cedera pada kulit yang dimulai hari ke 1 sampai hari ke 14. Menurut Mc Gavin dan Zachary (2007), fase terakhir proses penyembuhan normal cedera steril terjadi pada minggu ke-2. Lama waktu penyembuhan luka adalah waktu dalam hari yang ditentukan berdasarkan hilangnya tanda peradangan. Luka dianggap sembuh bila memenuhi kriteria sebagai berikut : tidak ada tanda makroskopis peradangan (*calor, rubor, dolor, tumor* dan *functio laesa*), luka telah kering, tidak ada eksudat, luka menutup daerah luka rata dengan tepi luka serta, terkelupasnya keropeng (Thomson, 1984, Price and Wilson, 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata waktu penyembuhan pada kelompok perlakuan $7,44 \pm 0.882$ hari sedangkan pada kelompok kontrol diperoleh hasil 12.67 ± 1.000 . Terapi *allogenic* BM-MSC memberikan waktu penyembuhan lebih cepat dibanding kontrol ($p < 0.05$). Setelah pengelupasan keropeng kelompok perlakuan terlihat zona merah muda yang merupakan jaringan granulasi yang semakin matang sampai hari ke-14. Pada kelompok kontrol permukaan luka lebih menonjol oleh bentukan parut atau sikatrik. Berikut merupakan data penilaian lama waktu penyembuhan cedera.

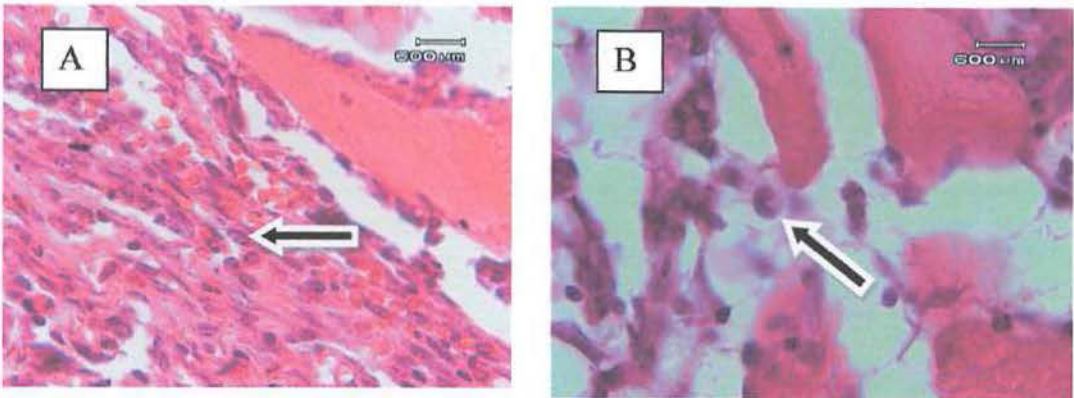


Gambar 5.5 Analisis patologi anatomi hari ke 9 pada kontrol A, masih menunjukkan tanda-tanda peradangan, perlakuan B luka telah sembuh dengan ditandai terkelupasnya keropeng dan tidak terdapat lagi tanda peradangan.

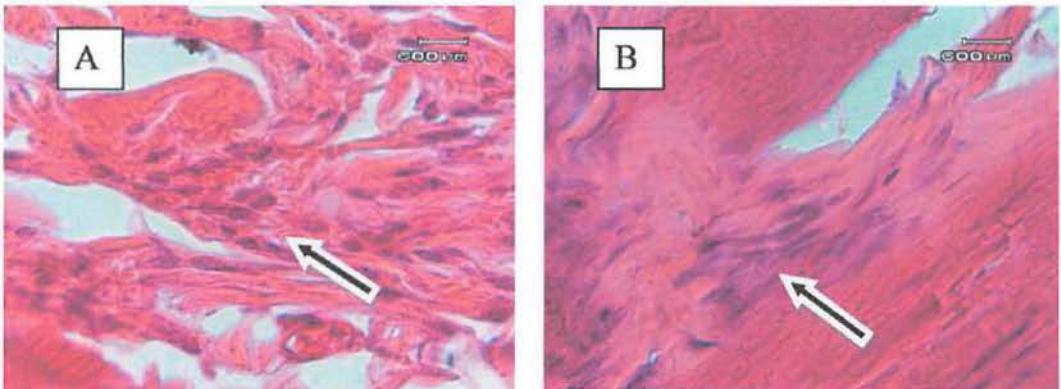
Pemeriksaan histopatologi jaringan otot untuk menghitung jumlah sel-sel radang, jumlah kapiler (angiogenesis) dan jumlah sel pada jaringan otot kerangka pasca cedera. Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif yang didapatkan dengan cara menghitung jumlah sel-sel radang, jumlah kapiler (angiogenesis) dan sel mloblas yang ditemukan pada area penyembuhan (*healing center*) dalam lima lapangan pandang yang berbeda pada pembesaran 1000x menggunakan mikroskop (*OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel*). Hasil pemeriksaan preparat histopatologi sebagai berikut:



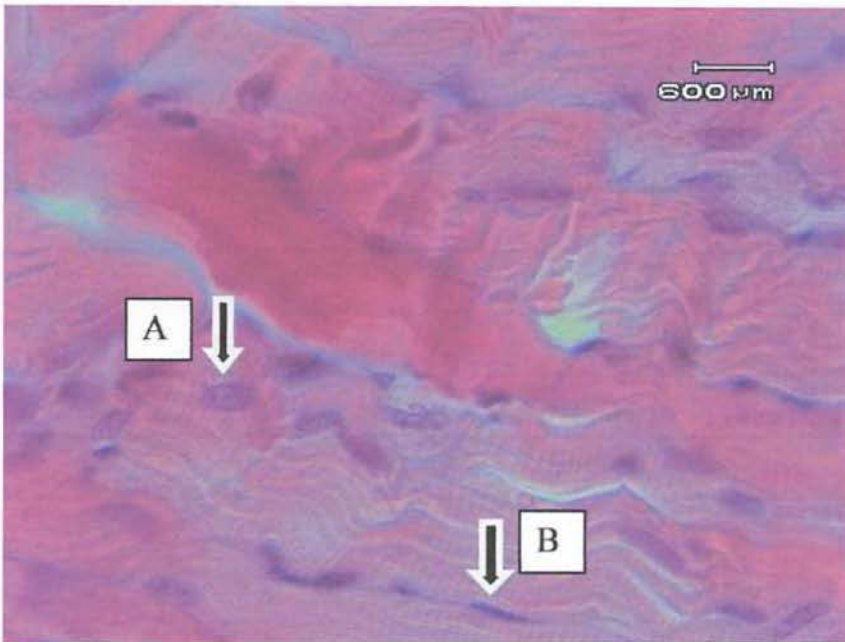
Gambar 5.6 Analisis histopatologi proses penyembuhan. Kelompok kontrol A dan B, daerah *healing center* masih didominasi oleh sel-sel fibroblas dan sedikit sel otot muda juga masih terdapat sel-sel radang dan pembuluh kapiler yang signifikan. Sedangkan pada kelompok yang mendapat perlakuan C dan D, sel-sel mioblas nampak lebih matang yang ditandai dengan inti sel yang lebih kecil serta anak inti yang tidak jelas, dan sel radang serta pembuluh kapiler yang jauh berkurang. (pewarnaan HE; pembesaran 400x; *OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel*).



Gambar 5.7 Respon penyembuhan pada area *healing center* pada kelompok kontrol. Pada slide A, nampak sel-sel myoblas muda yang ditandai dengan inti yang besar dan anak inti yang jelas (panah) dan resolusi yang lambat, ditandai dengan dengan pembuluh kapiler yang masih dominan dan masih adanya sel-sel radang makrofag (slide B) (pewarnaan HE; pembesaran 1000x; OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel).



Gambar 5.8 Slide A dan B Menunjukkan respon penyembuhan pada area *healing center* pada kelompok perlakuan. Nampak sel-sel myoblast yang lebih matang (panah) yang ditandai dengan inti yang mengecil dan anak inti tidak jelas (panah) dan resolusi nampak baik yang ditandai dengan menurunnya jumlah pembuluh kapiler dan sel radang (pewarnaan HE; pembesaran 1000x; OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel).



Gambar 5.9 Perbandingan morfologi sel otot muda (mioblas) pada tengah daerah luka (panah A) sedangkan pada daerah yang lebih ke tepi (panah B) sel otot tampak lebih pipih dan lebih tua (miosit). (pewarnaan HE; pembesaran 1000x; OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel).

Data penelitian ini diperoleh dari hasil pemeriksaan histopatologi jaringan otot pasca cedera dengan pewarnaan HE pada hari ke -14. Hasil penghitungan jumlah sel radang perlakuan terapi alogenic BM-MSC 22.89 ± 3.822 berbeda nyata ($p < 0.05$) antara dengan kontrol 35.11 ± 5.925 . Kelompok perlakuan menunjukkan penurunan jumlah sel radang pada hari ke-14 dibandingkan kontrol. Pada kelompok kontrol masih didapatkan sel- sel radang pada hari ke -14. Sel- sel tersebut didominasi oleh makrofag dan netrofil. Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan nyata dalam jumlah pembuluh darah baru (angiogenesis) hari ke 14 pada area penyembuhan. Kelompok kontrol menunjukkan jumlah yang lebih tinggi $34.22^a \pm 3.768$ dibandingkan perlakuan terapi *allogenic* BM-MSC lebih rendah

yaitu 23.11 ± 3.018 . Jumlah mioblas pada penelitian ini menunjukkan peningkatan pada hari ke-14 bila dibandingkan kontrol tanpa terapi. Pemberian terapi *allogenic* BM-MSK didapatkan mioblas 94.56 ± 28.923 jauh melebihi kelompok kontrol dengan jumlah $38.33^a \pm 10.700$.

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Isolasi dan Identifikasi *Bone Marrow Mesenchymalstem Cell*

Penyembuhan cedera pada jaringan otot prinsipnya ingin diperoleh kembali komposisi penyusun jaringan otot yang seperti semula dan didapatkan fungsi kontraksi yang baik. Lama waktu penyembuhan cedera juga mempengaruhi komposisi jaringan yang akan dibentuk. Keterlambatan waktu penyembuhan menyebabkan deposisi jaringan ikat serta kemungkinan infeksi sekunder. Penggunaan *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-MCS) dalam terapi cedera otot, diharapkan mampu menggantikan sel otot yang rusak serta mencegah terjadinya komplikasi akibat keterlambatan penyembuhan.

Penelitian ini menggunakan model *allogenic Mesenchymal Stem Cell* dari satu kelinci donor yang selanjutnya diaplikasikan pada 9 ekor kelinci sebagai resipien. Penggunaan *allogenic Mesenchymal Stem Cell* sebagai model terapi dimaksudkan sekaligus untuk membuktikan imunogenisitas BM-MSK yang rendah yang memungkinkan aplikasi tanpa rejeksi. Sumber *stem cell* dari sum-sum tulang digunakan dalam penelitian ini dengan alasan mudah diisolasi dan tidak menimbulkan resiko yang berarti bagi hewan pendonor (Suroto, 2011).

Teknologi media kultur mempunyai peran penting dalam kecepatan proliferasi *Mesenchymal Stem Cell*, *Mesenchymal Stem Cell*. Penelitian menggunakan media penumbuh α Minimal Essential Medium (α -MEM), Berdasarkan hasil kultur *stem cell* pada penelitian ini menunjukkan adanya perkembangan *mesenchymal stem cell* yang melekat pada dasar *petri dish* (*plastic*

adherent) yang diamati secara mikroskopis. Pengamatan pada hari pertama *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* selama satu jam setelah kultur pada media, hanya tampak morfologi sel mononuklear, sel masih melayang pada medium kultur. Hari kedua *mesenchymal stem cell* melekat pada permukaan dasar dinding petri yang berbentuk gelendong seperti fibroblas (*Fibroblast-like Forming Unit*). Hari ketiga sel berkembang hampir memenuhi dasar dinding petri berbentuk gelendong dan sebagian berbentuk *rhomboidal*. *Rhomboidal* adalah bentukan seperti persegi panjang yang telah miring ke satu sisi. Hari keempat sel semakin berkembang dan semakin memenuhi petri. Hari kelima sel confluent 90% dan hari keenam, sel berkembang lebih matang memenuhi *petri dish* dan siap dipanen. *Mesenchymal stem cell* yang dikultur mampu berkembang secara *confluence* karena didukung oleh kondisi lingkungan yang sesuai yang dibutuhkan oleh *stem cell* tersebut.

6.2 Karakterisasi *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*

6.2.1 Pewarnaan immunositokimia

Freshney *et al.* (2007) mengatakan bahwa *Mesenchymal Stem Cell* tidak mudah untuk diidentifikasi dengan pengamatan mikroskop biasa. Pengamatan sel tidak tampak pada mikroskop biasa oleh sebab itu analisis fenotip permukaan sel berguna untuk memastikan sel tersebut. Karakterisasi *Mesenchymal Stem Cell* perlu dilakukan untuk memastikan bahwa sel yang dikultur benar merupakan *Mesenchymal Stem Cell*. Karakterisasi antigen permukaan dilakukan untuk memastikan sel tersebut menggunakan metode pewarnaan immunositokimia. *Mesenchymal Stem Cell* mengekspresikan CD105 positif dan CD45 negatif. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya

ekspresi CD105 positif (Gambar 5.2A) yang ditandai dengan perpendaran warna hijau fluorescence dan CD45 negatif (Gambar 5.2B) yang tampak gelap. Berdasarkan analisis tersebut menunjukkan bahwa sel yang berkembang pada dasar piring petri tersebut merupakan *Mesenchymal Stem Cell*.

6.2.2 Analisis *Flowcytometry*

Analisis *Flowcytometry* digunakan untuk memastikan sel yang tumbuh adalah *mesenchymal* dengan menggunakan marker CD105 dan CD45 secara kuantitatif untuk menghitung prosentase pertumbuhannya. Hasil analisis *flocytometry* menunjukkan CD105⁺ yang ditandai grafik merah (gambar 5.2.2) sedangkan pada gambar ke -2 diperoleh CD45⁻. Hasil pemeriksaan ini menunjukkan keberhasilan proses kultur dari *mesenchymal* itu sendiri tanpa terjadi kontaminasi dengan sel hematopoeitik. *Mesenchymal stem cell* memiliki kemampuan untuk melekat pada dasar piring petri (*plastic adherent*) dan memiliki karakteristik *Fenotipe* Positif ($\geq 95\%$) terdiri dari CD 105, CD 73, CD 90. Negatif ($\leq 2\%$) terdiri dari CD 45, CD 34, CD atau CD 11b, CD 79 α atau HLA-DR. 3 (Dominici, 2006; Freshney *et al.*, 2007).

6.3 Lama Waktu Penyembuhan Cedera

Cedera merupakan kerusakan jaringan tubuh yang disebabkan oleh faktor – faktor fisik disertai gangguan normal struktur kontinuitas. Penelitian ini membuat cedera manipulatif dengan insisi pada otot yang meliputi jaringan diluarnya seperti epidermis dan kulit. Lama waktu kesembuhan diamati secara makroskopis dengan melihat indikasi penyembuhan cedera pada kulit. Kesembuhan cedera pada kulit

diharapkan mempunyai korelasi positif dengan keadaan penyembuhan jaringan dengan cedera lebih dalam meliputi yang epidermis dan jaringan otot. Secara makroskopis suatu bentukan cedera pada kulit dikatakan sembuh bila tanda – tanda peradangan telah hilang, kulit menutup sempurna dan terkelupasnya keropeng. (Thomson, 1984, Price and Wilson, 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang nyata dalam hal waktu kesembuhan cedera antara perlakuan *allogenic* BM-MSC dan kontrol tanpa terapi. Pada kelompok kontrol kesembuhan cedera lebih lama dikarenakan tidak adanya fungsi penekanan inflamasi itu sendiri. Respon inflamasi terjadi secara alami oleh mekanisme tubuh. Inflamasi merupakan fenomena yang menguntungkan dan defensif yang menghasilkan netralisasi dan eliminasi agen penyerang, penghancuran jaringan nekrotik dan terbentuknya keadaan yang diperlukan untuk perbaikan dan pemulihan. Fase inflamasi yang tidak dihambat menyebabkan respon vaskuler dan seluler yang berlebihan. Pembersihan debris dan jaringan nekrotik oleh sel radang seperti makrofag dan PMN bersama protein terlarut membentuk pus atau nanah. Penyembuhan luka dapat terganggu jika terdapat benda asing, jaringan nekrotik berlebihan dan infeksi (Price and Wilson, 2002).

Sejalan dengan parameter kesembuhan cedera pada jaringan lebih dalam yaitu pada sel otot yang meliputi jumlah sel radang dan angiogenesis, terapi *allogenic* BM-MSC memberikan dampak kesembuhan pada jaringan yang lebih superfisial lebih cepat. Menurut Newman *et al.* (2009), *mesenchymal stem cell* mampu meregulasi inflamasi dan respon imun. Meskipun kemampuannya dalam meregenerasi jaringan sangat penting, beberapa fungsi signifikan *Mesenchymal*

Stem Cell antara lain termasuk regulasi hematopoiesis, sekresi faktor yang membantu penyembuhan cedera dengan mencegah apoptosis dan menstimulasi faktor endogen seluler (Pittenger, 1999).

Mesenchymal Stem Cell memegang peran penting dalam regulasi sistem imun pada daerah cedera. *Mesenchymal Stem Cell* merespon inflamasi dengan menuju target jaringan yang mengalami cedera (*homing mechanism*) yang selanjutnya mengontrol inflamasi secara lokal. Karakter penting dari *mesenchymal stem cell* yaitu mengekspresi berbagai macam reseptor kemokin dan sitokin. Sehingga mampu menuju target inflamasi bersamaan dengan migrasi kemokin dan sitokin inflamasi. *Mesenchymal Stem Cell* memungkinkan administrasi terapi lebih mudah. Aplikasi *Mesenchymal Stem Cell* dapat diberikan intra vena yang kemudian mampu menuju lokasi target inflamasi. *Mesenchymal stem cell* mampu merespon *microenvironment* dan meregulasi sistem imun lokal. Berbagai cara *Mesenchymal Stem Cell* dalam mengatur sistem imun antara lain regulasi respon sel T anti inflamasi dan secara langsung menekan fungsi NK sel. Regulasi sistem imun oleh *Mesenchymal stem cell* terjadi hanya sebatas jaringan lokal tidak sistemik seperti pada beberapa terapi steroid dimana terjadi penekanan inflamasi secara sistemik yang menyebabkan berbagai komplikasi klinis.

6.4 Pemeriksaan Histopatologi Jaringan Otot

Tujuan utama pemberian terapi pada proses penyembuhan cedera otot kerangka adalah penutupan area cedera secara cepat dengan estetika dan fungsional yang memuaskan. Hasil tersebut dapat diperoleh dengan memahami proses biologis

dalam proses penyembuhan dan regenerasi jaringan otot yang mengalami cedera. Beberapa penelitian terdahulu telah diketahui bahwa proses penyembuhan luka dipengaruhi beberapa hal antara lain; komunikasi antar sel, sinyal kimia dan beberapa ekstraseluler matrik. Setelah fase embrional tubuh kehilangan kemampuan memperbaiki jaringan rusak tanpa meninggalkan *scar*. Telah diketahui bahwa secara garis besar proses penyembuhan cedera dibagi dalam tiga fase yang kadang-kadang saling tumpang tindih. Fase tersebut antara lain; inflamasi, proliferasi dan remodeling (Pettersson, 2009).

6.3.1 Jumlah sel radang

Data penelitian ini diperoleh dari hasil pemeriksaan jaringan otot pasca cedera pada hari ke -14. Hasil penghitungan jumlah sel radang berbeda nyata ($p < 0.05$) antara perlakuan terapi allogenic BM-MSC dan kontrol. Kelompok kontrol menunjukkan masih adanya sel-sel radang pada hari ke -14. Sel-sel tersebut didominasi oleh makrofag dan netrofil. Makrofag dan netrofil memegang peran penting pada tahap inflamasi. Sel radang tersebut berfungsi memfagosit dan membersihkan debris jaringan mati yang terjadi akibat cedera. Makrofag juga berperan dalam *sitokine networking* yang mengatur peradangan serta memicu beberapa faktor pertumbuhan (Miyagawa *et al*, 1995).

Dalam fase remodeling (minggu ke-2) keberadaan sel radang harusnya mulai berkurang. Keberadaan sel radang dalam jumlah berlebihan pada fase remodeling memicu peradangan kronis yang memicu pembentukan jaringan ikat yang buruk (Price dan Wilson, 2002). Pemberian terapi 2×10^6 *allogenic*

BM-MSC pada cedera otot mampu menurunkan jumlah sel radang pada fase remodeling. Hal ini di duga adanya peran *Endothelial Progenitor Cell* (EPC) yang terdapat dalam *mesenchymal stem cell*. Menurut Baratawidjaja (2001), EPC berbentuk seperti *spindle*, menyerupai sel-sel fibroblast (*fibroblast like*) yang akan berfungsi sebagai untuk mengurangi respon seluler reaksi inflamasi seperti netrofil, makrofag dan limfosit. Korelasi antara fase penyembuhan cedera dengan migrasi beberapa populasi sel radang. Minggu pertama (1-7 hari) beberapa sel radang seperti netrofil, makrofag dan limfosit ditemukan dalam jumlah signifikan, tetapi pada fase regenerasi jumlahnya jauh semakin berkurang (Davies, 2012).

BM-MSC diketahui mampu mensekresi PGE yang menstimulasi makrofag memproduksi IL-6. IL-10 berperan dalam penghambatan netrofil menuju jaringan cedera dan mencegah kerusakan oksidatif (Ghannam *et al*, 2010). Toubai *et al*. (2009) menyatakan bahwa *Mesenchymal Stem Cell* dapat secara langsung menekan proliferasi sel T naif maupun sel T memori melalui mediasi kontak sel atau mitogenik stimuli maupun melalui faktor terlarut. *Mesenchymal Stem Cell* dapat menurunkan produksi IFN γ dan secara tidak langsung meningkatkan produksi IL-4 oleh sel Th2, hal tersebut dikemukakan pula oleh Maitra *et al*. (2004), dalam penelitiannya menunjukkan bahwa *allogenic Mesenchymal Stem Cell* tidak bersifat imunogenik, tetapi lebih kearah immunosupresif, efek tersebut pada *Mesenchymal Stem Cell* sebagian dimediasi oleh faktor terlarut. BM-MSC juga mempunyai kemampuan untuk masuk sirkulasi menuju target sesuai dengan lingkungan mikronya, yang

selanjutnya akan memperbaiki kerusakan yang terjadi (McTaggart, 2007; Miguel, 2001; Rantam, 2009; Zubko, 2009).

6.3.2 Angiogenesis

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru. Proses angiogenesis diinduksi oleh beberapa faktor pertumbuhan dan senyawa kimia lain seperti: FGF, VEGF, TGF- β , angiogenin, angiotropin dan angiopoetin. Pembuluh darah baru dalam proses penyembuhan luka diperlukan untuk suplai oksigen, komunikasi seluler dengan pembuluh darah utama dan transport nutrisi atau zat metabolisme. Pertumbuhan sel baru pada proses regenerasi memerlukan energi dalam jumlah besar untuk proses pembelahan sel (Werner *and* Grose, 2003).

Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan nyata dalam jumlah pembuluh darah pada hari ke 14 pada area penyembuhan. Kelompok kontrol menunjukkan jumlah yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan terapi *allogenic* BM-MSC. Secara fisiologis angiogenesis diatur secara baik dan diaktivasi pada periode yang singkat yang selanjutnya secara penuh akan dihambat (Schafer *and* Werner 2008; Davies 2012). Level makrofag pada kelompok kontrol yang tinggi dalam fase regenerasi berbanding lurus dengan angiogenesis. Sebagaimana diketahui bahwa makrofag mampu menstimuli secara langsung faktor pertumbuhan FGF dan VEGF juga beberapa sitokin proinflamasi.

Pemberian terapi *allogenic* BM-MSc menunjukkan jumlah angiogenesis yang lebih sedikit pada hari ke 14. Secara fisiologis angiogenesis hanya terjadi singkat antara beberapa jam hingga hari, yang selanjutnya harus dihambat (Davies, 2012). BM-MSc kemungkinan tidak berperan secara langsung dalam menurunkan angiogenesis pada fase remodeling. Sifat hipoinmunogenik BM-MSc terhadap makrofag menghambat pembentukan FGF dan VEGF yang diketahui sebagai pendorong terjadinya angiogenesis. Makrofag juga memproduksi TGF- β yang berperan dalam angiogenesis. (Bates and Harper, 2002).

Penghambatan respon peradangan yang berlebih yang melibatkan makrofag dan netrofil menyebabkan fase inflamasi tidak diperpanjang. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan angiogenesis sudah berkurang di hari ke 14. Angiogenesis diduga terjadi lebih cepat sehingga respon vaskuler dan seluler berlangsung lebih cepat. *Mesenchymal stem cell* mengungkapkan sejumlah faktor proangiogenik dan protein yang memodulasi migrasi sel endotel yang memungkinkan terjadinya *tissue repair* atau perbaikan jaringan pada jaringan yang mengalami kerusakan. *Mesenchymal stem cell* menyebabkan proliferasi sel endogen, menstimulasi angiogenesis, menghambat respon inflamasi dan respon imun juga mengurangi apoptosis lebih lanjut. *Mesenchymal stem cell* juga mampu menstimulasi *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*, *Human Growth Factor (HGF)*, *Granulocyte-Colony Stimulate Factor (G-CSF)*, yang berperan dalam proses penyembuhan cedera (Martin, 2005).

6.3.3 Mioblas

Jaringan otot kerangka secara normal mempunyai kemampuan terbatas dalam merespon cedera. Dalam kenyataannya regenerasi otot selalu diikuti jaringan adaptif tergantung kondisi fisiologis dan patologis. Otot kerangka termasuk dalam *undividing tissue regeneration* yaitu jaringan yang sulit mengalami regenerasi. Dalam proses penyembuhan jaringan otot kerangka akan selalu diikuti formasi jaringan ikat, hal ini menyebabkan fungsi otot tidak dapat kembali seperti semula (Gurtner *et al*, 2008). Pemberian terapi berbasis stem cell diharapkan mampu mengatasi masalah tersebut. Telah diketahui bahwa *mesenchymal stem cell* merupakan sel bakal multipotensi yang dalam keadaan tertentu dapat berdiferensiasi salah satunya menjadi sel otot (Caplan, 2009).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi *allogenic* BM-MSC memberikan perbedaan yang nyata terhadap jumlah sel myoblas pada hari ke-14 bila dibandingkan kontrol tanpa terapi. Mioblas merupakan sel otot yang masih muda dengan morfologi sel masih bulat dengan inti dan anak inti yang masih terlihat. Waktu 14 hari belum cukup menyebabkan sel mioblas menjadi dewasa membentuk miosit dan struktur miofiber yang sempurna. Meskipun jumlah mioblas banyak tetapi susunannya masih tidak beraturan. Pada kelompok kontrol jumlah mioblas lebih sedikit, hal ini dimungkinkan karena proses regenerasi hanya dari *quiescent* sel satelit yang proliferasinya lambat. Dalam pengamatan preparat histopatologi terlihat sel myoblas saling tumpang tindih dengan pembentukan jaringan ikat seperti kolagen dan fibroblas.

Mesenchymal stem cell mempunyai kemampuan untuk menyesuaikan diri dengan keadaan atau lingkungan yang baru. Bila terjadi suatu luka, *mesenchymal stem cell* akan meninggalkan *tissue niche*, masuk kedalam sirkulasi menuju target daerah luka tersebut (*homing*), selanjutnya *mesenchymal stem cell* akan berdiferensiasi menjadi target sel yang mengalami kerusakan setelah berada di lingkungan mikro yang sesuai (Minguel *et al.*, 2001; Gregory dan Prockop, 2007; Rantam dkk., 2009; Prasana *et al.*, 2010). Selain kemampuan proliferasi dan diferensiasi menjadi sel otot, *mesenchymal stem cell* juga berperan dalam aktivasi sel satelit yang merupakan *original stem cell* pada jaringan otot. Menurut Newman *et al.* 2009, *Mesenchymal Stem Cell* mampu mengaktifkan faktor endogen yang penting dalam *signaling* diferensiasi *stem cell* lokal jaringan.

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

Terapi *allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-*MSC*) efektif terhadap penyembuhan otot kerangka pasca cedera pada kelinci *White New-Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bagaimanakan proses diferensiasi BM-*MSC* pada jaringan yang mengalami cedera dengan penandaan permukaan sel, sehingga diketahui sel yang tumbuh merupakan hasil diferensiasi *MSC* atau original sel jaringan.
2. Pemeriksaan histopatologi pada model terapi cedera otot menggunakan BM-*MSC* hendaknya dilakukan pada setiap fase penyembuhan, sehingga dapat diketahui pengaruh dan tidaknya pada tiap tahap penyembuhan

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Angione, Alison R., Chunhui Jiang, Dongning Pan, Yong-Xu Wang and Shihuan Kuang. 2011. PPAR δ Regulates Satellite Cell Proliferation And Skeletal Muscle Regeneration. *Skeletal muscle journal*. 01-13
- Ambrosio, Yong Li and Arvydas Usas. 2007. *Orthopedic Biology and Medicine: Musculoskeletal Tissue Regeneration. Biological Materials and Methods*. Humana Press, Totowa, New Jersey. 459-463.
- Baratawidjaja. 2001. *Imunologi Dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*. UI Press. *Inflamasi*. 10; 140-154.
- Barry, FP. and Murphy M. 2004. Mesenchymal Stem Cells; Clinical Application and Biological characterization. *J.biocel*. 36.568-584.
- Bates, D. O. and S. J. Harper. 2002. "Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors." *Vascul Pharmacol* 39(4-5): 225-37.
- Batten, P., N.A. Rosenthal and M.H. Yacoub. 2007. Immune Response to Stem Cell and Strategies to Induce Tolerance. *J. Phil Trans R.Soc.B*. 362.1323-1356. doi:10.1098/rstb.2120.
- Bijanti, R. 2002. *Diktat: Bahan Ajar Patologi Klinik Veteriner. Penerbit Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya*. 50-53.
- Bongso, A. And A.H. Lee., 2005. *Stem Cell from Bench to Bedside*. National University of Singapore.
- Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G et al. 2005. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*;366:1719 –1724.
- Caplan , A.,I., 2009. Mesenchymal stem cell-cell based therapy in orthophedic. *Tissue engineering*, 1198-1199
- Chamberlain, G., Fox, J ., Ashton, B ., Middleton, J. 2007. Concise Review : Mesenchymal Stem Cell : Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *SC Tissue Cell*;25: 2739-2749.
- Chen, FH., Tuan, RS. 2008. Mesenchymal Stem Cell In Arthritic Diseases. Immunoregulatory Properties. *J stem cell tissue eng*. 234-36

- Chidgey, A.P., D.Layton., A. Trounson and R.L. Boyd. 2008. Tolerance Strategies for Stem Cell Base Therapy. *J.Natur.* vol.453. Doi:10.1038/natur07041.
- Croisier JL. 2004. Factors associated with recurrent hamstring injuries. [Review] [85 refs]. *Sports Medicine* 34 (10):681–95.
- Davies, J .2012. Tissue Regeneration – From Basic Biology to Clinical Application. InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. 93-97
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, FC., Krause, DS., Deans, RJ., Keating, A., Prockop, DJ., and Horwitz, EM. 2006. Minimal Criteria For Defining Multipotent Mesenchymal Stem Cell. The International Society For Cellular Therapy Position Statement. 316-317.
- Falanga V. 2005. Wound Healing And Its Impairment In The Diabetic Foot. *Lancet*;366:1736 –1743
- Farida, R. 2003. Reaksi Radang, *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. Edisi khusus 10 Oktober 2003. 468-472
- Freshney, R.I., G.N. Stacey and J.M. Auerbach. 2007. Cultur of human stem cells. John Willey & Sons, Inc. 237-39.
- Gregory, C.A. and D.J. Prockap. 2007. Fundamental of Culture and Characterization of Mesenchymal Stem/Progenitor Cell (MSCs) from Bone Marrow Stroma. *Cultur of Human Stem Cell*. Willey Interscient New Jersey.
- Guyton, and Hall. 2005. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.*, EGC : Jakarta.
- Gurtner GC et al. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314,
- Harvey, C. E. Newton, C. D. and Schwartz, A. 1990. *Small Animal Surgery*. J. B. Lippincott Company. Philadelphia. 65-113.
- Edenberg-Magnusson B, Ernberg M, Alstergren P, Kopp S. 2001. Pain mediation by prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the human masseter muscle. *Acta Odontologica Scandinavica* 59 (6):348–55.
- Horikawa M, Higashiyama S, Nomura S, Kitamura Y, Ishikawa M, Taniguchi N. 1999. Upregulation of endogenous heparin-binding EGF-like growth factor and its role as a survival factor in skeletal myotubes. *FEBS Letters* 459 (1):100–4.

- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E., & Brenner, M. K. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*, 5, 309–313.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M. 1991. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 23(7):801–10.
- Jusuf, A.A., 2008. Potensi Sel Punca (Stem Cell) untuk Memperbaiki Cacat Lahir Dimasa Depan. National Seminar and Workshop: Reducing Birth Defect, Meeting the challenge in Developing Countries. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Day CS, Bosch P, Buranapanitkit B, Moreland MS, Fu FH, Watkins SC, Huard J. 1998. Biologic intervention in muscle healing and regeneration. *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 6: 95-102.
- Kode, JA., Mukherjee, S., Joglekar, VM, and Hardikar, AA. 2009. Review Mesenchymal stem cell : immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11;4:377-391.
- Lawler, Ahmed, Hume. 1992. Buku Pintar Patologi Untuk Kedokteran Gigi, Alih Bahasa : Agus Djaya. ECG. Jakarta.:5-7.
- Lehto M, Duance VC, Restall D. 1985. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *Journal of Bone & Joint Surgery - British Volume* 67 (5):820–8.
- Levesque, JP., Hendy, J., Takamatsu, Y., et al. 2003. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during *hematopoietic stem cell* mobilization induced by GCSF or chyclophospamide. *J Clin Invest*; 111:187-196.
- Li Y, Chen J, Zhang CL et al. 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*;49:407–417.
- Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan YS, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J. 2004. Transforming growth factor-beta 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle - A key event in muscle fibrogenesis. *American Journal of Pathology* 164: 1007-1019.

- Martin, P. and S. J. Leibovich. 2005. "Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly." *Trends Cell Biol* 15(11): 599-607.
- Marzoeki, 1993. Ilmu Bedah Luka dan Perawatannya. Penerbit Airlangga Pres. Surabaya. 1-6.
- Mctaggart, S., Atkinson, K., 2007. *Mesenchymal stem cell* : Immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology*. 12(1):44-52.
- Mense S. 1981 Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5 hydroxytryptamine and prostaglandin E2. *Brain Research* 225 (1):95-105.
- Miguel,JJ., Erices, A., Conget,P, 2001. *Mesenchymal stem cell*. *Exp Biol Med*.226(6):507-20.
- Miyagawa J, Higashiyama S, Kawata S, Inui Y, Tamura S, Yamamoto K, Nishida M, Nakamura T, Yamashita S, Matsuzawa Y. 1995. Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation* 95 (1):404-11.
- Morrisey, J., Hruska, K., Guo, G., Wang, S., Chen, Q. 2002. Bone morphogenic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return function. *J Am Soc Nephrol*.13:S14-21.
- Murphy, J. M., Heinegard, R., McIntosh, A., Sterchi, D., & Barry, F. P. 2002. Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biology*, 18, 487-497.
- Newman, Robert E. , Yoo D, Michelle A. LeRoux and Alla Danilkovitch-Miagkova .2009. Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8, 110-123
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., & Anversa, P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701-705.
- Ozturk, S.S. and W.S. Hu. 2006. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-base Therapies. CRC Press. Taylor & Francis Group. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300. Boca Raton, FL 33487-2742.
- Pavletic, M. M. 2002. Veterinary Emergency and Critical Care Medicine. Editor.RobertJ. Murtaugh and Paul M. Kaplan. Mosby Year book. Toronto, New York.

- Peacock, E.E. and W. Van Winkle, 1976. *Wound Repair* 2nd Edition. W. B. Saunders. Philadelphia. 63-77.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A et al. 2002. G-CSF induces *stem cell* mobilization by decreasing *bone marrow* SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. immunol*;3:687-694.
- Petersen, B.E.; Bowen, W.C.; Patrene, K.D.; Mars, W.M.; Sullivan, A.K.; Murase, N.; Boggs, S.S.; Greenberger, J.S.; Goff, J.P. 2009. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 284, 1168-1170.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143–147.
- Prasanna, S.J., D. Gopalakrishnan., S.R. Shankar and A.B.Vasandan. 2010. Pro Inflammatory Cytokines, IFN α and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. PLoS ONE 5(2): e9016. doi:10.1371/journal.pone.0009016.
- Price, S. A., dan L. M. Wilson. 2006. Patofisiologi. Edisi ketiga. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta.
- Purwatiningsih, W. 2012. Analisis Imunoreaktivitas Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Terhadap Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Kelinci (*White New Zealand*) Secara In Vitro. Kumpulan tesis Fkh UA.
- Rantam, FA., Ferdiansyah, Nasrorudin, Purwati, 2009. Stem cell exploration: Methods of Isolation And Culture 1st ed. Surabaya. Airlangga University press:1-9.
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. 1995. *Laboratory Investigation* 72 (3):341–7.
- Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A, Benyamin Y. 2004. m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Experimental Cell Research* 298 (1):48–57.
- Schafer, M. and S. Werner (2008). "Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(8): 628-38.
- Schroeder M: 2007. Asymmetric cell division in normal and malignant hematopoietic precursor cells. *Cell Stem Cell* 1:479,.

- Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR.1985. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle & Nerve* 8 (3):217–22.
- Setiawan, B. 2006. Aplikasi Terapeutik Stem Cell Embrionik pada Berbagai Penyakit Degeneratif. *Cermin Dunia Kedokteran*. No.153.
- Sjamsuhidajat, R., Jong, WD. 2003. Buku Ajar Ilmu Bedah. EGC : Jakarta.
- Slatter, D. H. 1985. *Textbook of Animal Surgery*. W. B. Saunders Company. Philadelphia : 37-43.
- Stojanoski, z., B. Georgievski., H. Pejkov., A. Pivkova., L. Cevreska., S.S. Genadieva., V. Milenkov., R. Dukovski and V. Kotevski. 2008. Stem Cell Transplantation – New Treatment Aproaches. *Sec. Biol. Med. Sci. Masa.XXIX.2*. p.71-84.
- Sudiono, Kurniadhi, Hendrawan. 1995. *Ilmu Patologi*, EGC. Jakarta.:2-6
- Suroto, H. 2011. Efikasi Penggunaan Komposit Freeze Dried Tendon Allograft san Sel Punca Mesensimal dalam Rekontruksi Defek Tendon Fleksor. Universitas Airlangga. Hal.22
- Thomson, R. G., 1984. *General Veterinary Pathology*. 2nd Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia-London-Toronto-Mexico-Sydney-Tokyo. 267-270.
- Toubai, T., S. Paczesny., Y. Shono., J. Tanaka., K.P. Lowle., C.T. Malter., M. Kasai. and M. Imamuro. 2009. Mesenchymal stem cell for Treatment and Prevention of Graft-versus-Host Disease After Allogenic Haematopoietic Cell Transplantation. *Curent Stem Cell research and Therapy*. Vol.4, No.4.
- Troeger, A., R. Miesel., T. Morits and D. Dillo. 2005. Immunotherapy in Allogenic Haematopoietic Stem Cell Transplantation – Not Just in Case for Effector Cells. *Bone Marrow transplantation*. 35. S59-S64.
- Tero A. H. Järvinen, Teppo L. N. Järvinen, Minna Kääriäinen, Hannu Kalimo and Markku Järvinen. 2005. Muscle Injury. *Am J Sports Med* .33: 745.
- Von Iüttichau ,I., Notohamiprodjo, M., Wechselberger, A *et.al*. 2005. Human adult. *Stem Cell Dev*.:14;329-336.
- Werner, S. and R. Grose .2003. "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." *Physiol Rev* 83(3): 835-70.

- Yaojiong Wu, Liwen Chen, Paul G. Scott, Edward E. Tredget. 2007. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells Express* July 5. 25:2648–2659
- Zubko, R., Frishman, W. 2009. Stem Cell Therapy For The Kidney. *Am Jour Ther.* 16:247-56.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

Pemeriksaan Histopatologi



Laboratorium Patologi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
 Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785,
 Fax (031) 5993015; email : fkh@unair.ac.id

HASIL PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI

Nama Pemilik : Agung Prasetyo Legowo drh.
 Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
 Alamat : Rungkut Asri Tengah VII/53, Surabaya
 Telepon : 085733243637
 Sediaan : Otot lurik
 Pewarnaan : Histopatologi HE
 Waku Pemeriksaan : 11 Januari 2013
 Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Perubahan yang diamati dan Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk menghitung jumlah sel-sel myoblast, sel radang serta jumlah kapiler pada jaringan otot lurik kerangka pasca trauma. Data yang didapat merupakan data kuantitatif yang diperoleh dengan cara menghitung jumlah sel-sel myoblast, sel radang serta jumlah kapiler yang ditemukan pada area penyembuhan (*healing center*) dalam lima lapangan pandang yang berbeda pada pembesaran 1000x.

Surabaya, 11 Januari 2013

Pemeriksa,

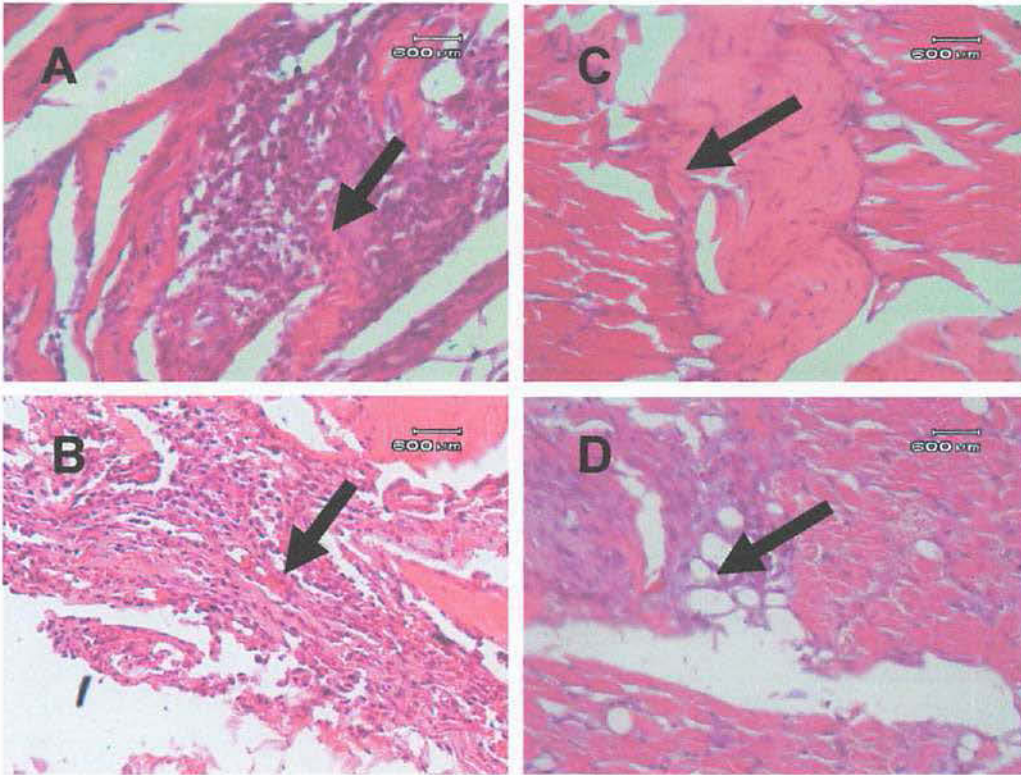
(Djoko Legowo, Mkes., drh)
 NIP. 1967 1214 199603 1 0014

KODE PREPARAT	LAPANGAN PANDANG	JUMLAH SEL MYOBLAST	JUMLAH SEL RADANG	ANGIOGENESIS	KETERANGAN
1 K	1	16	12	13	-PMN -MAKROFAG
	2	11	9	4	
	3	9	6	5	
	4	0	11	3	
	5	0	1	4	
TOTAL		<u>36</u>	<u>39</u>	<u>29</u>	
2 K	1	7	12	9	-MAKROFAG
	2	9	3	5	
	3	9	7	3	
	4	0	8	4	
	5	0	1	7	
TOTAL		<u>25</u>	<u>31</u>	<u>28</u>	
3 K	1	14	16	15	
	2	6	7	7	
	3	5	4	3	
	4	6	1	2	
	5	0	1	6	
TOTAL		<u>31</u>	<u>29</u>	<u>33</u>	
4 K	1	8	14	13	
	2	12	11	9	
	3	7	2	6	
	4	5	2	3	
	5	0	7	4	
TOTAL		<u>32</u>	<u>36</u>	<u>35</u>	
5 K	1	19	19	10	
	2	6	6	8	
	3	5	7	11	
	4	4	2	4	
	5	5	5	5	
TOTAL		<u>39</u>	<u>39</u>	<u>38</u>	

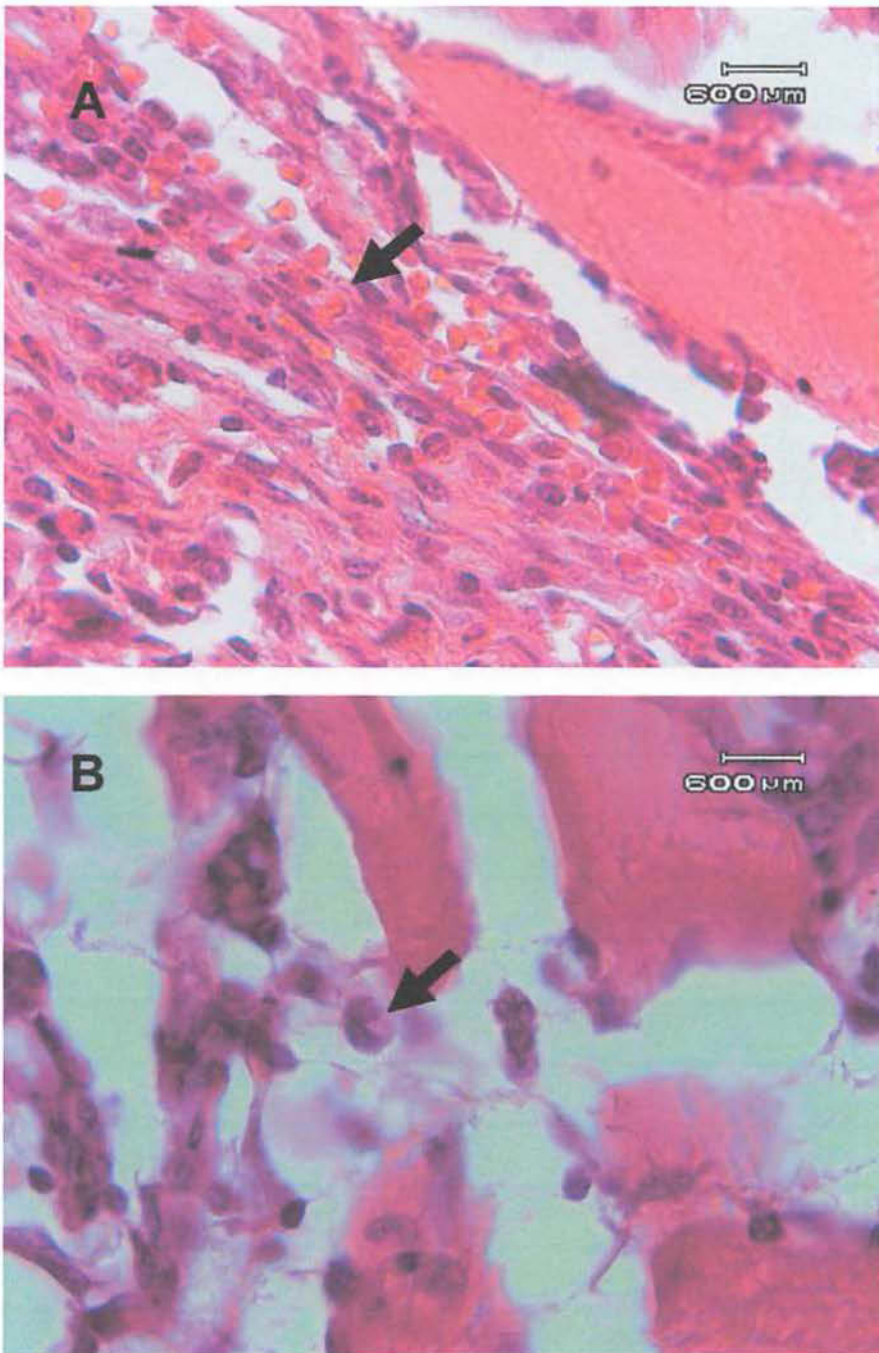
KODE PREPARAT	LAPANGAN PANDANG	JUMLAH SEL MYOBLAST	JUMLAH SEL RADANG	ANGIOGENESIS	KETERANGAN
6 K	1	13	5	12	
	2	6	8	9	
	3	8	7	7	
	4	9	9	5	
	5	0	2	4	
TOTAL		36	31	37	
7 K	1	11	11	9	
	2	7	8	8	
	3	9	6	9	
	4	6	9	6	
	5	7	1	2	
TOTAL		40	35	34	
8 K	1	21	9	11	
	2	11	9	10	
	3	8	7	9	
	4	16	2	5	
	5	7	2	4	
TOTAL		63	29	39	
9 K	1	16	11	12	
	2	10	17	7	
	3	8	9	8	
	4	9	7	3	
	5	0	3	5	
TOTAL		43	47	35	
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
TOTAL					

KODE PREPARAT	LAPANGAN PANDANG	JUMLAH SEL MYOBLAST	JUMLAH SEL RADANG	ANGIOGENESIS	KETERANGAN
1P	1	23	5	6	
	2	34	7	5	
	3	52	7	6	
	4	23	4	7	
	5	0	3	4	
TOTAL		<u>132</u>	<u>26</u>	<u>28</u>	
2 P	1	33	3	3	
	2	32	5	4	
	3	29	6	6	
	4	0	4	4	
	5	0	1	5	
TOTAL		<u>94</u>	<u>19</u>	<u>22</u>	
3 P	1	42	8	5	
	2	21	7	6	
	3	17	3	4	
	4	11	2	4	
	5	10	3	5	
TOTAL		<u>101</u>	<u>23</u>	<u>24</u>	
4 P	1	11	4	3	
	2	12	9	5	
	3	17	5	5	
	4	0	11	6	
	5	0	0	4	
TOTAL		<u>40</u>	<u>29</u>	<u>23</u>	
5 P	1	21	9	4	
	2	37	3	4	
	3	18	3	3	
	4	32	1	5	
	5	0	4	2	
TOTAL		<u>108</u>	<u>20</u>	<u>18</u>	

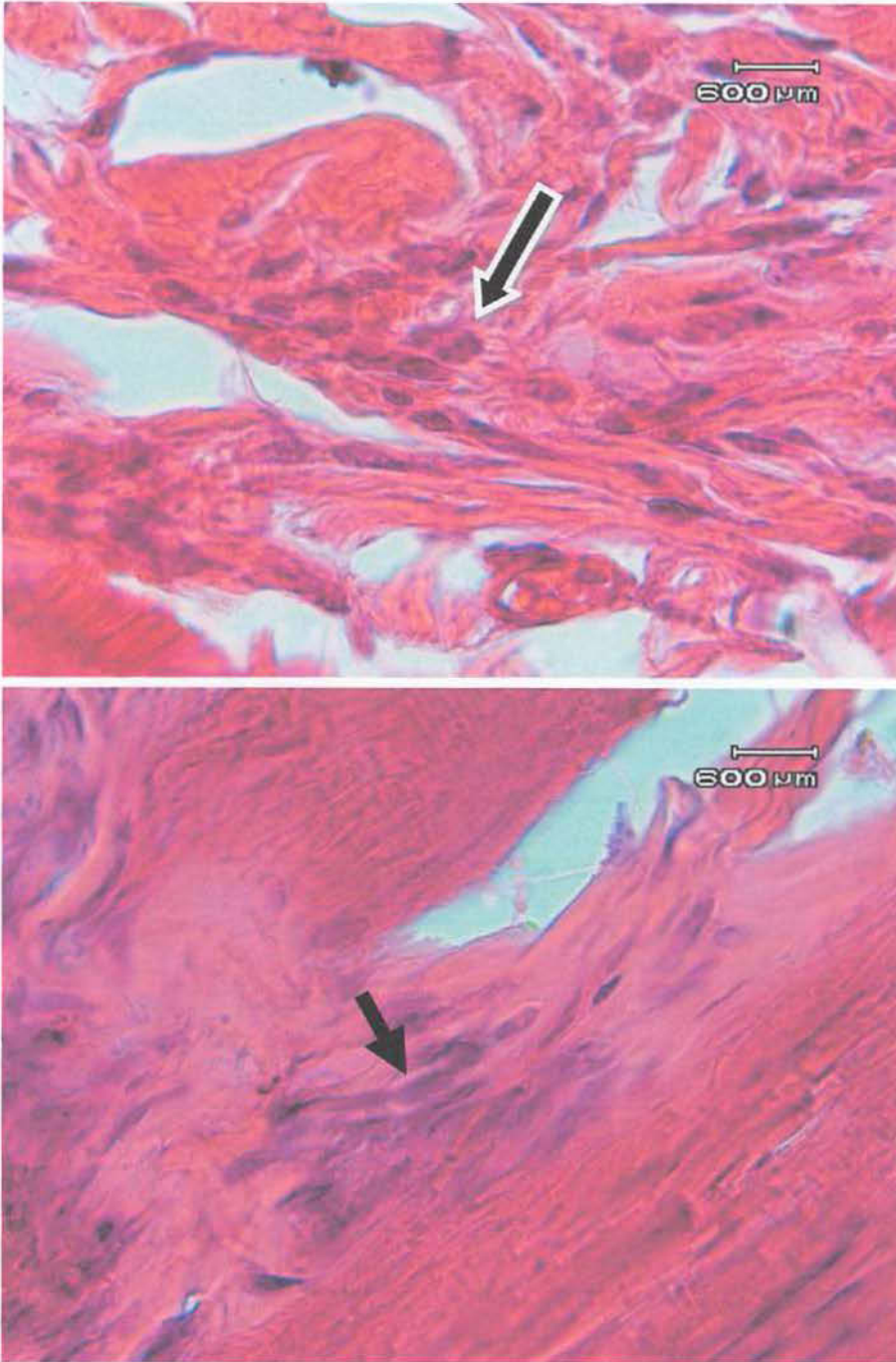
KODE PREPARAT	LAPANGAN PANDANG	JUMLAH SEL MYOBLAST	JUMLAH SEL RADANG	ANGIOGENESIS	KETERANGAN
6 P	1	27	12	6	
	2	42	9	7	
	3	29	5	7	
	4	34	0	5	
	5	0	0	2	
TOTAL		132	28	27	
7 P	1	17	9	5	
	2	42	5	5	
	3	12	4	5	
	4	0	4	4	
	5	0	2	2	
TOTAL		71	24	21	
8 P	1	21	7	6	
	2	34	6	5	
	3	19	5	5	
	4	11	2	4	
	5	0	2	3	
TOTAL		85	22	23	
9 P	1	43	6	3	
	2	19	4	3	
	3	15	3	4	
	4	11	3	6	
	5	0	1	6	
TOTAL		88	17	22	



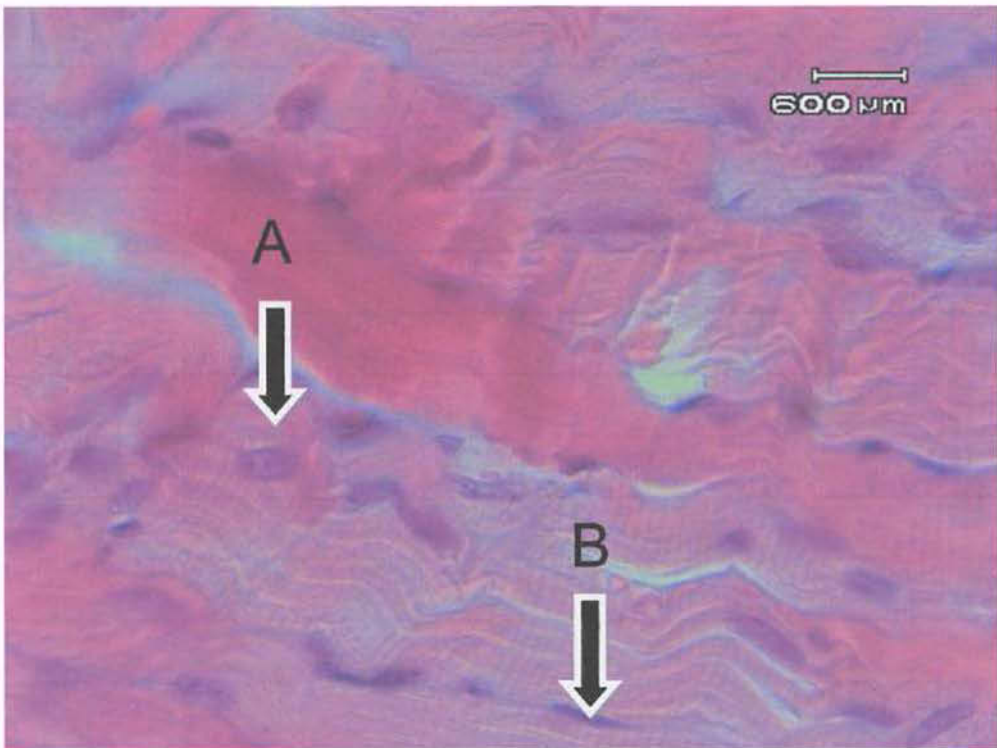
Gambar 1. Perbandingan gambaran histologis respon penyembuhan pada are *healing center* (panah) antara kelompok kontrol dan (A dan B) dengan kelompok perlakuan (C dan D). Proses penyembuhan pada kelompok Kontrol nampak lebih lambat, dimana area *healing center* masih didominasi oleh sel-sel myoblast muda yang ditandai dengan inti yang besar dan anak inti yang jelas, sel-sel radang dan pembuluh kapiler. Sedangkan pada kelompok yang mendapat perlakuan, sel-sel myoblast nampak lebih matang yang ditandai dengan inti sel yang lebih kecil serta anak inti yang tidak jelas, dan sel radang serta pembuluh kapiler yang jauh berkurang (pewarnaan HE; pembesaran 400x; OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel)



Gambar 2. Respon penyembuhan pada are *healing center* pada kelompok kontrol. Pada slide A, nampak sel-sel myoblast muda yang ditandai dengan inti yang besar dan anak inti yang jelas (panah) dan resolusi yang lambat, ditandai dengan dengan pembuluh kapiler yang masih dominan dan masih adanya sel-sel radang makrofag (slide B) peradangan (pewarnaan HE; pembesaran 400x; OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel)



Gambar 3. Slide A dan B Menunjukkan respon penyembuhan pada are *healing center* pada kelompok perlakuan. Nampak sel-sel myoblast yang lebih matang (panah) yang ditandai dengan inti yang mengecil dan anak inti tidak jelas (panah) dan resolusi nampak baik yang ditandai dengan menurunnya jumlah pembuluh kapiler dan sel radang (HE; pembesaran 400x; OlympusCX41; DP12 olympus micro digital camera 2 megapixel)



Gambar 4 perbandingan morfologi sel otot muda (myoblast) pada tengah daerah luka (panah A) sedangkan pada daerah yang lebih ke tepi (panah B) sel otot tampak lebih pipih dan lebih tua (Myosit)

EMPIRAN 2
alisis multivariate

mmarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
YOBLAS * PERLAKUAN	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%
ELRADANG * ERLAKUAN	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%
ANGIOGENESIS * ERLAKUAN	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%
WAKTUPENYEMBUHAN PERLAKUAN	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		MYOBLAS	SELRADANG	ANGIOGE NESIS	WAKTUPEN YEMBUHAN
ERLAKUAN KONTROL	1	36	39	29	12
	2	25	31	28	13
	3	31	29	33	14
	4	32	36	35	12
	5	39	39	38	14
	6	36	31	37	12
	7	40	35	34	13
	8	63	29	39	13
	9	43	47	35	11
	Total	N	9	9	9
PERLAKUAN	1	132	26	28	7
	2	94	19	22	7
	3	101	23	24	8
	4	40	29	23	8
	5	108	20	18	8
	6	132	26	27	7
	7	71	24	21	7
	8	85	22	23	6
	9	88	17	22	9
	Total	N	9	9	9
Total	N	18	18	18	18

a. Limited to first 100 cases.

General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
PERLAKUAN	1 KONTROL	9
	2 PERLAKUAN	9
	N	

Descriptive Statistics

	PERLAKUAN	Mean	Std. Deviation	N
YOBLAS	KONTROL	38,33	10,700	9
	PERLAKUAN	94,56	28,923	9
	Total	66,44	35,837	18
ELRADANG	KONTROL	35,11	5,925	9
	PERLAKUAN	22,89	3,822	9
	Total	29,00	7,934	18
NGIOGENESIS	KONTROL	34,22	3,768	9
	PERLAKUAN	23,11	3,018	9
	Total	28,67	6,607	18
IAKTUPENYEMBUHAN	KONTROL	12,67	1,000	9
	PERLAKUAN	7,44	,882	9
	Total	10,06	2,838	18

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,997	1175,406 ^a	4,000	13,000	,000
	Wilks' Lambda	,003	1175,406 ^a	4,000	13,000	,000
	Hotelling's Trace	361,663	1175,406 ^a	4,000	13,000	,000
	Roy's Largest Root	361,663	1175,406 ^a	4,000	13,000	,000
PERLAKUAN	Pillai's Trace	,956	71,174 ^a	4,000	13,000	,000
	Wilks' Lambda	,044	71,174 ^a	4,000	13,000	,000
	Hotelling's Trace	21,900	71,174 ^a	4,000	13,000	,000
	Roy's Largest Root	21,900	71,174 ^a	4,000	13,000	,000

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+PERLAKUAN

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	MYOBLAS	14224,222 ^a	1	14224,222	29,913	,000
	SELRADANG	672,222 ^b	1	672,222	27,039	,000
	ANGIOGENESIS	555,556 ^c	1	555,556	47,676	,000
	WAKTUPENYEMBUHAN	122,722 ^d	1	122,722	138,062	,000
Intercept	MYOBLAS	79467,556	1	79467,556	167,119	,000
	SELRADANG	15138,000	1	15138,000	608,903	,000
	ANGIOGENESIS	14792,000	1	14792,000	1269,397	,000
	WAKTUPENYEMBUHAN	1820,056	1	1820,056	2047,562	,000
ERLAKUAN	MYOBLAS	14224,222	1	14224,222	29,913	,000
	SELRADANG	672,222	1	672,222	27,039	,000
	ANGIOGENESIS	555,556	1	555,556	47,676	,000
	WAKTUPENYEMBUHAN	122,722	1	122,722	138,062	,000
Error	MYOBLAS	7608,222	16	475,514		
	SELRADANG	397,778	16	24,861		
	ANGIOGENESIS	186,444	16	11,653		
	WAKTUPENYEMBUHAN	14,222	16	,889		
Total	MYOBLAS	101300,000	18			
	SELRADANG	16208,000	18			
	ANGIOGENESIS	15534,000	18			
	WAKTUPENYEMBUHAN	1957,000	18			
Corrected Total	MYOBLAS	21832,444	17			
	SELRADANG	1070,000	17			
	ANGIOGENESIS	742,000	17			
	WAKTUPENYEMBUHAN	136,944	17			

a. R Squared = ,652 (Adjusted R Squared = ,630)

b. R Squared = ,628 (Adjusted R Squared = ,605)

c. R Squared = ,749 (Adjusted R Squared = ,733)

d. R Squared = ,896 (Adjusted R Squared = ,890)

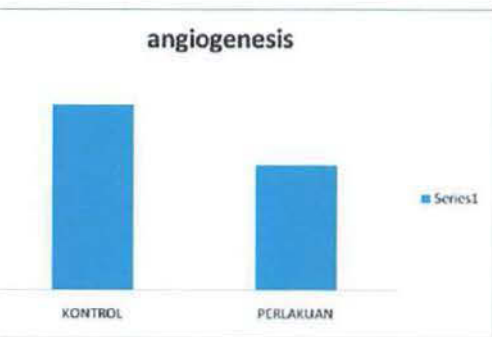
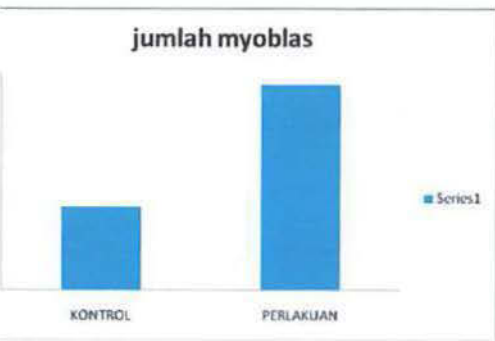
Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
MYOBLAS	66,444	5,140	55,549	77,340
SELRADANG	29,000	1,175	26,509	31,491
ANGIOGENESIS	28,667	,805	26,961	30,372
WAKTUPENYEMBUHAN	10,056	,222	9,584	10,527

2. PERLAKUAN

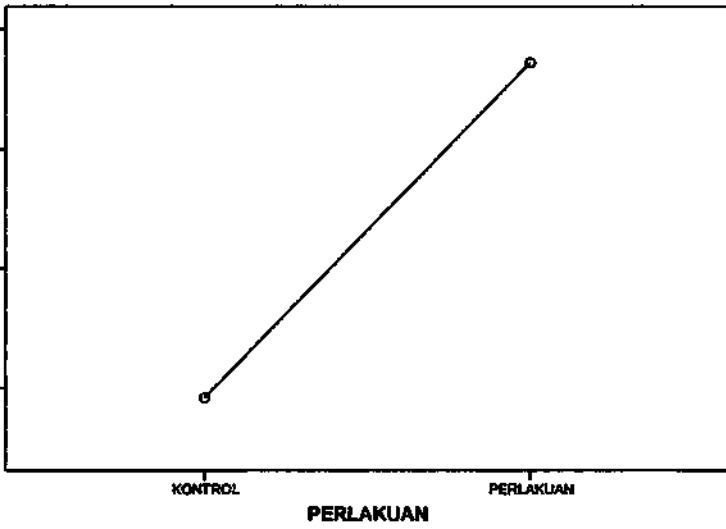
dependent Variable	PERLAKUAN	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
MYOBLAS	KONTROL	38,333	7,269	22,924	53,742
	PERLAKUAN	94,556	7,269	79,146	109,965
ELRADANG	KONTROL	35,111	1,662	31,588	38,634
	PERLAKUAN	22,889	1,662	19,366	26,412
ANGIOGENESIS	KONTROL	34,222	1,138	31,810	36,634
	PERLAKUAN	23,111	1,138	20,699	25,523
WAKTUPENYEMBUHAN	KONTROL	12,667	,314	12,000	13,333
	PERLAKUAN	7,444	,314	6,778	8,111



Profile Plots

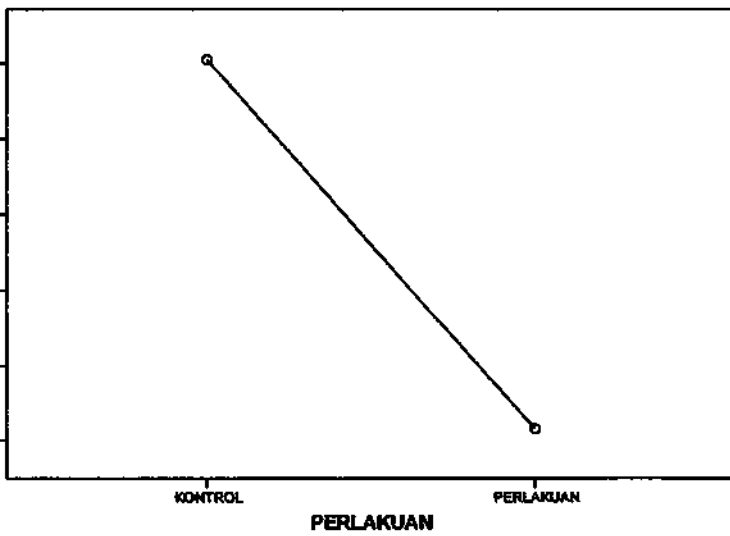
MYOBLAS

Estimated Marginal Means of MYOBLAS



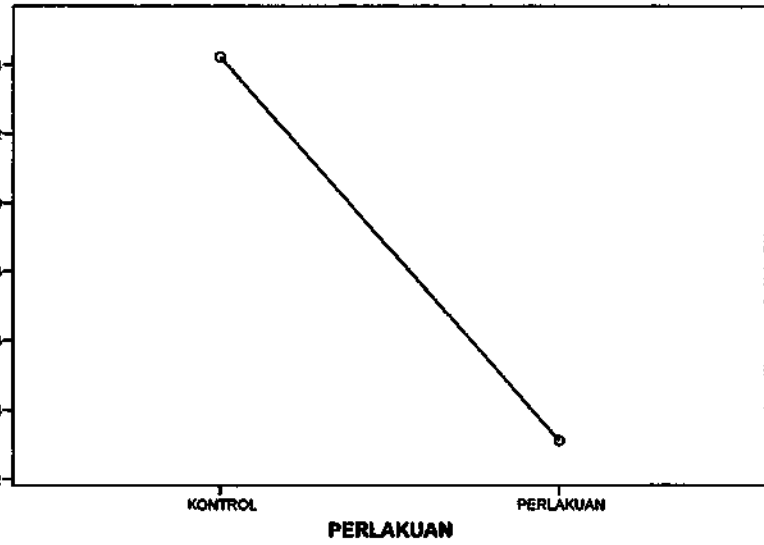
SELRADANG

Estimated Marginal Means of SELRADANG



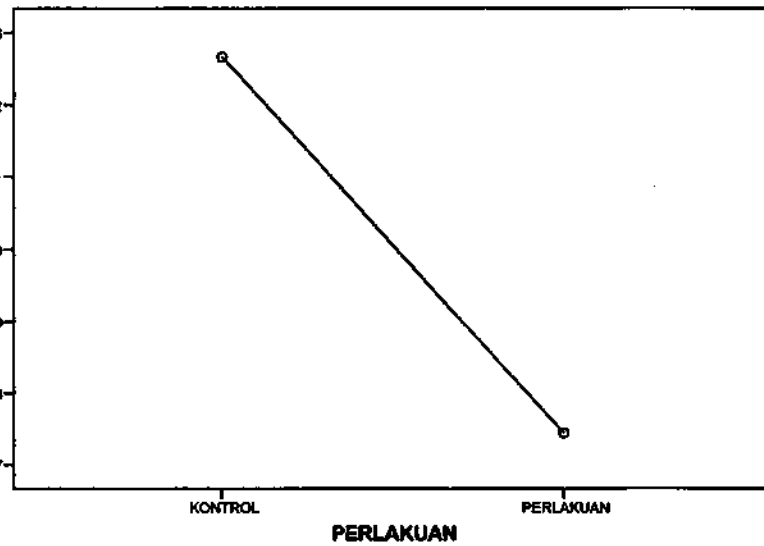
ANGIOGENESIS

Estimated Marginal Means of ANGIOGENESIS



WAKTUPENYEMBUHAN

Estimated Marginal Means of WAKTUPENYEMBUHAN



MPIRAN 3

tifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No : 125-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Efektifitas Allogenic Mesenchymal Stem Cell Sebagai Terapi Pada Trauma Muskular. Studi Eksperimental Pada kelinci Putih New Zealand (*Oryctolagus cuniculi*) Jantan

PENELITI UTAMA : Fachrizal Arfani Prawiragara

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 2 Mei 2011

Ketua

[Signature]
Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 132014464

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,

[Signature]
Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 130687305