

Jakarta, 15 Juli 2020

Nomor : 040-Perpus/238/FK-UNTAR/VII/2020
Lampiran : 1 hal.
Perihal : Tanda Terima Laporan Penelitian Dr.dr. Sui Fui Hendrawan, M. Biomed

Kepada Yth.

Dekan
Fakultas Kedokteran
UNTAR


TANDA TERIMA

Telah kami terima : 1 (satu) Karya Ilmiah / Penelitian

Judul : "EVALUASI IN-VITRO: MATRIKS PLLA 3 DIMENSI UNTUK APLIKASI PERBAIKAN HERNIA INSISIONAL"

Oleh: Dr. dr. Sui Fui Hendrawan, M. Biomed.

Hormat Saya,
Ka. UPT Tk. II Perpustakaan FK UNTAR


Ambar Pratiwi S. Hum.
NIK: 20406001

VALIDASI :

DEKAN




Dr. dr. Meilani Kumala, MS.,SpGK.(K)

Tembusan

1. Bagian Personalia
2. Dr.dr. Sui Fui Hendrawan, M. Biomed.

LAPORAN PENELITIAN



Judul Penelitian:

**EVALUASI *IN-VITRO*: MATRIKS PLLA 3 DIMENSI UNTUK
APLIKASI PERBAIKAN HERNIA INSISIONAL**

Oleh:

Dr. dr. Siufui Hendrawan, M.Biomed

dr. Shirly Gunawan, Sp.FK

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TARUMANAGARA
JAKARTA**

2020

HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PENELITIAN
Semester 1/Tahun 2020

1. Judul Penelitian : Evaluasi *in-vitro*: Matriks PLLA 3 Dimensi untuk Aplikasi Perbaikan Hernia Insisional
2. Ketua Peneliti :
 - a. Nama dan gelar : Dr. dr. Siufui Hendrawan, M.Biomed
 - b. NIDN/NIK : 0311047204/10402011
 - c. Jabatan/gol. : Lektor/3C
 - d. Program studi : Sarjana Kedokteran
 - e. Fakultas : Kedokteran
 - f. Bidang Keahlian : *Tissue engineering*
 - g. Alamat Kantor : Jl. Letjen S. Parman No.1, Universitas Tarumanagara, Fakultas Kedokteran, THCT Lab, Gedung J, Lt. Dasar
 - h. Nomor HP/Tlp : 08161970590, (021)56963254
3. Anggota Tim Penelitian
 - a. Jumlah anggota : Dosen 1 orang
 - b. Nama anggota I/Fak/Keahlian : dr. Shirly Gunawan, Sp.FK /Kedokteran/Specialis Farmakologi Klinik
 - c. Jumlah mahasiswa : -
 - d. Nama mahasiswa : -
4. Lokasi Kegiatan Penelitian : THCT Lab; PSSP-IPB, Bogor; Lab SEM FMIPA-ITB, Bandung.
5. Luaran yang dihasilkan : Artikel Ilmiah
6. Jangka Waktu Pelaksanaan : Januari- Juni
7. Biaya Total :
 - a. Biaya yang diajukan ke LPPM : Rp 19,062,500
 - b. Biaya yang disetujui LPPM : Rp

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran

Jakarta, 15 Juli 2020
Ketua Peneliti,

Dr. dr. Meilani Kumala, MS., Sp.GK
NIDN/NIK: 0326105805/10486005

Dr. dr. Siufui Hendrawan, M. Biomed
NIDN/NIK: 0311047204/10402011

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Jap Tji Beng, PhD
NIDN/NIK: 0323085501/10381047

RINGKASAN

Biomaterial memegang peranan penting dalam rekayasa jaringan. Matriks berpori 3 dimensi telah digunakan secara luas sebagai *template* untuk implantasi sel ke dalam tubuh. Kombinasi matriks-sel diharapkan akan terintegrasi ke dalam jaringan untuk memperbaiki jaringan yang rusak. Oleh karena itu penting dikembangkan matriks yang memiliki '*features*' yang ideal dipandang dari aspek keamanan dan fungsional. Keamanan dalam arti bersifat *biodegradable* dan biokompatibilitas, serta tidak menimbulkan reaksi negatif dari tubuh. Sedangkan, fungsional dalam arti dapat menopang perlekatan, viabilitas serta fungsi sel. Polimer sintetik seperti poly(L-lactic acid) (PLLA) dan poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) merupakan bahan yang sering digunakan dalam pembuatan matriks karena memiliki sifat *biodegradable* dan biokompatibilitas yang baik. Meskipun demikian, bahan tersebut tidak lepas dari sifat hidrofobik yang dapat menghambat pertumbuhan sel. Sehingga diperlukan modifikasi lebih lanjut terhadap permukaannya untuk menghilangkan sifat hidrofobik tersebut. Modifikasi dengan *collagen coating* telah terbukti meningkatkan *hydrophilicity* dari matriks sehingga memudahkan penanaman sel. Di sisi lain, penambahan *conditioned medium* asal *human umbilical cord-mesenchymal stem cell* (CM hUC-MSC) telah terbukti dapat berkontribusi dalam pembentukan matriks ekstraseluler. Tujuan studi ini adalah untuk mengetahui perbedaan struktur dari matriks yang telah dimodifikasi permukaannya dengan kolagen serta perannya dalam menunjang pertumbuhan sel untuk aplikasi perbaikan hernia insisional.

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN.....	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
BAB I	1
BAB II.....	4
BAB III.....	10
BAB IV.....	16
BAB V	24
DAFTAR PUSTAKA	25
SUSUNAN PERSONALIA PENELITI	28

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 <i>Fold Changes</i> dengan CCK-8	16
2 Kadar Kolagen Tipe 1 pada Tikus.....	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1	Skema interaksi sel-matriks-CM dalam system kultur 3 dimensi	7
2	Skema perspektif sel punca dalam proses penyembuhan luka serta sebagai <i>secretome</i>	8
3	Skema pembuatan matriks dengan metode <i>particulate leaching</i>	12
4	Uji Statistik dengan CCK-8	17
5	Uji Statistik Kadar Kolagen tipe I pada Tikus	20
6	Matriks PLLA dan fibroblast yang ditanamkan pada matriks PLLA	22

BAB I

PENDAHULUAN

I.I. LATAR BELAKANG

Teknik rekayasa jaringan menggunakan sel merupakan salah satu alternatif yang paling menjanjikan untuk memperbaiki fungsi jaringan yang rusak. Teknik yang mengkombinasikan sel dengan matriks berpori dan faktor pertumbuhan ini telah menunjukkan harapan sebagai metode untuk menciptakan jaringan baru yang dapat ditransplantasi untuk terapi penyakit. Teknik ini juga memiliki berbagai tantangan yang signifikan meliputi pembuatan matriks yang sesuai dan dapat mendukung pertumbuhan, proliferasi, hingga diferensiasi sel dan membantu pembentukan jaringan yang baru (1). Berbagai bahan polimer sintetik telah banyak digunakan dalam produksi matriks untuk transplantasi sel. Polimer *biodegradable* seperti poly(L-lactic acid) (PLLA) dan poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) merupakan bahan yang sering digunakan untuk membuat *scaffold* (matriks) dalam penggunaan pada rekayasa jaringan karena memiliki sifat *biodegradable* dan biokompatibilitas yang baik. Akan tetapi *hydrophobicity* dari bahan tersebut merupakan salah satu tantangan yang dapat membuat sel masuk ke dalam pori-pori dari matriks tersebut. Oleh karena itu dilakukan berbagai modifikasi permukaan dari matriks PLLA seperti dilapisi dengan kolagen, *plasma treatment*, yang dapat membuat sel dapat masuk dengan mudah ke dalam pori-pori matriks (1–3).

Salah satu komplikasi yang sering dijumpai pasca operasi bedah abdomen adalah hernia insisional. Hal ini disebabkan oleh kegagalan pada proses penyembuhan fascia dinding abdomen pasca bedah terutama pada pasien lansia. Hernia ini sering didiagnosis antara tiga tahun hingga 10 tahun pasca pembedahan (4). Insiden bervariasi antara 2% hingga 50% dari seluruh pasien yang menjalani laparotomi. Estimasi insiden hernia pada lansia adalah 13 per 1000 orang (5–7). Insiden hernia insisional yang lebih tinggi pada lansia dapat dianggap sebagai proses multifaktorial. Perbaikan hernia insisional yang besar pada umumnya sulit karena disebabkan oleh kombinasi antara faktor lemahnya dinding abdomen serta tekanan intra-abdominal yang tinggi, sehingga kemungkinan untuk rekuren menjadi lebih tinggi. Tingkat rekurensi setelah perbaikan hernia insisional ventral dilaporkan mencapai lebih dari 60% (6,8). Perbaikan dengan

aplikasi *onlay mesh* adalah metode standar untuk penanganan hernia insisional. Pemakaian *mesh* untuk meningkatkan kekuatan dinding perut telah menurunkan tingkat rekurensi hernia. Akan tetapi, perbaikan dengan *mesh* pada laparotomi ini masih menghasilkan tingkat komplikasi yang signifikan yaitu sebesar 14-50%, terutama penyembuhan luka yang tidak sempurna (4,5).

Matriks dengan sel fibroblas ini diajukan untuk aplikasi perbaikan hernia insisional menggantikan *mesh*. Matriks dengan lapisan kolagen akan menyerupai matriks ekstraseluler, yang diharapkan akan menciptakan lingkungan yang alami untuk pertumbuhan fibroblas (9,10). Fibroblas yang ditanam pada matriks PLLA 3D merupakan sumber utama untuk sintesis kolagen yang dapat memberikan penyembuhan luka lebih baik dan jaringan ikat yang kuat. Di samping itu sel punca mesenkimal telah menunjukkan potensi terapeutik dalam regenerasi jaringan. Bukti terbaru menyatakan bahwa efek menguntungkan itu sebagian besar dimediasi oleh aksi parakrin yang disintesis oleh *secretome* atau *conditioned medium* (CM). CM yang ditambahkan dalam media kultur fibroblas juga dievaluasi pengaruhnya dalam stimulasi pertumbuhan fibroblas. Matriks ini perlu dievaluasi untuk menilai struktur dan fungsi matriks PLLA secara *in-vitro*. Selain itu dievaluasi struktur dan peran matriks juga dinilai efek penambahan CM terhadap pertumbuhan fibroblas secara *in-vitro*.

I.I. RUMUSAN MASALAH

I.II.I Pernyataan masalah

Adakah perbedaan struktur dari matriks PLLA yang belum dimodifikasi permukaannya dengan yang sudah dimodifikasi permukaannya

I.II.II Pertanyaan masalah

1. Apakah terdapat perbedaan struktur antara matriks PLLA yang tidak dilapisi kolagen dengan yang dilapisi kolagen?
2. Apakah peran matriks PLLA terhadap pertumbuhan, perlekatan (*adhesion rate*), serta viabilitas sel fibroblas?
3. Apakah pengaruh dari penambahan CM terhadap pertumbuhan sel fibroblas?

I.II. TUJUAN PENELITIAN

I.III.I Tujuan Umum

Diketuainya struktur matriks dan perannya terhadap sel

I.III.II Tujuan Khusus

1. Diketuainya perbedaan struktur matriks PLLA yang tidak dilapisi kolagen dengan yang dilapisi kolagen
2. Diketuainya peran matriks PLLA terhadap pertumbuhan, perlekatan (*adhesion rate*), serta viabilitas sel fibroblas
3. Diketuainya pengaruh penambahan CM terhadap pertumbuhan sel fibroblas

I.III. MANFAAT PENELITIAN

Manfaatnya bagi masyarakat:

1. Masyarakat mendapatkan pengetahuan dan informasi mengenai salah satu teknik rekayasa jaringan yaitu penggunaan matriks
2. Menjadi dasar bagi peneliti selanjutnya untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai teknik rekayasa jaringan menggunakan matriks

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.I. Matriks dalam Teknik Rekayasa Jaringan

Rekayasa jaringan saat ini merupakan salah satu teknik yang sedang berkembang di dunia kedokteran. Rekayasa jaringan merupakan kombinasi dari sel, teknologi, dan biomaterial, untuk memperbaiki atau mengganti jaringan atau organ yang rusak. Salah satu aplikasi dari rekayasa jaringan yang dapat menjadi alternatif dari penggunaan *mesh* adalah matriks polimer 3D. Berbagai cara telah digunakan untuk membuat matriks polimer *biodegradable* berpori sebagai *cell scaffold*, seperti *particulate leaching*, *gas foaming*, serta *3D printing*. Metode tersebut digunakan untuk membuat matriks yang seperti spons.

Poly(L-lactic acid) (PLLA) dan poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) merupakan dua polimer *biodegradable* utama yang sering digunakan untuk membuat matriks dalam teknik rekayasa jaringan (1,2). Meskipun bahan-bahan tersebut memiliki biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang baik serta sifat mekanik yang baik, akan tetapi bahan tersebut memiliki sifat hidrofobik yang tinggi. Sifat hidrofobik tersebut akan menghambat penetrasi sel ke dalam pori-pori matriks. Selain itu, suplai nutrisi serta pertumbuhan sel ke dalam matriks juga sangat dipengaruhi oleh sifat hidrofobik ini. Maka modifikasi permukaan matriks sangat penting dilakukan untuk aplikasi penanaman sel pada matriks. Beberapa upaya telah dilakukan untuk memodifikasi permukaan dari matriks untuk menghilangkan sifat hidrofobik dari bahan PLLA seperti pelapisan kolagen dan *plasma treatment*. Hal tersebut dilakukan untuk meningkatkan sifat biologis dan mekanis dari matriks serta biokompatibilitas dari bahan tersebut (1,3,11).

II.II. Perbaikan Hernia Insisional Menggunakan Mesh

Insiden terjadinya hernia insisional masih tinggi, meskipun perbaikan teknik dan material penjahitan yang digunakan untuk menutup dinding abdominal telah dilakukan. Tingkat kekambuhan yang tinggi tidak hanya menekankan pentingnya

penelitian untuk pengembangan material *mesh* yang lebih baik, tetapi juga mendorong penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme penyembuhan jaringan ikat dan pembentukan jaringan parut luka. Perbaikan menggunakan *mesh* untuk menutup kerusakan pada hernia, telah hadir dengan hasil yang lebih baik namun masih memiliki tingkat kekambuhan yang tinggi karena kemampuan meregang yang rendah dari kompleks *mesh*/jaringan berbeda secara kontras dengan dinding perut yang elastis. Jenis *mesh*, jumlah *mesh* jahitan trans-fascia, dan faktor spesifik lainnya termasuk dalam faktor penting terkait dengan perbaikan hernia insisional. Salah satu perhatian utama yang dihadapi semua ahli bedah adalah risiko dari infeksi luka dan penggunaan *mesh*. Dalam kasus hernia insisional, hilangnya signal mekanis dilaporkan merusak fungsi biologi dari sel fibroblas dan mengakibatkan abnormalitas dari kolagen yang ditemukan sebagai penyebab dari kambuhnya kasus ini. Hal ini membuat masalah seperti luka kronis yang pada akhirnya membutuhkan pengangkatan dari *mesh*, membuat kolonisasi kerusakan menjadi sulit diperbaiki. Respon tubuh inang terhadap *mesh* dapat meliputi adhesi dan erosi usus (4,12).

Kepentingan utama dari konstruksi *mesh* biologis adalah untuk mengatasi masalah dari *mesh* sintetik dan memberikan dukungan mekanis, meremajakan kembali jaringan di sepanjang *mesh* dalam rangka untuk menciptakan jaringan kolagen yang sangat terorganisasi, dengan demikian dapat memungkinkan akses vaskular baru ke situs hernia. Konsep dasar dibalik pengembangan jenis bahan ini adalah, untuk memberikan lingkungan yang tepat bagi populasi sel alamiah, membuat jaringan ikat baru yang akhirnya akan menggantikan jaringan yang rusak pada situs hernia (12). *Mesh* biologis mampu mengurangi adhesi abdomen, namun kekurangan dari *mesh* ini selain harganya yang mahal, belum sepenuhnya dapat mencegah kekambuhan. Dapat disimpulkan bahwa Kompatibilitas mekanik antara *mesh* hernia dengan lapisan dinding perut memainkan peranan penting dalam menghindari komplikasi dan kambuh pasca operasi (13,14).

II.III. Peran Sel Fibroblas

Kegagalan penyembuhan luka dikaitkan dengan gangguan fungsi dari sel fibroblas dan kelainan struktur kolagen. Kegagalan penyembuhan luka dan hilangnya proses penyembuhan luka normal menunjukkan keberadaan fibroblas abnormal yang

akan mengarah kepada kolagen abnormal. Fibroblas merupakan sel utama yang bertanggung jawab terhadap sintesis kolagen dan pembentukan jaringan ikat, dimana sel fibroblas sendiri bertanggung jawab untuk proses homeostatik dari jaringan normal seperti perbaikan jaringan sebagai respon dari cedera. Lebih lanjut lagi, fibroblas terkait dengan produksi fibril kolagen, yang membentuk interaksi mekanik timbal balik dengan matriks kolagen. Interaksi antara sel dan kolagen matriks ini akan menghasilkan pembentukan mechanical entanglement yang mentransmisikan kekuatan dari fibroblas ke matriks ekstrasel di sekelilingnya dan menginduksi perubahan matriks ekstrasel secara lokal dan global (14). Kolagen merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler untuk kedua jaringan tersebut. Keseimbangan maturasi dan degradasi kolagen dibutuhkan untuk pembentukan jaringan ikat yang normal. Saat proses penyembuhan luka, kolagen tipe III yang belum matur, secara cepat digantikan oleh kolagen tipe I yang lebih kuat. Proses seperti ini tertunda dengan adanya kehadiran benda asing di dalam tubuh seperti *mesh* (10,13,15).

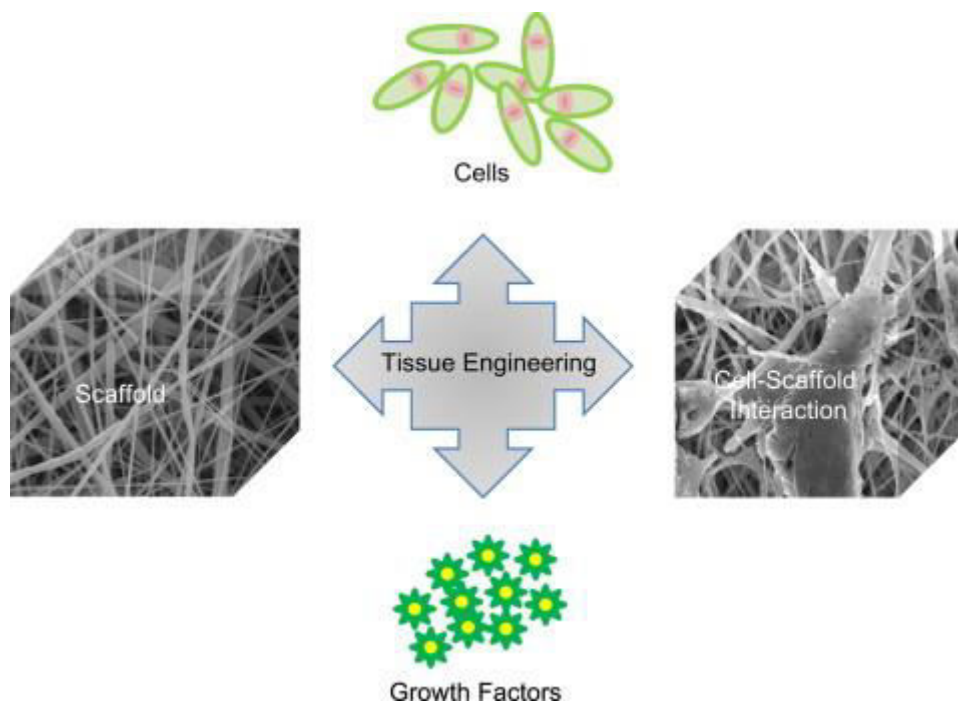
II.IV. Sistem Kultur 3 Dimensi

Dalam aplikasi rekayasa jaringan atau bahkan dalam kultur sel 3 dimensi, “*the biological cross talk*” antara sel dengan matriks diatur oleh sifat bahan dan karakter dari matriks. Dalam rangka menginduksi perlekatan sel, proliferasi, dan aktivasi, bahan yang digunakan untuk pembuatan matriks harus memiliki beberapa persyaratan seperti biokompatibilitas intrinsik dan kimia yang sesuai untuk menginduksi biorekognisi molekuler dari sel. Bahan, sifat mekanis dari matriks, serta kecepatan degradasi harus diadaptasikan pada aplikasi rekayasa jaringan spesifik untuk menjamin fungsi mekanis yang dibutuhkan dan untuk mencapai laju pembentukan jaringan baru yang diinginkan. Untuk matriks, distribusi pori-pori, area permukaan yang terbuka, dan porositas memainkan peranan penting, dimana jumlah dan distribusi mempengaruhi penetrasi dan laju penetrasi dari sel di dalam volume matriks, struktur dari matriks ekstraseluler yang diproduksi, dan untuk aplikasi rekayasa jaringan (16).

Jaringan-jaringan di dalam tubuh memiliki struktur serta sifat yang berbeda yang harus disesuaikan dengan matriks yang digunakan dalam rekayasa jaringan.

Lebih lanjut lagi, matriks harus dapat menjadi *host* dari perlekatan dan proliferasi sel, serta produksi matriks ekstraseluler (ECM). Secara singkat matriks harus dapat menggantikan ECM yang hilang. Matriks merepresentasikan ruang yang tersedia bagi jaringan untuk berkembang dan dukungan fisik untuk pertumbuhan sel. Sifat mekanis matriks harus dapat memelihara bentuk saat regenerasi jaringan berlangsung (16).

Matriks polimer 3 dimensi menjadi salah satu alternatif yang dapat digunakan sebagai pengganti mesh. Matriks merupakan spons berpori yang dapat mendukung pertumbuhan, organisasi, dan diferensiasi sel pada atau di dalam struktur matriks. Selain itu, matriks juga merupakan model yang berguna untuk analisa fungsional dan biomekanik dari interaksi sel-matriks (gambar 1) serta patogenesis seperti penyembuhan luka. Sistem kultur 3D digunakan untuk meniru matrik ekstraseluler alami yang ditemukan pada *in vivo* dan dipercaya memberikan lingkungan seperti jaringan alamiah bagi sel yang dikultur dalam kondisi tersebut (9,14).

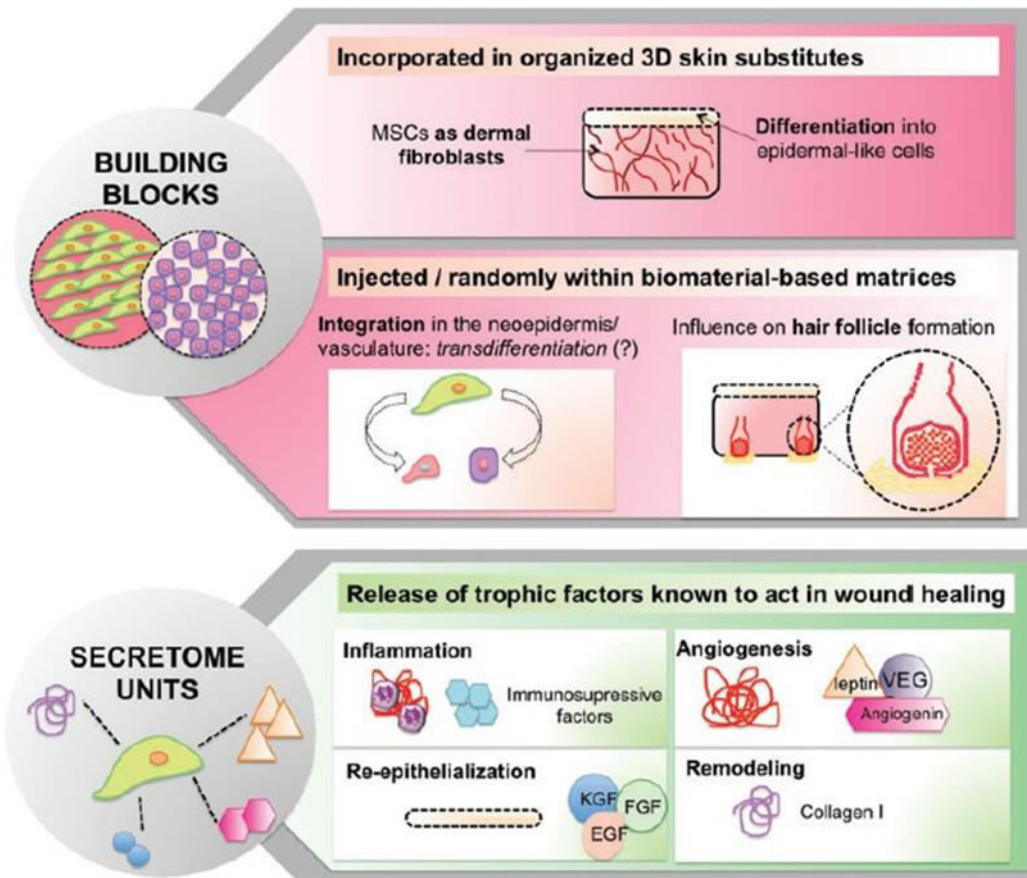


Gambar 1 Skema interaksi sel-matriks-CM dalam system kultur 3 dimensi (17).

II.V. Peran *Secretome* atau *Conditioned Medium* (CM) asal Sel Punca Mesenkimal

Terapi sel punca merupakan metode alternatif yang cukup baru dalam proses penyembuhan luka. Banyak peneliti mengandalkan terapi alternatif ini yang

memegang potensi besar pada faktor pertumbuhannya. Gambar 2 menunjukkan bagaimana peran sel punca pada proses penyembuhan luka serta sebagai *secretome* yang ampuh pada tingkat respon yang berbeda (18).



Gambar 2 Skema perspektif sel punca dalam proses penyembuhan luka serta sebagai *secretome* (18).

Secretome didefinisikan sebagai kelompok molekul/faktor yang disekresikan ke ruang ekstraseluler. Faktor-faktor ini termasuk protein terlarut, asam nukleat bebas, lipid, serta vesikel ekstraseluler. Vesikel ekstraseluler dapat dibagi lagi menjadi *apoptotic bodies*, mikropartikel, dan eksosom. *Secretome* dari sel individual dan jaringan bersifat spesifik dan berubah dalam respon terhadap fluktuasi pada keadaan fisiologis atau kondisi patologis (18). Sel punca mesenkimal (MSC) telah diisolasi dari berbagai jenis jaringan dewasa (19). Selain itu sel ini juga telah diisolasi dari jaringan *fetal* seperti tali pusat, kulit, dan placenta (20,21). MSC merupakan jenis sel pluripoten yang ditemukan di berbagai jaringan seperti tali pusat, sumsum tulang belakang, jaringan sinovial, dan jaringan adiposa. Sel ini juga merupakan sumber

berbagai faktor pertumbuhan untuk *self-stimulation* dan aktivasi dari berbagai jenis sel lainnya di dalam lingkungan mikro (22). Telah terbukti bahwa MSC memainkan peran dalam penyembuhan luka kulit dengan mempengaruhi migrasi fibroblas dermal, dan juga memiliki kontribusi terhadap pembentukan matriks ekstraseluler (23).

Penggunaan dari terapi bebas sel seperti *secretome* yang berasal dari sel punca mesenkimal pada pengobatan regeneratif memberikan berbagai keuntungan dibanding aplikasi sel punca. Pertama, aplikasi dari *secretome* menyelesaikan berbagai pertimbangan keamanan yang berpotensi terkait dengan transplantasi sel hidup yang proliferative termasuk kompatibilitas imun, tumorigenitas, terbentuknya emboli, dan transmisi infeksi. Kedua, *secretome* yang berasal dari sel punca mesenkimal dapat dievaluasi untuk keamanan, dosis, serta keampuhannya dengan cara yang analog dengan obat-obatan konvensional. Ketiga, penyimpanan dapat dilakukan tanpa penambahan bahan kriopreservatif dalam jangka waktu yang lama tanpa kehilangan kemampuan dari produk. Keempat, dengan menggunakan *secretome* ini, seperti *conditioned medium* (CM), lebih ekonomis dan praktis untuk aplikasi klinis karena tidak memerlukan proses koleksi sel yang invasif. Kelima, produksi massal sangat dimungkinkan melalui *tailor-made cell lines* di bawah kondisi laboratorium yang terkontrol, memberikan sumber faktor bioaktif yang sesuai. Keenam, waktu serta biaya dari ekspansi serta pemeliharaan dari kultur sel punca dapat berkurang cukup besar dan terapi *off-the-shelf* dapat segera tersedia untuk pengobatan kondisi akut. Terakhir, produk biologis yang didapatkan untuk aplikasi terapeutik dapat dimodifikasi untuk efek spesifik-sel yang diinginkan (18).

CM merepresentasikan lingkungan regeneratif dari *secretome* asal sel dan elemen vesikuler. Komponen terlarut dari *secretome* dapat dipisahkan dari fraksi mikrovesikel dengan sentrifugasi, filtrasi, kromatografi ion, serta kromatografi *size-exclusion*. Kedua komponen tersebut mungkin mampu secara mandiri memicu regenerasi dan perbaikan serta memediasi *organogenesis de novo* dari organ hasil rekayasa-jaringan *ex vivo* (18).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.I. Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Tarumanagara Human Cell Technology (THCT). Sampel untuk histologi matriks akan diproses di laboratorium patologi, PSSP-IPB, Bogor. Sedangkan sampel untuk analisa struktur matriks menggunakan SEM akan diproses di laboratorium SEM FMIPA ITB, Bandung.

III.II. Isolasi Sel Fibroblas

Sel fibroblas primer diisolasi dari kulit abdomen bagian dermis tikus *Sprague Dawley* (SD) jantan, 10-12 minggu (diperoleh dari BPOM). Secara singkat, kulit abdomen berukuran $\pm 3 \times 3$ cm dikoleksi. Kemudian jaringan akan dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS) (Sigma, USA) yang telah ditambahkan 2% Antibiotik-Antimikotik (Ab/Am). Setelah itu jaringan kembali dicuci dengan *buffer* EGTA yang juga telah ditambahkan 2% Ab/Am. Selanjutnya jaringan akan direndam di dalam larutan enzim kolagenase tipe 1 (200 U/ml), dengan bagian dermis menghadap ke bawah (terendam sepenuhnya). Jaringan akan diinkubasi pada suhu 37°C, 5% CO₂, selama 3-5 jam. Setelah inkubasi selama 3-5 jam, sel akan *discrap* dari bagian dermis menggunakan *cell scraper*, kemudian sel akan disaring dengan *cell strainer* berukuran 100 μ m. Sel akan dicuci dengan media kultur fibroblas dan kemudian ditanam. Sel yang berhasil diisolasi dikultur hingga mencapai konfluensi. Viabilitas, fungsi sel, serta penempelan sel pada matriks akan diuji secara *in-vitro*.

Media kultur fibroblas yang digunakan adalah *Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose* (DMEM) (Sigma, USA) yang telah disuplementasi dengan 1% sodium piruvat (Na-Pyr) (Sigma), 1% HEPES (Sigma), 1% Antibiotik-Antimikotik (Ab/Am) (Sigma), serta 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco, USA).

III.III. Produksi CM asal *human Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells* (hUC-MSC)

MSC akan diisolasi dari *human umbilical cord* dan dilakukan karakterisasi menggunakan metode PCR, kemudian sel akan dikultur hingga konfluen. Secara singkat, tali pusat dipotong-potong hingga berukuran ± 1 cm untuk setiap cawan petri. Kemudian jaringan diinkubasi di suhu ruang di dalam larutan PBS yang sudah ditambahkan 2% Ab/Am selama kurang lebih 5 menit. Setelah itu jaringan dicacah halus hingga berukuran ± 1 mm. Kemudian jaringan yang berukuran 1 mm diletakkan pada cawan petri yang sudah dilapisi kolagen sebelumnya, serta posisi antar jaringan diberi jarak. Setelah itu jaringan dibiarkan hingga menempel pada cawan petri, kemudian setelah menempel akan ditambahkan media kultur MSC hingga jaringan terendam. Jaringan akan diinkubasi selama kurang lebih 20 hari dan media kultur diganti setiap 3-5 hari. Setelah 20 hari, cawan petri diamati dengan mikroskop, bila sudah terdapat sel di sekitar jaringan yang menempel, maka jaringan tali pusat akan diangkat dan dibuang. Sel-sel yang ada di cawan petri akan dikultur hingga konfluen.

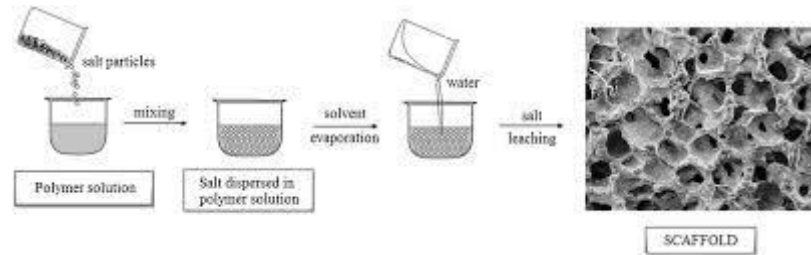
Supernatan (media kultur) *passage* 5-6, akan dikumpulkan, disaring dengan filter 0.22 μm , dan digunakan sebagai *secretome* atau *conditioned medium* (CM) asal *human Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cell* (hUC-MSC) untuk ditambahkan sebesar 1% pada media kultur fibroblas.

Media kultur MSC yang digunakan adalah *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* (DMEM) (Sigma, USA) yang telah disuplementasi dengan 0.584 g/L L-glutamine (Sigma), 1% Antibiotik-Antimikotik (Ab/Am) (Sigma), serta 20% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco, USA).

III.IV. Produksi Matriks 3D dan Sterilisasi

Produksi matriks akan mengikuti proses yang sudah dideskripsikan pada penelitian sebelumnya (24). Matriks akan dibuat dari PLLA (Durect Lactel, USA) sintetik, berbentuk bulat dengan diameter 1 cm, dan ketebalan 2 mm dengan metode *particulate leaching* (Gambar 3). Pori-pori matriks lebih dari 90% dengan ukuran pori sekitar 400 μm . Matriks untuk FMI akan dilapisi dengan 1% (w/v) kolagen *bovine*. Seluruh matriks yang digunakan akan lebih lanjut diberi perlakuan *plasma*

treatment untuk modifikasi permukaan matriks (Diener electronic GmbH + Co. KG, Ebhausen, Germany) dengan gas oksigen selama 10 menit. Kemudian matriks akan dikemas dalam kantong Tyvek dan disterilisasi. Sterilisasi dilakukan dengan mesin yang sama menggunakan larutan H₂O₂ 30% pada suhu 35°C selama 12 jam.



Gambar 3 Skema pembuatan matriks dengan metode *particulate leaching*.

III.V. Proses Penanaman Sel

Proses penanaman sel dibagi ke dalam 4 kelompok dengan pengulangan 3 kali (triplo) yaitu sebagai berikut:

1. Kelompok Fibroblas non-label: Sel fibroblas tanpa label, ditanam pada matriks dengan media kultur fibroblas
2. Kelompok Fibroblas-CM non-label: Sel fibroblas tanpa label, ditanam pada matriks dengan media kultur fibroblas + 1% CM
3. Kelompok Fibroblas label: Sel fibroblas dilabel CellVue NIR 815, ditanam pada matriks dengan media kultur fibroblas
4. Kelompok Fibroblas-CM label: Sel fibroblas dilabel CellVue NIR 815, ditanam pada matriks dengan media kultur fibroblas + 1% CM

Pada kelompok Fibroblas dan Fibroblas-CM non-label, setelah proses subkultur sel fibroblas akan langsung ditanamkan sebanyak 5×10^5 sel/100 μ L pada masing-masing matriks.

Sedangkan pada kelompok Fibroblas dan Fibroblas-CM label, sel fibroblas akan dilabel menggunakan CellVue NIR 815 (Li Cor Biosciences, USA), sebelum

ditanamkan pada matriks PLLA. Proses pelabelan sel dilakukan sesuai dengan protokol dari produsen reagen. Secara singkat, sel fibroblas akan dicuci dengan media DMEM tanpa serum, kemudian dilakukan pelabelan selama 5 menit pada suhu ruang dengan pewarna yang telah dilarutkan di dalam Diluent C (Li-Cor Biosciences, USA) pada konsentrasi final 2 μM . Kemudian sel fibroblas akan dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan media kultur fibroblas. Setelah itu pada masing-masing matriks akan ditanamkan sebanyak 5×10^5 sel/100 μL . Selanjutnya ditambahkan media kultur DMEM dan diinkubasi di dalam inkubator (5% CO_2 ; 37°C) selama 24 jam.

III.VI. Analisis perlekatan dan viabilitas sel

Setelah inkubasi selama 24 jam, matriks akan dianalisa untuk mengetahui perlekatan sel pada matriks serta viabilitas sel dengan menggunakan *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) (Sigma), yang berbasis pada reduksi dari garam tetrazolium menjadi formazan terlarut secara eksklusif di dalam sel viabel. Secara singkat media kultur akan diaspirasi dan disimpan untuk analisa lebih lanjut. Kemudian pada masing-masing matriks akan ditambahkan media kultur yang baru dan ditambahkan CCK-8 sebanyak 1:10. Selanjutnya sampel matriks akan diinkubasi selama 4 jam di dalam inkubator (5% CO_2 ; 37°C). Setelah 4 jam hasil akan dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan alat Multiskan reader (Multiskan Ex, Thermo Scientific, USA). Hasil akan digambarkan sebagai *fold change relative* terhadap *control percent adhesion* (sel yang menempel di *well plate* dianggap 100%).

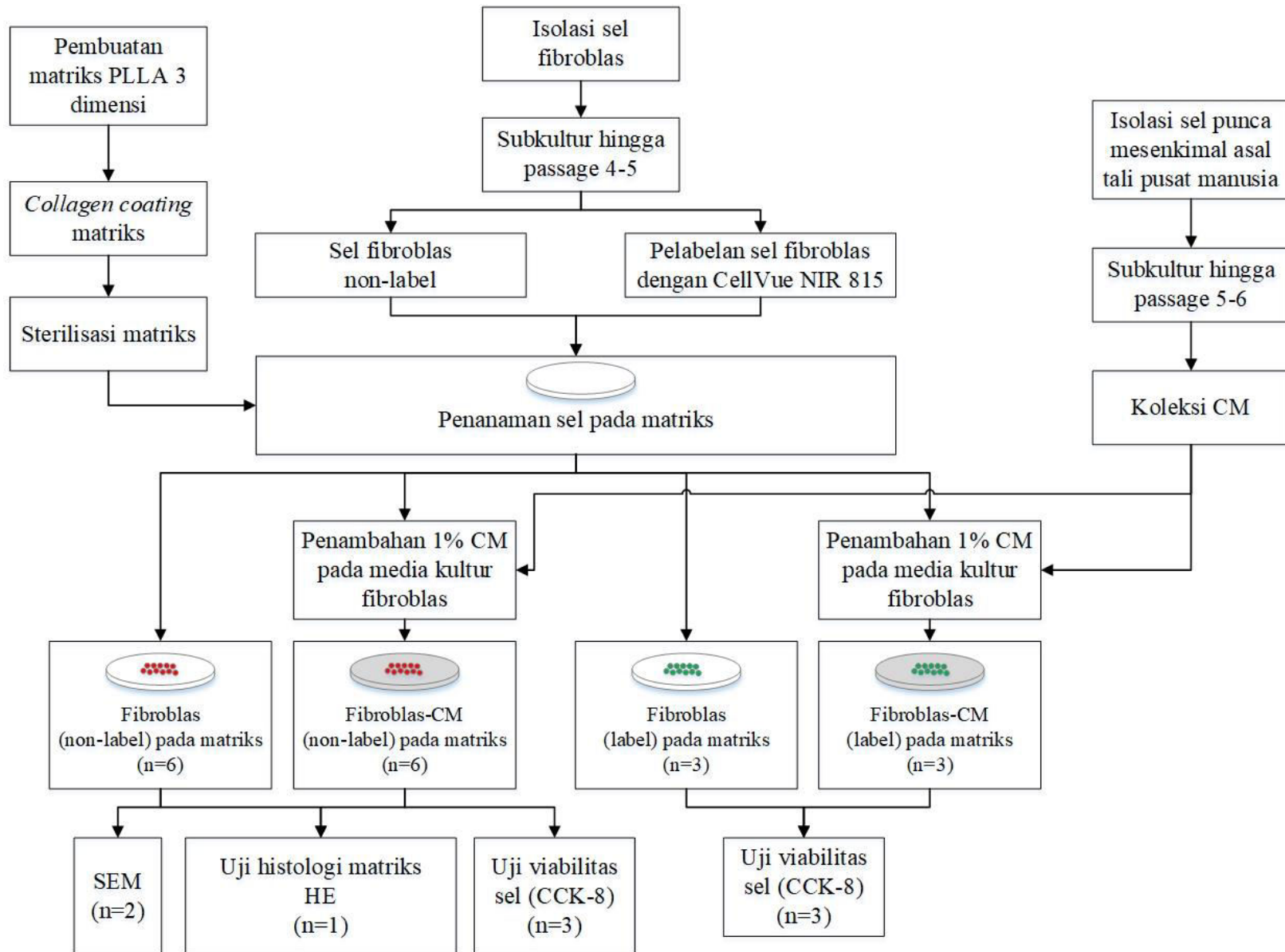
III.VII. Observasi *scanning electron microscopy* (SEM)

Sampel yang akan diobservasi adalah matriks PLLA tanpa pelapisan kolagen, matriks PLLA yang telah dilapisi kolagen, serta matriks dari kelompok fibroblas dan fibroblas-CM non label. Matriks akan difiksasi menggunakan metode yang digunakan oleh Sugiyama *et al.* (2). Matriks kelompok fibroblas dan Fibroblas-CM non label akan difiksasi setelah inkubasi selama 24 jam. Struktur mikroskopik dari matriks akan diobservasi menggunakan *Scanning electron microscope* (SEM) (JSM-6510 LA, JEOL, Tokyo, Japan).

III.VIII. Prosedur Histologi Matriks

Prosedur ini akan dilakukan pada sampel matriks PLLA tanpa pelapisan kolagen, matriks PLLA yang telah dilapisi kolagen, serta matriks kelompok fibroblas dan fibroblas-CM non-label. Matriks yang telah ditanami sel dan diinkubasi selama 24 jam akan disimpan di dalam *paraformaldehyde* untuk diproses lebih lanjut. Matriks akan difiksasi dan ditanam pada blok parafin dan dipotong tipis untuk kemudian diwarnai menggunakan pewarnaan hematoxylin-eosin (HE), Masson Trichome, serta IHK terhadap sel fibroblas.

III.IX. Alur Penelitian



BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.I. Fibroblas *Fold Changes*

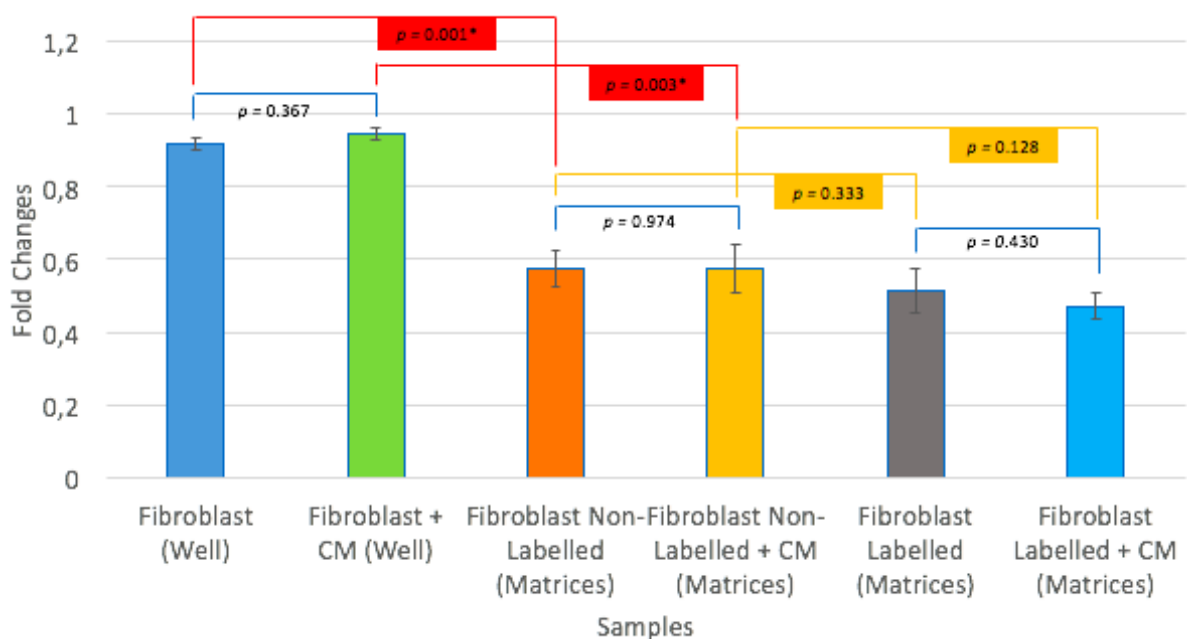
Jumlah dan viabilitas sel pada *well* dan matriks PLLA *wall-coated atelocollagen 1%* yang diinkubasi selama 24 jam memperlihatkan hasil *fold changes* yang berbeda, antara sel fibroblas yang ditanamkan pada *well* dan matriks baik disertai pemberian label dan *conditioned medium* (CM) maupun dengan yang tidak. Nilai *fold changes* yang didapat pada sampel fibroblas saja dan dengan penambahan CM pada *well* adalah 0.918 ± 0.015 dan 0.946 ± 0.018 . Nilai *fold changes* fibroblas non-label saja dan diberikan penambahan CM pada matriks PLLA adalah 0.575 ± 0.050 dan 0.573 ± 0.066 . Sedangkan nilai *fold changes* yang didapat sampel fibroblas yang dilabel dan dengan diberikan penambahan CM pada matriks adalah 0.514 ± 0.060 dan 0.472 ± 0.035 .

Tabel 1. *Fold Changes* dengan CCK-8

Sampel (n = 3)	Mean Fold Changes
Fibroblast (Well)	0.918 ± 0.015
Fibroblast + CM (Well)	0.946 ± 0.018
Fibroblast Non-Label (Matrices)	0.575 ± 0.050
Fibroblast Non-Label + CM (Matrices)	0.573 ± 0.066
Fibroblast Labelled (Matrices)	0.514 ± 0.060
Fibroblast Labelled + CM (Matrices)	0.472 ± 0.035

Pengukuran uji statistik dilakukan pada kelompok *well*, matriks baik dengan label ataupun tanpa label. Hasil pengukuran uji statistik didapatkan fibroblas yang ditanamkan pada *well* memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan fibroblast non-label pada matriks ($p = 0.001$). Uji statistik juga mendapatkan jumlah yang lebih tinggi pada fibroblas dengan CM pada *well* dibandingkan dengan fibroblas

non-label dengan CM pada matriks ($p = 0.003$). Uji statistik lain yang dilakukan pada kelompok fibroblas saja dan dengan CM pada well, kelompok fibroblas non-label dan dengan CM pada matriks, kelompok fibroblas label dan dengan CM pada matriks memperlihatkan hasil yang tidak signifikan secara berturut-turut $p = 0.367$, $p = 0.974$, $p = 0.430$. Uji statistik juga dilakukan pada kelompok fibroblas yang ditanamkan pada matriks dan dibandingkan dengan ada atau tidaknya pemberian label maupun CM. Hasil pengukuran uji statistik yang dilakukan antara kelompok fibroblas non-label dengan kelompok fibroblast yang diberi label tanpa adanya penambahan CM menunjukkan hasil yang tidak signifikan yaitu $p = 0.333$. Pengukuran uji statistik juga dilakukan antara kelompok fibroblas non-label dengan kelompok fibroblast label yang ditambahkan CM memperlihatkan hasil yang tidak signifikan yaitu $p = 0.128$.



Gambar 4. Uji Statistik dengan CCK-8

Proses penyembuhan luka terdiri dari tiga fase utama yang saling berkaitan. Fase pertama ditandai oleh aktivitas sitokin dengan kaskade koagulasi untuk pembentukan jaringan baru. Neutrofil merupakan sel paling penting pada fase pertama untuk proses fagositosis dan pelepasan sitokin dalam menekan proses inflamasi. Fase kedua merupakan fase proliferasi yang dimulai pada hari keempat yang ditandai dengan migrasi, proliferasi, deposisi matriks ekstrasel, dan angiogenesis. Fase ketiga atau tahap final ditandai dengan remodeling kolagen. Fibroblas merupakan salah satu komponen

penting dalam ketiga fase tersebut baik dalam pengumpulan matriks ekstraseluler dan kontraksi luka. (14,25)

Fibroblas merupakan sel utama yang bertanggung jawab terhadap sintesis kolagen dan pembentukan jaringan ikat, dimana sel fibroblas sendiri bertanggung jawab untuk proses homeostatik dari jaringan normal seperti perbaikan jaringan sebagai respon dari cedera. Lebih lanjut lagi, fibroblas terkait dengan produksi fibril kolagen, yang membentuk interaksi mekanik timbal balik dengan matriks kolagen. Interaksi antara sel dan kolagen matriks ini akan menghasilkan pembentukan *mechanical entanglement* yang mentransmisikan kekuatan dari fibroblas ke matriks ekstrasel di sekelilingnya dan menginduksi perubahan matriks ekstrasel secara lokal dan global. (14)

Pada studi ini didapatkan fibroblas dengan CM pada well memiliki *fold changes* paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lain yakni dengan nilai *fold changes* sebesar 0.946. Namun peningkatan tersebut tidak ditemukan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan fibroblas saja ($p = 0.367$). Fibroblas yang ditanamkan pada well baik dengan CM ataupun tidak memiliki hasil yang signifikan bila dibandingkan dengan fibroblas yang ditanamkan pada matriks ($p < 0.05$). Hal ini dapat terjadi oleh adanya interaksi sel dengan permukaan biomaterial yang mempengaruhi pertumbuhan dan fungsi sel pada matriks. Pemberian label menunjukkan adanya gangguan pada viabilitas sel yang ditandai dengan penurunan nilai *fold changes* (0.514) yang lebih rendah bila dibandingkan dengan grup non-label (0.575).

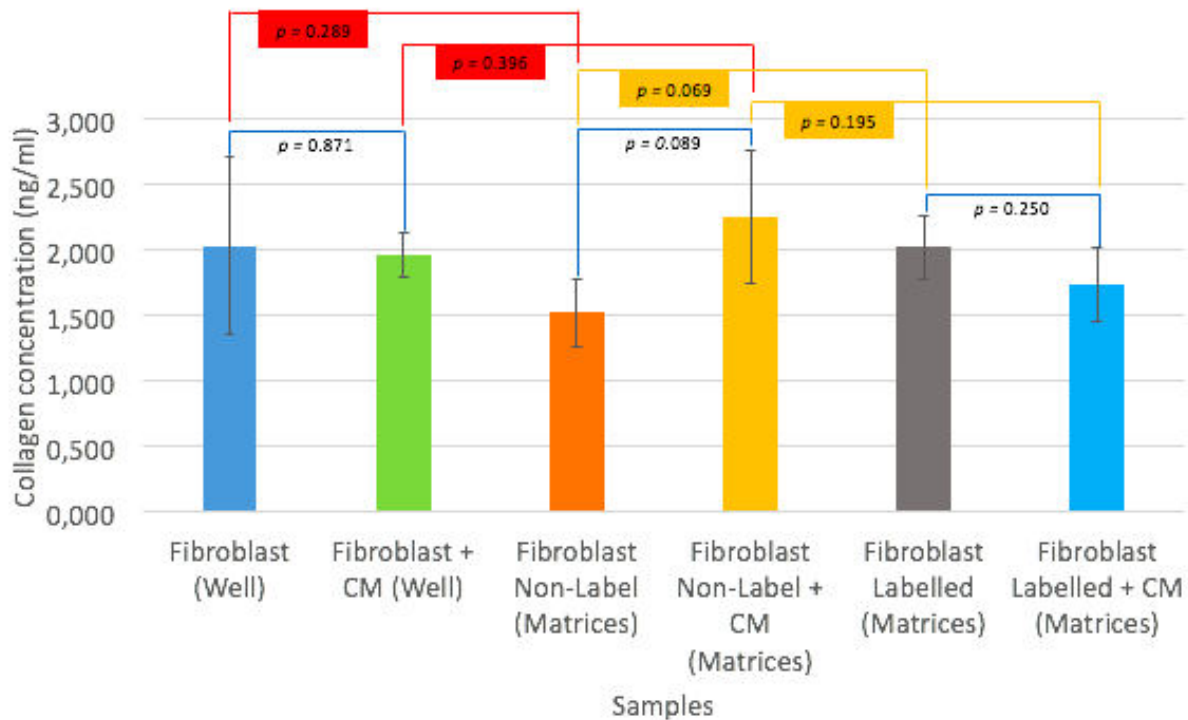
IV.II. Konsentrasi Kolagen tipe I

Pengukuran konsentrasi kolagen tipe I pada tikus dilakukan dengan metode ELISA. Konsentrasi kolagen tipe I pada kelompok yang ditanamkan pada well yakni, fibroblas saja dan dengan CM adalah 2.037 ± 0.678 ng/ml dan 1.967 ± 0.168 ng/ml. Pada kelompok fibroblas yang ditanamkan pada matriks, terbagi lagi menjadi fibroblas non-label dan label. Konsentrasi kolagen pada fibroblas non-label saja dan dengan CM didapatkan hasil 1.526 ± 0.256 ng/ml dan 2.259 ± 0.506 ng/ml. Sedangkan pada fibroblas label saja dan dengan CM didapatkan konsentrasi kolagen sebesar 2.028 ± 0.243 ng/ml dan 1.740 ± 0.281 ng/ml.

Tabel 2. Konsentrasi Kolagen tipe I pada Tikus

Sampel (n=3)	Mean Collagen Concentration (ng/ml)
Fibroblast (Well)	2.037 ± 0.678
Fibroblast + CM (Well)	1.967 ± 0.168
Fibroblast Non-Label (Matrices)	1.526 ± 0.256
Fibroblast Non-Label + CM (Matrices)	2.259 ± 0.506
Fibroblast Labelled (Matrices)	2.028 ± 0.243
Fibroblast Labelled + CM (Matrices)	1.740 ± 0.281

Hasil pengukuran uji statistik dilakukan pada kelompok well dan matriks. Hasil uji statistik pada kelompok fibroblas pada well dengan fibroblas non-label pada matriks memperlihatkan hasil yang tidak signifikan ($p = 0.289$). Hasil uji statistik dilakukan pada kelompok fibroblas dengan CM pada well dan fibroblas non-label dengan CM pada matriks juga memperlihatkan hasil yang tidak signifikan ($p = 0.396$). Uji statistik pada masing-masing kelompok well dan kelompok matriks juga dilakukan. Uji statistik kelompok fibroblas tanpa CM dan dengan CM pada well, kelompok fibroblas non-label saja dan dengan CM pada matriks, kelompok fibroblas label dan dengan CM pada matriks didapatkan hasil tidak bermena secara berurutan yakni, $p = 0.871$, $p = 0.089$, $p = 0.250$. Uji statistik juga dilakukan untuk membandingkan antara kelompok yang ditanam pada matriks baik dengan pemberian label atau CM. Hasil uji statistik pada kelompok fibroblas non-label dan fibroblas label tanpa CM dan dengan pemberian CM pada matriks memperlihatkan hasil yang tidak signifikan, yakni $p = 0.069$ dan $p = 0.195$.



Gambar 5. Uji Statistik Kadar Kolagen tipe I pada Tikus

Kolagen merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler untuk kedua jaringan tersebut. Keseimbangan maturasi dan degradasi kolagen dibutuhkan untuk pembentukan jaringan ikat yang normal. Saat proses penyembuhan luka, kolagen tipe III yang belum matur, secara cepat digantikan oleh kolagen tipe I yang lebih kuat. Proses seperti ini tertunda dengan adanya kehadiran benda asing di dalam tubuh seperti *mesh* (10,13,15).

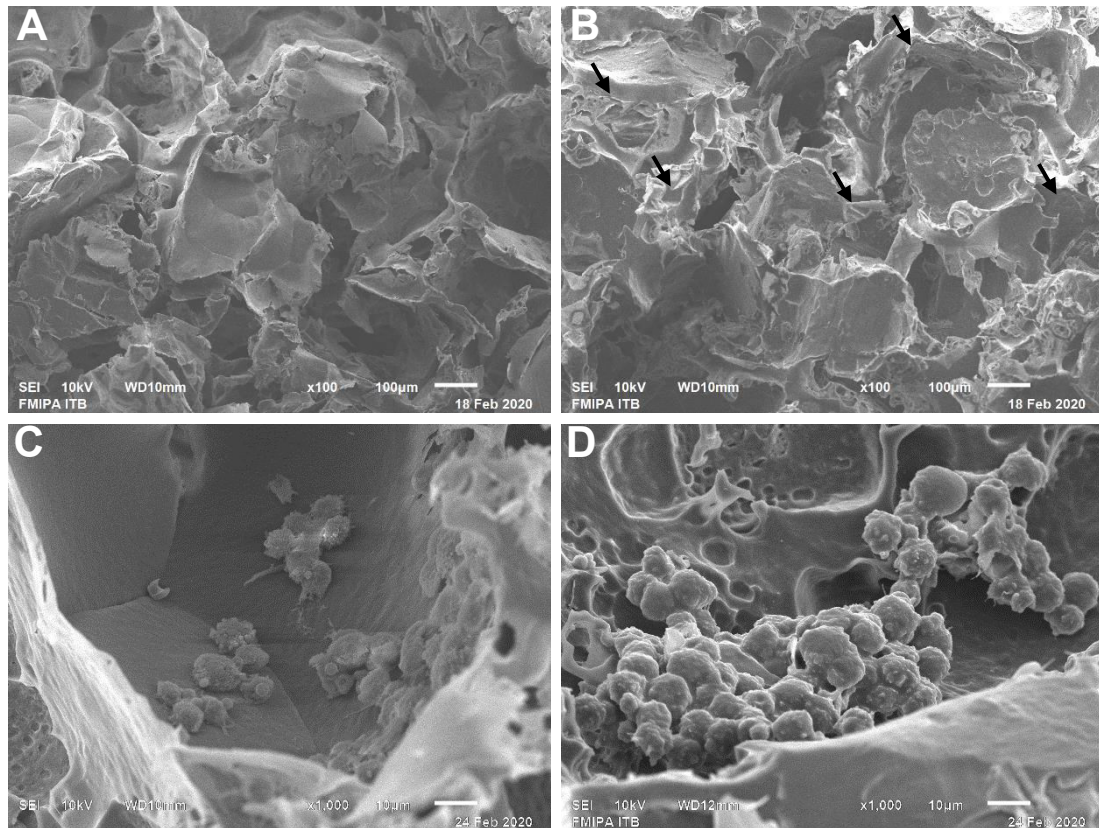
Pada pengukuran kadar kolagen tipe I dengan metode elisa didapatkan fibroblas tanpa CM lebih tinggi (2.037 ng/ml) dibandingkan dengan CM (1.967 ng/ml). Kadar kolagen pada fibroblas dengan CM memiliki hasil lebih rendah dibandingkan tanpa CM, namun secara statistik tidak signifikan ($p = 0.871$). Kadar kolagen tipe I pada fibroblas dengan CM yang ditanamkan pada matriks memiliki nilai lebih tinggi (2.259 ng/ml) dibandingkan dengan fibroblas tanpa CM (1.526 ng/ml). Hasil ini menunjukkan CM tidak berperan dalam perkembangan fibroblas (*in-vitro*). Studi Kim *et al.* memperlihatkan hasil yang berbeda, dimana penggunaan *bone marrow derived MSCs* (BM-*MSCs*) pada matriks yang dilapisi kolagen untuk luka derajat III (*full thickness*) memperlihatkan adanya perbaikan pada hari ke-7 namun tidak memperlihatkan adanya perbaikan luka pada hari ke-14. (26)

IV.III. Interaksi antara sel dengan matriks

Analisa struktur serta interaksi sel dengan matriks dilakukan dengan menggunakan metode SEM. Matriks yang tidak dilapisi kolagen dibandingkan dengan matriks yang telah dilapisi kolagen (Gambar 6A dan 6B). Dari hasil SEM terlihat sangat sedikit perbedaan dimana pada matriks yang dilapisi kolagen terlihat ada lapisan putih (panah hitam) pada pori-pori matriks yang diamati. Melalui gambar tersebut tidak terlalu terlihat perbedaan koloni fibroblast yang nyata. Hal ini dapat dipengaruhi karena pada studi ini pori-pori pada matriks yang dilapisi kolagen menggunakan metode akselerasi sentrifugal lebih tinggi dari 600×G. Hasil didapatkan tidak jauh berbeda dengan pori-pori pada matriks PLLA tanpa proses pelapisan kolagen. Hal ini didukung oleh studi yang dilakukan oleh Sugiyama et al, dimana efek sentrifugal dengan kecepatan 0 dan 24 g pada matriks PLLA memperlihatkan pori-pori matriks seluruhnya dipenuhi oleh mikrospons kolagen. Hal serupa ditemukan pada kecepatan sentrifugal 100 g, namun matriks PLLA hanya dipenuhi separuhnya oleh mikrospons kolagen. Sebaliknya pada kecepatan sentrifugal lebih dari 600 g tidak ditemukan adanya mikrospons kolagen yang mengisi matriks PLLA (2). Selanjutnya melalui gambar 6C dan 6D terlihat perbandingan antara matriks yang telah ditanamkan fibroblas baik tanpa penambahan CM (Gambar 6C) maupun dengan penambahan CM (Gambar 6D). Interaksi sel dengan matriks dapat terlihat pada gambar 6C dan 6D, dimana dengan adanya penambahan CM jumlah koloni fibroblast yang terlihat lebih banyak dibandingkan matriks dengan sel fibroblas tanpa penambahan CM. Porositas matriks memainkan peranan penting bagi pertumbuhan sel, dimana jumlah dan distribusinya mempengaruhi penetrasi serta laju penetrasi sel ke dalam matriks sehingga dapat digunakan untuk aplikasi rekayasa jaringan (16). Selain itu melalui gambar 6 dapat terlihat bahwa sel dapat berperan sebagai *host* dari perlekatan dan proliferasi sel fibroblast (gambar 6C dan 6D). Matriks biopolymer ini dapat digunakan untuk merepresentasikan ruang yang tersedia bagi sel untuk berkembang (16).

Pada studi ini, kami menggunakan pemberian CM pada mesh. CM merepresentasikan lingkungan regeneratif dari *secretome* asal sel dan elemen vesikuler. (18) Hasil uji statistik pada studi ini memperlihatkan kadar kolagen tipe I pada media fibroblas tanpa CM lebih tinggi (2.037 ng/ml) dibandingkan dengan CM (1.967 ng/ml). Kadar kolagen pada fibroblas dengan CM memiliki hasil lebih rendah dibandingkan tanpa CM, namun secara statistik tidak signifikan ($p = 0.871$).

Kombinasi *stem cells* dengan biomaterial matriks merupakan salah satu strategi yang menjanjikan pada *tissue engineering* pada situasi *in vitro* ataupun *in vivo*. (27)



Gambar 6. Gambar matriks PLLA (A-B) dan matriks PLLA dengan fibroblast (C-D). Matriks PLLA tanpa pelapisan kolagen (A), dilapisi dengan kolagen 1% (B) dengan perbesaran 100X. Fibroblas yang ditanamkan pada matriks PLLA (C), Fibroblas yang ditanamkan pada matriks PLLA dengan penambahan CM (D), perbesaran 1000X. Skala bar 100 µm (A-B), 10 µm (C-D).

Matriks polimer 3 dimensi menjadi salah satu alternatif yang dapat digunakan sebagai pengganti mesh. Matriks merupakan spons berpori yang dapat mendukung pertumbuhan, organisasi, dan diferensiasi sel pada atau di dalam struktur matriks. Sistem kultur 3D digunakan untuk meniru matrik ekstraseluler alami yang ditemukan pada *in vivo* dan dipercaya memberikan lingkungan seperti jaringan alamiah bagi sel yang dikultur dalam kondisi tersebut. Lingkungan matriks ekstraseluler merupakan komponen esensial dalam perbaikan luka, matriks ekstrasel memberikan integritas, regulasi fungsi sel dalam penyembuhan luka (9,14). Pada penelitian kami juga dilakukan perbandingan penanaman sel pada well dan matriks yang dinilai dengan perubahan *fold changes*. Hasil pengukuran uji statistik didapatkan nilai yang bermakna

pada fibroblas yang ditanamkan pada well dibandingkan dengan fibroblast non-label pada matriks ($p = 0.001$). Uji statistik juga mendapatkan nilai yang bermakna pada fibroblas dengan CM pada well dibandingkan dengan fibroblas non-label dengan CM pada matriks ($p = 0.003$). CM mensekresikan berbagai faktor parakrin yang dapat membantu penyembuhan luka dengan mengaktifasi proliferasi dan migrasi sel, salah satunya adalah fibroblas. Studi yang dilakukan oleh Oh M et al mengenai efek CM pada fibroblas kulit memperlihatkan hasil yang bermakna pada sel fibroblas tikus dan manusia dengan plate *vitronectin-coated*. Pada studi tersebut ditemukan proliferasi fibroblas tikus paling optimal dengan pemberian stem cell dengan konsentrasi 100%, sedangkan proliferasi fibroblas manusia paling optimal dengan pemberian stem cell pada konsentrasi 75%. Migrasi fibroblas juga dinilai pada studi tersebut dengan *transwell chamber*, dimana pada sel yang terluka diberikan 75% CM dan diobservasi. Setelah 48 jam observasi tampak fibroblas memenuhi daerah yang terluka (28). CM berperan penting dalam proses proliferasi dan migrasi fibroblas untuk penyembuhan luka.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.I. Kesimpulan

1. Tidak ditemukan adanya perbedaan antara struktur matriks PLLA yang tidak dilapisi kolagen dengan yang dilapisi kolagen pada akselerasi sentrifugal yang tinggi (>600xG) sehingga struktur mikrospons tidak tampak jelas mengisi pori-pori matriks.
2. Fibroblas dapat tumbuh dan berfungsi memproduksi kolagen apabila ditanamkan pada matriks 3 dimensi, namun viabilitas didapatkan lebih tinggi kultur 2 dimensi ($p = 0.001$).
3. CM menstimulasi fibroblas dalam memproduksi kolagen terutama fibroblast yang ditanamkan pada matriks. Pemberian CM dapat meningkatkan produksi kolagen dibandingkan yang tidak diberikan CM, namun secara statistik tidak signifikan ($p = 0.396$).

V.II Saran

Bagi Peneliti Selanjutnya:

- Penelitian dapat dilakukan secara *in vitro* untuk melihat efektivitas matriks dengan CM dalam menurunkan kejadian perlengketan mesh pada hernia insisional

Bagi Institusi Pendidikan:

- Turut membantu serta mendukung terlaksananya penelitian sejenis guna meningkatkan pengetahuan, referensi, serta mengoptimalkan pengobatan terhadap masyarakat yang lebih baik

DAFTAR PUSTAKA

1. Yang J, Shi G, Bei J, Wang S, Cao Y, Shang Q, et al. Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(3):438–46.
2. Sugiyama K, Okamura A, Kawazoe N, Tateishi T, Sato S, Chen G. Coating of collagen on a poly(L-lactic acid) sponge surface for tissue engineering. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2012;32(2):290–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.031>
3. Khorasani MT, Mirzadeh H, Irani S. Comparison of fibroblast and nerve cells response on plasma treated poly (L-lactide) surface. *J Appl Polym Sci* [Internet]. 2009 Jun 15;112(6):3429–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.29813>
4. Caglia P, Tracia A, Borzi L, Amodeo L, Tracia L, Veroux M, et al. Incisional hernia in the elderly: Risk factors and clinical considerations. *Int J Surg*. 2014;12(S2):S164–9.
5. Kawaguchi M, Ueno H, Takahashi Y, Watanabe T, Kato H, Hosokawa O. Transitional mesh repair for large incisional hernia in the elderly. *Int J Surg Case Rep* [Internet]. 2015;7:70–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijscr.2014.12.023>
6. Burger JWA, Luijendijk RW, Hop WCJ, Halm JA, Verdaasdonk EGG, Jeekel J, et al. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg*. 2004;240(4):578–85.
7. Kulah B, Duzgun AP, Moran M, Kulacoglu IH, Ozmen MM, Coskun F. Emergency hernia repairs in elderly patients. *Am J Surg* [Internet]. 2001 Nov;182(5):455–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754850>
8. Melman L, Jenkins ED, Hamilton NA, Bender LC, Brodt MD, Deeken CR, et al. Early biocompatibility of crosslinked and non-crosslinked biologic meshes in a porcine model of ventral hernia repair. *Hernia*. 2011;15(2):157–64.
9. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2008;14(1):61–86. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/teb.2007.0150>
10. Brown CN, Finch JG. Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl*. 2010;92(4):272–8.
11. Horimizu M, Kawase T, Nakajima Y, Okuda K, Nagata M, Wolff LF, et al. An improved freeze-dried PRP-coated biodegradable material suitable for connective tissue regenerative therapy. *Cryobiology* [Internet]. 2013;66(3):223–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.01.006>
12. Elango S, Perumalsamy S, Ramachandran K, Vadodaria K. Mesh materials and hernia repair. *BioMedicine* [Internet]. 2017;7(3):16. Available from: <http://biomedicine.edp-open.org/10.1051/bmdcn/2017070316>
13. Mutwali IM. Incisional Hernia : Risk Factors , Incidence , Pathogenesis , Prevention and Complications. *Sch J Appl Med Sci*. 2014;2(4E):1491–7.

14. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: Cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med*. 2009;41(12):858–65.
15. Arenal JJ, Rodriguez-Vielba P, Gallo E, Tinoco C. Hernias of the abdominal wall in patients over the age of 70 years. *Eur J Surg*. 2002;168(8–9):460–3.
16. Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In: *3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2011. p. 17–39. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-984-0_2
17. Rana D, Arulkumar S, Vishwakarma A, Ramalingam M. Considerations on designing scaffold for tissue engineering. In: *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier; 2015. p. 133–48.
18. Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1852.
19. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-). 1999;284(5411):143–7.
20. Arno AI, Amini-nik S, Blit PH, Al-shehab M, Belo C, Herer E, et al. Human Wharton ' s jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. 2014;1–13.
21. Kim SM, Lim JY, Park SI, Jeong CH, Oh JH, Jeong M, et al. Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood–derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res*. 2008;68(23):9614–23.
22. Gu J, Shi X, Chu X, Zhang Y, Ding Y. Contribution of bone marrow mesenchymal stem cells to porcine hepatocyte culture in vitro. *Biochem Cell Biol*. 2009;87(4):595–604.
23. Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res* [Internet]. 2010;316(7):1271–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.026>
24. Hendrawan S, Yusuf I, Hatta M, Aman M, Patellongi I, Serra AL, et al. Allogeneic islet cells implant on poly-L-lactide matrix to reduce hyperglycaemia in streptozotocin-induced diabetic rat. *Pancreatology* [Internet]. 2017 May;17(3):411–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pan.2017.02.017>
25. Ferreira AD, Gomes DA. Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair. *Bioengineering*. 2019; 6 (4).
26. Kim, C.H.; Lee, J.H.; Won, J.H.; Cho, M.K. Mesenchymal stem cells improve wound healing in vivo via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. *J. Korean Med. Sci*. 2011, 26, 726–733.
27. Willerth, Stephanie M, Elbert S, Shelly E. Combining Stem Cells and Biomaterial Scaffolds for Constructing Tissues and Cell Delivery. *Stem Journal*. 2019 (1). 1-25

28. Oh M, Kim YJ, Son YJ, Yoo HS, Park JH. Promotive Effects of Human Induced Pluripotent Stem Cell-conditioned Medium on the Proliferation and Migration of Dermal Fibroblasts. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2017; 22; 561-568.

SUSUNAN PERSONALIA PENELITI

No.	Nama dan Gelar Akademik	NIDN/NIM	Fakultas/Prodi	Bidang Keahlian/Peran	Tugas	Alokasi waktu (jam/minggu)
1	dr. Shirly Gunawan, Sp.FK	0302057902	Fakultas Kedokteran/Sarjana Kedokteran	Spesialis Farmakologi Klinik	Analisa data	5 jam/minggu