

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan mencit model lupus induksi pristan sebagai hewan coba. Jenis penelitian ini dipilih dengan alasan penelitian ini adalah penelitian yang belum pernah dilakukan sebelumnya baik pada manusia maupun hewan uji sehingga supaya variabel perancu dapat dikontrol, perlakuan dapat diatur, aspek keamanan tidak menjadi kendala serta menghasilkan data yang valid dan reliabel maka dilakukan penelitian pada model hewan uji (Zainuddin *et al.*, 1999).

Pengukuran awal tidak dilakukan atas pertimbangan semua hewan uji dari semua kelompok berasal dari satu populasi terkontrol yang sama serta dilakukan randomisasi sehingga sebaran data awal akan serupa antara ketiga kelompok sehingga hanya dilakukan pengukuran akhir (*post-test only*) (Sastroasmoro *et al.*, 2011).

Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol (K): mencit bunting tanpa pemberian pristan dan sekretom, kelompok pristan (P): mencit bunting dengan pemberian pristan dan tanpa pemberian sekretom, kelompok sekretom (S): mencit bunting dengan pemberian pristan dan pemberian sekretom. Sampel penelitian berupa serum darah, plasenta, dan janin diambil dari hewan uji kemudian dilakukan analisis statistik terhadap sebelas variabel terikat. Data hasil penelitian dianalisis dan dikaji untuk kemudian dituangkan secara ilmiah dalam pembahasan serta kesimpulan. Hal yang dirasakan merupakan keterbatasan penelitian digali dan dilaporkan beserta saran untuk kelanjutan di masa yang akan datang.

B. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan randomisasi terkontrol. Sampel diambil dari 7 ekor mencit per kelompok yang memenuhi kriteria. Untuk mendapatkan

jumlah sampel minimal dilakukan randomisasi blok permutasi. Setiap kloter terdiri dari 30 mencit yang dipilih acak dari 45 mencit sehat kemudian dibagi secara acak terkendali menjadi 10 mencit setiap kelompok dan diberi tanda sesuai protokol mulai 1 hingga 10 perkelompoknya. Mencit diberikan perlakuan awal induksi pristan (Kelompok P dan S) atau tanpa induksi (Kelompok K) kemudian dibuntingkan dan mendapat pemberian sekretom (Kelompok S) dan tidak (Kelompok K dan P). Mencit yang sudah bunting tersebut diikuti hingga masa bunting hari ke-16 sehingga kriteria inklusi terpenuhi dan menjadi sampel penelitian. Dilakukan pengulangan kloter randomisasi hingga minimal 7 sampel setiap kelompok terpenuhi.

Mencit berasal dari galur BALB/c umur 6-8 minggu, berat badan 30–40 gram yang sehat dinilai dari mata jernih, bulu bersih, dan aktif, diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga melalui *breeder* yang terpercaya. Bahan makanan mencit digunakan pakan mencit standar BR1. Pemilihan hewan coba mencit berdasarkan pertimbangan bahwa mencit *Mus musculus* paling sering dipakai pada penelitian biomedik, karena secara genetik mempunyai kemiripan dengan manusia, dan mempunyai kemampuan adaptasi yang mudah dalam lingkungan laboratorium. Penelitian ini tidak memungkinkan untuk dilakukan substitusi secara *in vitro* karena variabel yang dinilai bukan hanya bio-marker melainkan juga jumlah bayi, panjang bayi, dan berat bayi. Mencit adalah hewan terkecil yang paling representatif untuk rancang penelitian ini (Fink *et al.*, 2014).

Mencit dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu dalam kandang yang standar dengan kriteria: cukup pencahayaan, cukup ventilasi, cukup area istirahat, dan cukup untuk area beraktivitas. Kelompok dibagi menjadi 3 kelompok, kelompok kontrol (K): mencit bunting tanpa pemberian pristan dan tanpa sekretom, kelompok pristan (P): mencit bunting dengan pemberian pristan dan tanpa sekretom, kelompok sekretom (S): mencit bunting dengan pemberian pristan dan sekretom.

Kelompok P dan S mendapatkan injeksi intraperitoneal pristan sementara kelompok K mendapat injeksi intra peritoneal normal salin. Pristan

adalah zat kimiawi (2,6,10,14-tetramethylpentadecane/ TMPD) suatu alkana isoprenoid yang digunakan sebagai induksi hewan coba model lupus (Reeves, 2012). Diberikan secara intraperitoneal dengan dosis tunggal injeksi 0.5 ml sesuai penelitian terdahulu oleh Kalim (2016) dan Nurudhin (2017), serta sesuai protokol baku internasional seperti yang dilakukan oleh Satoh (1994). Dibutuhkan waktu empat minggu untuk menghasilkan tikus model lupus dengan induksi pristana yang memenuhi kriteria klinis dan laboratoris yang diharapkan pada penelitian ini. Pristana bekerja dengan melakukan destruksi sel peritoneal serta memberikan defek imunologis, sehingga mengakibatkan kaskade yang berujung pada pembentukan auto-antibodi yang merepresentasikan lupus baik secara laboratoris maupun klinis (Kalim, 2016 dan Nurudhin, 2017).

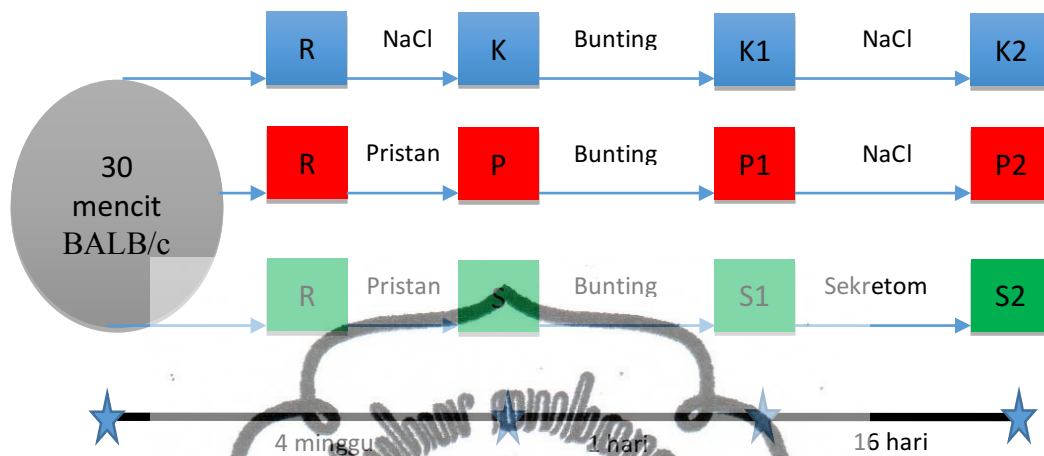
Setelah empat minggu pasca induksi lupus, mencit pada ketiga kelompok (K, P, dan S) diambil sampel darah untuk pemeriksaan anti-dsDNA serta dicatat kriteria klinis lupus pada hewan yaitu: tidak bergerak aktif, bulu kusam, sinar mata suram, dan tidak nafsu makan minum. Hari berikutnya, dilakukan sinkronisasi birahi dengan pemberian PMSG dan dua hari kemudian disuntikkan hCG. Mencit betina tersebut dikawinkan secara monomating yakni dimasukkan ke dalam kandang satu tikus jantan umur 7 bulan dengan berat 60 gram. Diagnosis bunting didapatkan setelah 17 jam kawin dan dievaluasi adanya *copulatory plug*, yakni sumbat yang menutupi vagina mencit dari serviks hingga vulva sebagai penanda bunting. Bunting ditandai dengan *copulatory plug*. Pada hari ke-1 masa bunting mencit pada kelompok S mendapat injeksi intraperitoneal 0.5 ml sekretom sel punca mesenkimal, sedangkan kelompok K dan P mendapat injeksi NaCl 0.9 % 0.5 ml. Mencit model lupus yang tidak berhasil dibuntingkan dan menunjukkan tanda gelisah, tidak aktif, dan kehilangan nafsu makan; dieksklusi dan dirawat dengan memberikan makan melalui sonde serta memberikan obat analgesik. Mencit yang berhasil dibuntingkan dan kebuntingan berlanjut hingga hari ke-16 diinklusi menjadi subjek penelitian.

Pada hari ke-16 masa bunting mencit, mencit dikorbankan

mengorbankan mencit dengan teknik dislokasi servikal. Sampel serum darah, plasenta, dan bayi mencit diambil, diukur, dicatat, dan dianalisis. Hari ke-16 merepresentasikan masa '*early aterm*'. Secara praktik klinis, masa ini adalah masa alami untuk proses persalinan dan pengakhiran kehamilan atas indikasi medis untuk lupus. Penilaian luaran tidak menunggu persalinan alami untuk mendapatkan standar data yang sebanding berdasar waktu baik sampel serum, plasenta, maupun janin mencit di semua kelompok. Target organ lain yang potensial dilakukan penelitian akan disimpan untuk keperluan analisis untuk menghindari kesia-siaan hewan uji. Mencit yang telah diambil sampel target organ kemudian dibakar sebelum dikuburkan untuk menghindari kontaminasi lingkungan oleh pristan.

Terhadap setiap variabel terikat dilakukan teknik pengambilan sampel khusus dan pengukuran nilai variabel sesuai tata cara masing-masing. Data yang didapatkan dilakukan analisis secara klinis dan statistik. Hasil analisis statistik dikaji dan direpresentasikan dalam hasil penelitian, pembahasan, kesimpulan, keterbatasan penelitian dan saran.

C. Bagan Rancangan Penelitian



Keterangan:

R: Random

K: Kontrol

P: Pristan (pristan)

S: Sekretom (pristan + sekretom)

K1: Kelompok kontrol diberi NaCl dan dibuntingkan

P1: Kelompok pristan setelah diberi pristan dan dibuntingkan

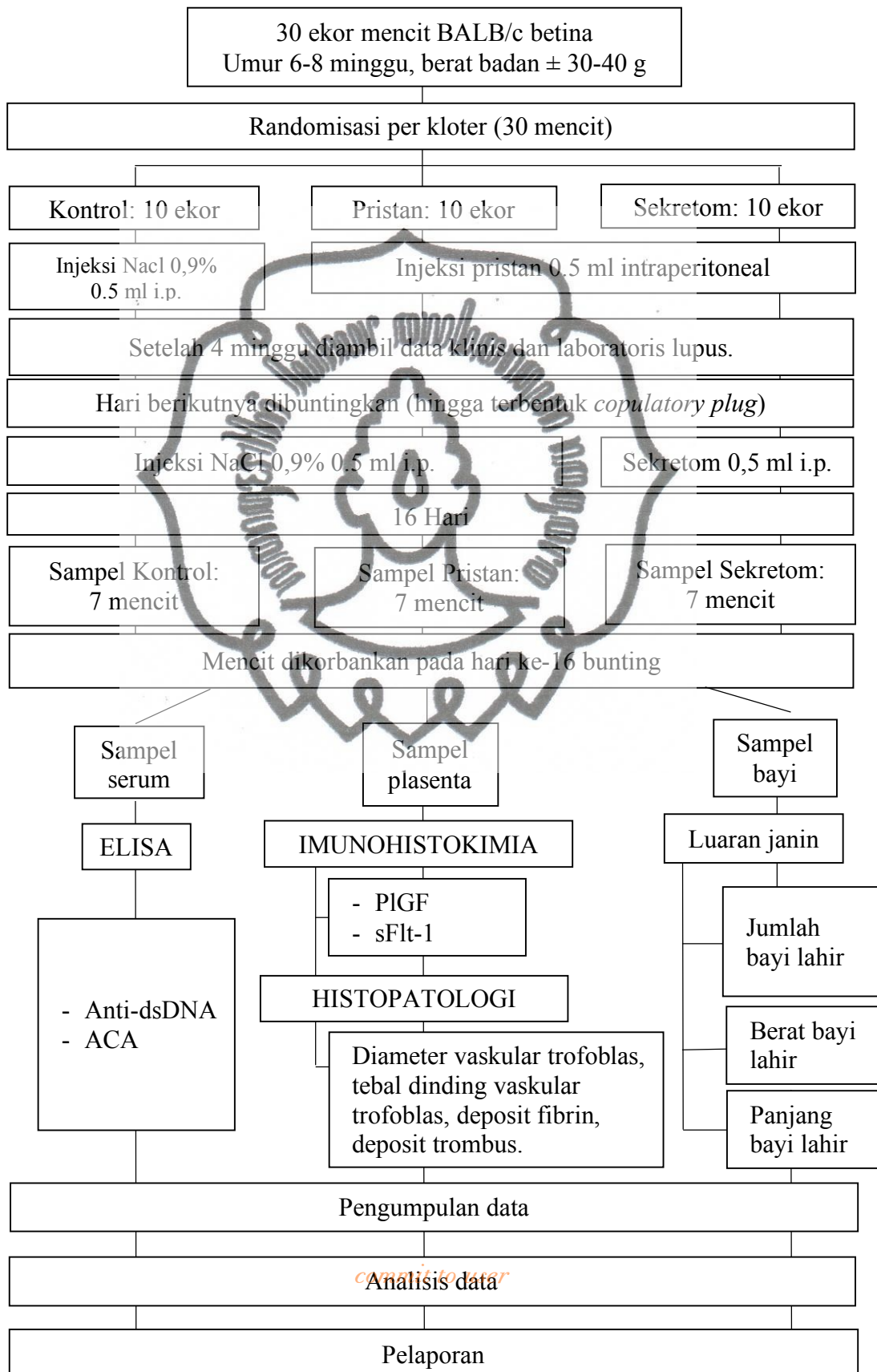
S1: Kelompok sekretom setelah diberi pristan dan dibuntingkan

K2: Kelompok kontrol diberi NaCl, dibuntingkan, diberi NaCl

P2: Kelompok pristan setelah diberi pristan, dibuntingkan, diberi NaCl

S1: Kelompok sekretom setelah diberi pristan, dibuntingkan, diberi sekretom

D. Alur Penelitian



Bagan 4.4. Alur Penelitian

E. Penjelasan Alur Penelitian

Sebanyak 30 ekor mencit betina per kloter galur BALB/c umur 6-8 minggu, berat badan 30–40 gram, mencit dipersiapkan di laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Kloter diulang hingga tercapai jumlah sampel 7 mencit sesuai kriteria penelitian. Bahan makanan mencit digunakan pakan mencit standar BR1. Kondisi lokasi penelitian disusun sesuai standar laboratorium hewan uji. Kondisi lingkungan setiap mencit seragam. Mencit kemudian dibagi menjadi 3 kelompok secara random menggunakan teknik random blok permutasi. Kelompok uji terdiri dari kelompok kontrol (K): mencit bunting normal tanpa pemberian pristan dan sekretom, kelompok pristan (P): mencit bunting dengan pemberian pristan dan tanpa pemberian sekretom, kelompok sekretom (S): mencit bunting dengan pemberian pristan dan pemberian sekretom.

Kelompok P dan S kemudian mendapatkan injeksi intraperitoneal pristan 0.5 ml sementara kelompok K mendapat injeksi intraperitoneal *phosphat-buffer saline* 0.5 ml. Empat minggu kemudian, ketiga kelompok (K, P, dan S) dilakukan penilaian klinis lupus dan pengambilan darah serum untuk penilaian anti-dsDNA serum. Hari berikutnya mencit dibuntingkan dengan tikus jantan BALB/c dengan teknik *monomating*. Sebelumnya dilakukan sinkronisasi birahi dengan PMSG dan hCG. Terjadinya kehamilan/ bunting ditandai dengan munculnya *copulatory plug*. Kelompok K dan P tidak diberi injeksi sekretom sel punca mesenkimal sedangkan kelompok S diberikan. Sekretom diberikan dalam 24 jam setelah kebuntingan.

Pada hari ke-16 masa bunting, sampel serum diambil. Pembedahan kemudian dilakukan untuk pengakhiran kehamilan. Sampel plasenta dan bayi mencit diambil untuk dilakukan analisis sesuai keperluan penelitian. Jumlah bayi mencit yang dilahirkan setiap induk dihitung untuk menentukan tingkat abortus. Panjang dan berat setiap bayi mencit diukur sesuai standar dan dicatat untuk analisis hambatan pertumbuhan janin. Sampel serum kemudian diproses dengan reagen sesuai parameter yang diteliti dengan metode ELISA yakni kadar anti-dsDNA dan ACA. Sampel plasenta diperiksa secara

imunohistokimia dan histopatologi terhadap parameter terkait.

F. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2018 sampai dengan bulan Juli 2019.

G. Tempat Penelitian

Penelitian ini dikerjakan di:

1. Laboratorium Sel Punca ProSTEM-PRODIA, Jakarta.
2. Kandang Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga sebagai tempat pemeliharaan hewan serta penelitian pada hewan uji.
3. Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pengambilan, fiksasi, dan pengeblokan jaringan plasenta; pengukuran jumlah bayi lahir hidup, penimbangan berat bayi, pengukuran panjang bayi mencit; pemeriksaan ELISA untuk pengukuran kadar serum anti-dsDNA, ACA.
4. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi sFlt-1 plasenta, ekspresi PlGF plasenta; serta pengukuran deposit fibrin vili trofoblas, pengukuran trombus vili trofoblas, pengukuran diameter arteria spiralis desidua, pengukuran tebal dinding arteria spiralis desidua.

H. Subjek Penelitian

Subjek Penelitian adalah mencit betina sub species *Mus musculus* BALB/c umur 6-8 minggu, berat badan 30–40 gram, disiapkan dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dari Breeder yang terpercaya. Mencit sebanding dengan kondisi mata bersinar, bulu tidak kusam, aktif, nafsu makan baik. Diberi makanan standar BR-1, dan lingkungan kandang yang homogen.

Penelitian pada hewan uji ini dirancang dengan memenuhi standar kriteria kriteria PREPARE (Smith *et al.*, 2018) dan ARRIVE (Kilkenny *et al.*, 2013). Kriteria tersebut meliputi kebutuhan hewan uji untuk penelitian yang tidak mungkin digantikan dengan cara yang lain, hipotesis penelitian dideskripsikan dengan jelas, desain penelitian disusun secara jelas dengan memenuhi jumlah sampel seminimal mungkin dan menghindari hewan uji yang sia-sia. Penelitian ini dilakukan setelah lulus uji etik. Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dengan nomor surat No:3.KE.167.10:2018. Persetujuan laik etik juga didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, RS Dr. Moewardi, Surakarta dengan nomor surat: No:712/EX/HIREC/2018

Daftar Cek Sesuai Dengan Panduan PREPARE (Smith *et al.*, 2018).

Topik	Daftar Cek
A. Formulasi penelitian	
1. Studi pustaka.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hipotesis yang jelas dengan luaran primer dan sekunder. ○ Memasukkan review sistematis. ○ Membuat standar pencarian pustaka yang baik. ○ Mencari model hewan uji yang paling sesuai, efektif dan efisien. ○ Memberikan rancangan penelitian yang jelas untuk menjaga reproduktibilitas penelitian untuk diulang dengan setting serupa.
2. Masalah legalitas.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Memenuhi prasyarat aturan yang berlaku mengenai penyediaan hewan uji, tempat pemeliharaan, dan tempat uji yang terstandar dan terakreditasi. ○ Mendokumentasikan semua proses yang memenuhi peraturan perundangan yang berlaku.

-
- Membuat resume penelitian.
 - 3. Masalah etik, keuntungan dan kerugian serta target akhir penelitian.
 - Mendokumentasi proses uji kelayakan etik.
 - Memenuhi *3Rs* (*replacement, reduction, refinement*) dan *3Ss* (*good science, good sense, good sensibilities*).
 - Mempertimbangkan registrasi awal dan publikasi hasil yang tidak sesuai.
 - Memastikan tidak terjadi proses yang menyakitkan untuk hewan dengan kesia-siaan (tanpa tujuan pembuktian ilmiah).
 - Menyampaikan tujuan penelitian secara jelas bila digunakan untuk pelatihan atau pendidikan.
 - Menampilkan alokasi derajat ringan-berat perlakuan bila ada.
 - Mendefinisikan objektif dari penelitian dapat dilakukan pengukuran dengan mudah dan mampu dilakukan sebelum penelitian dimulai.
 - Menjelaskan mengapa terminasi hewan uji harus dilakukan (apa kegunaannya).
 - 4. Desain penelitian eksperimental dan uji statistik.
 - Mempertimbangkan di awal kekuatan studi dan level signifikansi serta pertimbangkan kemungkinan penelitian pilot atau pendahuluan bila diperlukan.
 - Menentukan jumlah hewan uji yang dibutuhkan tanpa kesia-siaan.
 - Memilih cara randomisasi serta kriteria inklusi dan

B. Komunikasi antara peneliti dengan penyedia fasilitas uji hewan.

- 5. Objektif dan alur waktu penelitian, pendanaan, serta pembagian
 - Melakukan rapat sebelum penelitian oleh peneliti dan staf tempat pemeliharaan dan perlakuan hewan uji.
 - Pengaturan jadwal penelitian serta keperluan *commit to user* dekontaminasi alat dan pemeliharaan
-

kelompok.	<p>hewan uji setelah studi selesai dilakukan.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Mendiskusikan mengenai biaya penelitian secara detail. ○ Setiap alur penelitian dideskripsikan dengan jelas.
6. Evaluasi fasilitas.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Memeriksa fasilitas baik bangunan, kandang, pakan hewan dan sebagainya sebelum penelitian dimulai. ○ Mempertimbangkan semua risiko penelitian yang mungkin berdampak bagi peneliti maupun laboran.
7. Edukasi dan pelatihan.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Staf yang melakukan intervensi pada hewan sekaligus pemeliharannya adalah orang yang sudah kompeten untuk melakukannya.
8. Risiko kesehatan, pembuangan limbah dan dekontaminasi.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Menilai risiko mencatat akibat penelitian tersebut. ○ Teknik pengerjaan penelitian dideskripsikan dengan jelas sejak awal sebelum penelitian dimulai. ○ Mendiskusikan penanganan limbah akibat penelitian serta dekontaminasi alat.
C. Kontrol kualitas tiap komponen penelitian	
9. Substansi penelitian serta prosedur pengerjaannya	<ul style="list-style-type: none"> ○ Informasi mengenai penelitian, sebelum penelitian dimulai dilakukan dengan seelasnya. ○ Mempertimbangkan mampu laksana dari penelitian sekaligus kompetensi pelaksana penelitian.
10. Hewan eksperimental	<ul style="list-style-type: none"> ○ Menentukan bagian dari hewan uji yang dibutuhkan saja yang dijadikan sampel penelitian.
11. Karantina dan monitoring biologis.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Memikirkan kemungkinan karantina pada hewan uji ataupun manusia yang terlibat penelitian, terutama bila ada potensi yang sangat tinggi untuk penyakit menular.
12. Kandang	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kolaborasi dengan pemelihara hewan harus dilakukan secara baik. ○ Kondisi kandang makanan dan lingkungan sekitar diatur sebelum penelitian sehingga tidak akan

	mempengaruhi bias hasil akhir.
13. Prosedur eksperimental	<ul style="list-style-type: none"> o Prosedur menangkap hewan kemudian mengawinkan membiakkan dan lain sebagainya dilakukan sesuai standar yang berlaku. o Teknik bedah, teknik anastesi, teknik mengorbankan hewan uji serta teknik pengelolaan sampel dan analisis disebutkan secara jelas.
14. Cara hewan dikorbankan serta penggunaan sebagian dari jaringan dan organ yang digunakan untuk penelitian.	<ul style="list-style-type: none"> o Mengacu pada <i>guidelines</i> yang sudah ada dan terkini. o Metode primer serta emergensi telah ditetapkan sebelumnya. o Kompetensi petugas yang melakukan pengakhiran hewan uji.
15. Necropsy	<ul style="list-style-type: none"> o Pembedahan mayat hewan uji untuk diambil sampel dilakukan tanpa ada kesia-siaan dan menggunakan prosedur baku oleh petugas yang memiliki kompetensi.

I. Besar Sampel

Penelitian eksperimental ini dilakukan pada populasi (N) tidak diketahui.

Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah:

$$\left[\frac{(Z\frac{1}{2}\alpha + Z\beta) \sigma}{\delta} \right]^2 \quad (\text{Steel dan Torrie, 1960})$$

Karena σ^2 sulit ditaksir dari literatur, studi yang sama sebelumnya belum ada atau studi pendahuluan oleh peneliti, maka diasumsikan $\sigma^2 \approx \delta^2$, sehingga formulasi akhir adalah $n = (Z\frac{1}{2}\alpha + Z\beta)^2$ (Steel dan Torrie, 1960)

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 7.$$

Keterangan :

n= besar sampel masing-masing kelompok.

$Z_{1/2\alpha}$ = nilai standar normal, yang besarnya tergantung α .

Bila $\alpha = 0,05 \rightarrow Z_{1/2\alpha} = 1,645$.

Z_{β} = nilainya tergantung β yang ditentukan (berdasarkan tabel).

β = error untuk menerima H_0 , bila H_0 salah.

Bila $\beta = 0,08 \rightarrow Z_{\beta} = 0,842$

δ = selisih antara rerata variabel terapi dan kontrol yang diharapkan oleh peneliti, σ = standar deviasi, $\delta = \sigma$ sehingga dapat dinihilkan dalam formulasi dikarenakan belum ada penelitian sebelumnya sesuai equasi dari Steel dan Torrie, 1960.

Berdasar rumus didapatkan jumlah sampel minimal adalah 7 ekor. Dalam penelitian ini untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian yang diprediksikan terjadi pada 30% mencit dan 30% yang selamat tidak terjadi kebuntingan maka digunakan 10 ekor mencit untuk setiap kelompok (K, P, dan S), sehingga jumlah seluruh sampel 30 mencit yang dirandomisasi ke dalam tiga kelompok (K, P, S) setiap kloter. Kloter dilakukan pengulangan hingga didapatkan jumlah sampel minimal. Sampel minimal didapatkan pada mencit yang berhasil bunting dan tetap hidup hingga hari ke-16 kebuntingan.

J. Kelompok Penelitian

Sebanyak 30 mencit *Mus musculus* BALB/c dibagi menjadi 3 kelompok untuk setiap keloternya secara random. Kloter dapat diulang hingga minimal sampel 7 mencit perkelompok terpenuhi.

Kelompok 1:

Kelompok kontrol (K) terdiri dari 10 mencit betina *Mus musculus* BALB/c diberikan salin secara intraperitoneal sebesar 0.5 ml. Empat minggu kemudian, ketiga kelompok (K, P, dan S) dilakukan sinkronisasi birahi dengan penyuntikan 5IU *Pregnant More Serum Gonadotrophin* (PMSG), 48 jam kemudian disuntik 5IU *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG). Mencit betina lalu dikawinkan secara *monomating* yaitu satu betina dikawinkan dengan satu jantan

(umur 7 bulan dengan berat 60 gram). Diagnosis bunting didapatkan setelah 17 jam kawin dan dievaluasi adanya *copulatory plug*, yakni sumbat yang menutupi vagina mencit dari serviks hingga vulva sebagai penanda bunting. Bunting ditandai dengan *copulatory plug*. Kemudian normal saline kembali disuntikkan sebanyak 0.5 ml. Pada hari ke 16 sampel penelitian berupa serum diambil sebanyak 1 ml. Kemudian dilakukan pengakhiran kehamilan dan pengambilan sampel janin mencit dan plasenta.

Kelompok 2:

Kelompok pristan (P) terdiri dari 10 mencit betina *Mus musculus* Balb/c diberikan pristan secara intraperitoneal sebesar 0.5 ml. Pristan yang dipakai adalah *Pristane, Santa Cruz Biotechnology, USA*, dengan nomer seri CAS-1921-70-6 dan SC-281684. Proses imunologis yang mengakibatkan lupus membutuhkan waktu empat minggu. Setelah empat minggu pasca penyuntikan pristan, mencit didiagnosis lupus bila ada salah satu tanda dari mencit malas bergerak (akibat artritis lupus ringan), mata menjadi tidak bersinar, bulu tampak kusam, serta malas makan minum serta memenuhi kriteria laboratoris yaitu anti-dsDNA yang positif. Hari berikutnya, dilakukan sinkronisasi birahi dengan penyuntikan 5IU *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG), 48 jam kemudian disuntik 5IU *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG). Mencit betina lalu dikawinkan secara *monomating* yaitu satu betina dikawinkan dengan satu jantan (umur 7 bulan dengan berat 60 gram). Diagnosis bunting didapatkan setelah 17 jam kawin dan dievaluasi adanya *copulatory plug*, yakni sumbat yang menutupi vagina mencit dari serviks hingga vulva sebagai penanda bunting. Bunting ditandai dengan *copulatory plug*. Kemudian salin disuntikkan intraperitoneal sebanyak 0.5 ml. Pada hari ke 16 sampel penelitian berupa serum diambil sebanyak 1 ml. Kemudian dilakukan pengakhiran kehamilan dan pengambilan sampel janin mencit dan plasenta.

Kelompok 3:

Kelompok sekretom (S) terdiri dari 10 mencit betina *Mus musculus* Balb/c diberikan pristan secara intraperitoneal sebesar 0.5 ml seperti cara yang dilakukan pada kelompok ke 2. Empat minggu kemudian mencit didiagnosis lupus sesuai dengan cara pada kelompok kedua dan dilakukan sinkronisasi birahi dengan penyuntikan 5IU *Pregnant More Serum Gonadotrophin* (PMSG), 48 jam kemudian disuntik 5IU *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG). Mencit betina lalu dikawinkan secara *monomating* yaitu satu betina dikawinkan dengan satu jantan (umur 7 bulan dengan berat 60 gram). Diagnosis bunting didapatkan setelah 17 jam kawin dan dievaluasi adanya *copulatory plug*, yakni sumbat yang menutupi vagina mencit dari serviks hingga vulva sebagai penanda bunting. Bunting ditandai dengan *copulatory plug*. Hanya pada kelompok ini sekretom sel punca mesenkimal disuntikkan intraperitoneal sebanyak 0.5 ml. Pada hari ke 16 sampel penelitian berupa serum diambil sebanyak 1 ml. Kemudian dilakukan pengakhiran kehamilan dan pengambilan sampel janin mencit dan plasenta.

K. Variabel Penelitian

Klasifikasi variabel diukur menurut tujuan penelitian dan digolongkan dalam beberapa variabel sebagai berikut:

1. Variabel bebas: Pristan, Sekretom Sel Punca Mesenkimal

2. Variabel terikat:

- a. Kadar anti-dsDNA serum
- b. Kadar ACA serum
- c. Ekspresi PlGF plasenta
- d. Ekspresi sFlt-1 plasenta
- e. Deposit fibrin vili trofoblas
- f. Deposit trombus vili trofoblas

- g. Diameter arteria spiralis desidua
- h. Tebal dinding arteriaspiralis desidua
- i. Jumlah bayi lahir
- j. Berat bayi lahir
- k. Panjang bayi lahir

3. Variabel terkontrol:

- a. Hewan coba: jenis mencit, umur, makanan, lingkungan.
- b. Injeksi: teknik injeksi intraperitoneal pada mencit.
- c. Pengambilan serum: teknik pengambilan serum dan analisis kadar variabel uji.
- d. Pengambilan plasenta: teknik mengorbankan mencit, teknik pengambilan plasenta, pembuatan preparat, dan pembacaan.
- e. Pengambilan janin: teknik pengambilan janin, pengukuran panjang, dan berat.

L. Definisi Operasional

1. Sekretom Sel Punca Mesenkimal

Sekretom sel punca mesenkimal adalah sekresi sel punca mesenkimal yang didapatkan dari *Wharton's Jelly* tali pusat dan dikultur dalam kondisi normoksia pada medium komplet pasase ketiga dan keempat setelah konfluensi tercapai lebih dari 80%. Karakterisasi sel punca dilakukan dengan metode flowsitometri menggunakan marker CD73, CD90, dan CD105 (standar nilai lebih dari 95%) Tali pusat diambil pada janin lahir aterm melalui operasi seksio cesarea. Sekretom sel punca mesenkimal mempunyai fungsi imunomodulasi, anti-inflamasi, angiogenesis, regenerasi sel yang terutama difasilitasi oleh *Hepatocyte Growth Factor (HGF)* dan *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*. Proses pengerjaan dilakukan di laboratorium biomedik sel punca ProSTEM Prodia dengan teknik eksplan. Satuan injeksi intraperitoneal 0.5 ml. Skala nominal

2. Pristan

Pristan adalah derivat minyak yang memiliki gugus *2,6,10,14-Tetramethylpentadecane*, sehingga sering disebut dengan TMPD. Unsur alkan terpenoid pada pristan dapat menimbulkan reaksi imunologis yang menyerupai lupus. Dibutuhkan 4 minggu untuk menginduksi lupus. Kondisi imunologis lupus ini yang diharapkan memicu kerusakan plasenta saat tikus bunting sehingga luaran janin menjadi buruk. Menciptakan model lupus dengan induksi pristan adalah model lupus baku yang telah lama digunakan secara internasional hingga saat ini. Pristan pada penelitian ini menggunakan produk *Pristane, Santa Cruz Biotechnology, USA*, dengan nomor seri CAS 1921-70-6 dan SC-281684. Satuan injeksi intraperitoneal 0.5 ml. Skala nominal.

3. Kadar Anti-dsDNA Serum

Kadar anti-dsDNA serum berfungsi sebagai biomarker definitif lupus. Kadar anti-dsDNA juga berkorelasi positif dengan keparahan lupus serta tampilan klinisnya. Kadar anti-dsDNA serum diukur dengan metode ELISA. Reagen yang dipakai *Mouse Anti-dsDNA ELISA Kit, Cat No ED1464Mo, Bioassay Technology Laboratory*. Satuan: OD unit, skala: rasio.

4. Kadar ACA Serum

Kadar ACA serum berfungsi sebagai biomarker definitif sindroma antifosfolipid yang sering menyertai lupus. Kadar ACA serum yang tinggi berkorelasi terhadap kegagalan kehamilan berupa abortus dan kematian janin dalam kandungan. Kadar ACA serum diukur dengan metode ELISA. Reagen yang digunakan *Mouse Anti-cardiolipin antibody IgG ELISA Kit, Cat. No ED1464Mo, Bioassay Technology*. Satuan: OD unit, skala: rasio.

5. Ekspresi PlGF Plasenta

Ekspresi PlGF plasenta berfungsi sebagai petanda proses angiogenesis yang baik pada plasenta. Keberhasilan proses remodeling vaskular antara vili trofoblas dan arteria spiralis desidua terkait dengan tingginya ekspresi

PlGF plasenta. Penilaian ekspresi PlGF plasenta dilakukan dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal terhadap PlGF. Cara ukur dinilai secara kuantitatif, visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Ekspresi dinilai dengan melihat sebaran trofoblas dalam persen kemudian dikalikan dengan intensitas warna kromogen yang menunjukkan coklat perak. Reagen dengan *PlGF antibody [RM0010-8F09] (ab51654)*, *Abcam International*. Satuan skor IRS-Remmele. Skala: rasio

6. Ekspresi sFlt-1 Plasenta

Ekspresi sFlt-1 merepresentasikan kondisi anti-angiogenik yang menghambat plasentasi sehingga mengakibatkan abortus, kematian janin dalam kandungan, hambatan pertumbuhan janin, serta preeklamsia. Penilaian ekspresi dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal terhadap sFlt-1. Cara ukur dinilai secara kuantitatif, visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Ekspresi dinilai dengan melihat sebaran trofoblas dalam persen kemudian dikalikan dengan intensitas warna kromogen yang menunjukkan coklat perak. Reagen yang digunakan *sFlt-1 antibody (ab2350)*, *Abcam International*. Satuan: skor IRS-Remmele. Skala: rasio.

7. Deposit Fibrin Vili Trofoblas

Sampel didapatkan dengan memotong plasenta mencit pada daerah *labyrinth* dengan menggunakan mikrotom. Kemudian dilakukan pengecatan Hematoksilin-Eosin. Struktur jaringan dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Dilakukan identifikasi area vili trofoblas kemudian identifikasi sebaran fibrin berwarna merah muda seperti agar yang mengisi intraluminal. Skor didasarkan pada persentase sebaran menurut Gibson-Corley. Satuan: skor Gibson-Corley, skala: rasio.

8. Trombus Vili Trofoblas

Sampel didapatkan dengan memotong plasenta mencit pada daerah *labyrinth* dengan menggunakan mikrotom. Kemudian dilakukan pengecatan Hematoksilin-Eosin. Struktur jaringan dilihat dengan menggunakan

mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Dilakukan identifikasi area vili trofoblas kemudian identifikasi sebaran trombus berwarna merah terang bulat kecil bergerombol seperti anggur mengisi intraluminal. Skor didasarkan pada persentase sebaran menurut Gibson-Corley. Satuan: skor Gibson-Corley, skala: rasio.

9. Diameter Vaskular Arteria Spiralis Desidua

Sampel didapatkan dengan memotong plasenta pada daerah basal dengan menggunakan mikrotom. Kemudian melakukan pengecatan Hematoksin-Eosin. Struktur jaringan dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x. Dilakukan identifikasi arteria spiralis desidua, kemudian diukur diameter arteria spiralis desidua menggunakan Imaging Software 4.60 + Image Raster 3. Mikroskop menggunakan Nikon Eclipse Ci dengan Nikon DSR21 16 Megapixel perbesaran optik 400x dan digital 20x diukur luas area dan kemudian dimasukkan ke dalam formulasi *software* sehingga dihasilkan ukuran diameter. Satuan: mikrometer (μm), skala: rasio.

10. Tebal Dinding Arteria Spiralis Desidua

Sampel didapatkan dengan memotong plasenta pada daerah basal dengan menggunakan mikrotom. Kemudian melakukan pengecatan Hematoksin-Eosin. Dilakukan identifikasi arteria spiralis desidua, kemudian diukur tebal dinding arteria spiralis desidua menggunakan Imaging Software 4.60 + Image Raster 3. Mikroskop menggunakan Nikon Eclipse Ci dengan Nikon DSR21 16 Megapixel perbesaran optik 400x dan digital 20x. Satuan: mikrometer (μm), skala: rasio.

11. Jumlah Bayi Lahir

Dilakukan penghitungan terhadap jumlah janin yang dilahirkan pada hari-16 kebuntingan setelah mencit bunting dikorbankan. Nilai variabel dihitung sebagai rerata jumlah janin mencit yang dilahirkan oleh setiap mencit bunting. Satuan: ekor, skala: rasio.

12. Berat Bayi Lahir

Dilakukan penimbangan berat bayi lahir menggunakan timbangan elektronik khusus mencit produksi *Kent Scientific Corporation, USA* milik Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR. Dilanjutkan dengan penghitungan terhadap rerata berat bayi yang dilahirkan oleh tiap mencit bunting. Satuan: miligram (mg), skala: rasio.

13. Panjang Bayi Lahir

Dilakukan pengukuran panjang bayi lahir menggunakan penggaris khusus mencit milik Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR. Dilanjutkan dengan penghitungan terhadap rerata panjang bayi yang dilahirkan oleh tiap mencit bunting. Satuan: milimeter (mm), skala: rasio.

M. Cara Kerja

1. Sekretom Sel Punca Mesenkimal

Kultur tali pusat untuk menghasilkan sekretom sel punca mesenkimal dikerjakan di Laboratorium Sel Punca proSTEM Prodia, Jakarta. Bahan diambil dari tali pusat bayi lahir aterm secara seksio caesar. Langkah-langkah mendapatkan media sekresi sel punca mesenkimal adalah sebagai berikut :

- Tali pusat berasal dari donor sehat yang dilakukan seksio caesar pada umur kehamilan aterm atas indikasi obstetrik.
- Tali pusat diisolasi dengan NaCl 0.9% dan ditransportasikan segera ke laboratorium secara steril (donor telah mengisi *informed consent*).
- Teknik yang digunakan adalah metode eksplan.
- Tali pusat dipotong pada ukuran 5 cm, kemudian dibersihkan dengan 0.5% povidone iodine mengandung phosphate buffer saline pH 7.4. Dilakukan diseksi arteria dan vena umbilikal, tali pusat dibelah menjadi dua bagian menggunakan pinset dan skalpel kemudian vasa umbilikal didiseksi dan dibuang menggunakan pisau dan gunting. Jaringan tali pusat yang sudah terbebas dari vasa umbilikal dicacah

kecil 2 mm². Potongan kecil tali pusat ditanam dalam petri kultur dengan medium kultur lengkap *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*. Medium kultur mengandung komposisi yang kaya akan glukosa, 5% platelet lisat manusia, dan l-glutamin. Media kultur bebas dari serum maupun molekul yang berasal dari hewan. Antibiotik (*penicillin-streptomycin*) serta antifungi (*amphotericin B*) diberikan untuk mencegah kontaminasi. Bagian *Wharton Jelly* ditaruh menempel pada dasar sumuran dan digenangi oleh media terkondisi hingga tercelup semua bagian tetapi tidak mengambang.

- e. Petri diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C pada kondisi normoksia (CO₂ 5%). Media diganti selama 3-4 hari (setiap pasase) sampai teramati sel bermigrasi (*sprouting*) dari jaringan dan berproliferasi hingga konfluen dalam beberapa fase.
- f. Medium terkondisi sel punca setelah dipastikan konfluen lebih dari 80 persen dan hasil flowsitometri mengkonfirmasi karakter sel punca mesenkimal, maka medium fase 3 dan ke 4 digabung menjadi satu dengan sentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit dan dikoleksi.
- g. Karakterisasi sel punca dilakukan dengan metode flowsitometri menggunakan antibodi anti CD34 (standar nilai kurang dari 2 %), CD73, CD90, dan CD105 (standar nilai lebih dari 95%) sesuai dengan protokol menggunakan FASCantoll; Becton Dickinson, US.
- h. Sekretom kemudian dikoleksi dan disaring dengan menggunakan membran filter milipore 0.45 µm untuk menghilangkan debris atau kontaminan jika ada. Sekretom dapat disimpan pada suhu 2-8°C hingga proses penelitian selanjutnya.

2. Injeksi Intraperitoneal

- a. Injeksi dilakukan intraperitoneal menggunakan spuit 1cc dengan arah 30 derajat pada perut kuadran kanan dan kiri bawah.
- b. Mencit dipegang ekornya dengan lembut ditarik ke belakang hingga tangan tikus menarik besi kandang.
- c. Tengukuk mencit dipegang dengan jari telunjuk dan jempol sementara

ekor dipegang jari lain.

3. Pengambilan Serum

- a. Serum adalah serum darah mencit.
- b. Serum mencit diambil pada vena ventral ekor dengan menggunakan jarum 27 G. Serum diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung EDTA.
- c. Sampel disimpan ke dalam lemari pendingin 2-8°C.

4. Teknik Mengorbankan Mencit

- a. Mencit dikorbankan dengan prinsip: hewan mati tanpa memperlihatkan kepanikan, kesakitan dan kesukaran; hilangnya kesadaran dalam waktu yang singkat; dapat diandalkan dan dapat diulang kembali; aman untuk orang yang mengerjakannya; efek fisiologis sesedikit mungkin; sesuai dengan syarat dan tujuan penelitian; efek yang sesedikit mungkin untuk observator dan operator; pengaruh lingkungan seminimal mungkin; mudah, murah relatif bebas biaya dan peralatan mekanik; lokasi cukup jauh dari ruangan tepat pemeliharaan hewan.
- b. Pada penelitian ini teknik dislokasi servikal dipilih untuk menghindari perubahan kadar biokimia serum akibat penggunaan obat anastesi maupun agen farmakologis lain.
- c. Teknik ini dilakukan dengan cara memisahkan tengkorak dan otak dari sumsum tulang belakang dengan jalan memberikan tekanan pada bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang. Bila sumsum tulang belakang terpisah dari otak maka secara otomatis rasa sakit maupun kesadaran akan hilang dalam sekejap, sehingga hewan tidak pernah merasa sakit.

5. Pengambilan Plasenta

- a. Plasenta diambil pada hari-16 kebuntingan melalui prosedur pembedahan setelah mencit dikorbankan. Plasenta ditimbang beratnya dengan timbangan khusus dan dicatat. Satuan: miligram, skala: rasio.
- b. Plasenta kemudian difiksasi dengan formalin dan dilakukan blok parafin.
- c. Pemotongan sesuai standar dan pengecatan dilakukan secara HE.

6. Pengambilan Janin

- a. Janin diambil pada hari ke-16 melalui prosedur pembedahan setelah mencit dikorbankan.
- b. Janin dihitung jumlahnya, satuan: ekor, skala: nominal. Janin diukur beratnya dengan timbangan khusus, satuan: miligram, skala: rasio.
- c. Janin diukur panjangnya dengan penggaris khusus, satuan: mm, skala: rasio.

7. Teknik Pembuatan Preparat Histologis

- a. Proses fiksasi. Jaringan plasenta yang diambil dari mencit yang telah dikorbankan dengan teknik dislokasi servikal, difiksasi dengan formalin buffer 10% selama 15-24 jam.
- b. Jaringan dicuci dengan air mengalir.
- c. Dilakukan proses dehidrasi untuk menarik air dari jaringan dengan memasukkan jaringan kedalam etanol secara bertahap agar tidak terjadi perubahan morfologi jaringan. Alkohol dapat dipergunakan sebagai media antara dari fase air ke fase minyak. Tahap dehidrasi mulai dari konsentrasi 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 2 jam, etanol 95% selama 1 jam dan etanol absolut tiga kali masing-masing selama 1 jam.
- d. Proses penjernihan (*clearing*) dilakukan untuk mengganti dari fase air ke fase minyak. Bahan untuk penjernihan adalah *xylol*. Jaringan dimasukkan kedalam *xylol* dua kali selama masing-masing 1 jam, diikuti dengan yang ketiga selama 2 jam.
- e. Proses penanaman (*impregnation*) dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam *histosec* cair sebanyak tiga kali masing-masing selama 2 jam.
- f. Proses pengeblokan (*embedding*) dilakukan dengan pembuatan balok parafin.
- g. Balok parafin disayat setebal 5-7 μm dengan mikrotom. Sayatan jaringan ditempelkan pada gelas objek yang telah dilapisi *poly-L-lysine*.
- h. Proses pengecatan dikerjakan dengan Hematoksilin-Eosin.

8. Teknik Pemeriksaan ELISA

- a. Darah mencit diambil 1 ml dengan pengencer EDTA, disimpan maksimal 8 jam dalam suhu ruang, 48 jam dengan suhu -20°C .
- b. Tes kit berisi 12 microtiterstrip masing-masing dilengkapi dengan 8 sumur reagen yang dilapisi dengan antigen (anti-dsDNA dan ACA).
- c. Sampel serum dilarutkan 1:100 dengan buffer sampel, dan ditempatkan dalam cawan.
- d. Larutan standar dan kontrol positif diambil dengan pipet sebanyak $100\ \mu\text{L}$ kemudian dilarutkan bersama sampel serum. Campuran diaduk pelan, cawan ditutup dan inkubasi selama 30 menit dalam suhu $28-30^{\circ}\text{C}$.
- e. Sumur dicuci 3 kali dengan $300\ \mu\text{L}$ buffer larutan pencuci dan menggunakan *automated ELISA plate washer*.
- f. Sebanyak $100\ \mu\text{L}$ enzim konjugasi ditambahkan pada tiap sumur. Diaduk perlahan kemudian cawan ditutup dan inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar.
- g. Cairan diaspirasi dan sumur dicuci sebanyak 3 kali.
- h. Substrat TMB dicampurkan sebanyak $100\ \mu\text{L}$ pada tiap sumuran kemudian diaduk perlahan. Cawan ditutup dan inkubasi selama 15 menit dalam suhu kamar.
- i. Reaksi dihentikan dengan $100\ \mu\text{L}$ cairan penghenti pada semua sumuran. Pengukuran kadar dilakukan dengan *ELISA reader* pada skala absorpsi OD_{450} selama 15 menit. Satuan ukur adalah OD Unit.

9. Teknik Pewarnaan Imunohistokimia

Teknik pewarnaan imunohistokimia adalah pewarnaan imuno-peroksidase indirek dengan metode *avidin biotin complex* (ABC) tiga fase dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Dilakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium, yaitu secara bertahap dengan waktu tertentu

preparat dimasukkan kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air.

- b. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4.
- c. Jaringan diinkubasi dengan tripsin 0,125 % pada temperatur 37 °C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.
- d. Jaringan diinkubasikan dengan H₂O₂ 0,5% dalam metanol selama 30 menit untuk menghilangkan pewarnaan endogen, dibiarkan pada temperatur ruangan.
- e. Jaringan dicuci dengan air mengalir selama 1 menit, diikuti pencucian dengan akuadestilata.
- f. Jaringan ditandai dan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.
- g. Jaringan diinkubasi dengan 3% serum yang dilarutkan dalam BSA 1% selama 20 menit.
- h. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak dua kali, masing-masing selama 3 menit.
- i. Jaringan diinkubasi dengan monoklonal antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* terhadap molekul (sFlt-1 dan PlGF) dari *mice* (*Biaoassay Technology*). Monoklonal antibodi dilarutkan dengan TRIS-PBS 1:200. Untuk jaringan seluas 1 cm² diperlukan 100 µL monoklonal antibodi. Inkubasi dilakukan selama 30 menit dalam ruang lembab.
- j. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- k. Jaringan diinkubasi dengan antibodi primer yaitu antibodi *anti murine* yang telah dibiotinisasi (Dako Kit). Lama inkubasi 30 menit.
- l. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- m. Jaringan dicuci dengan streptavidin-biotin peroksidase (Dako Kit) selama 30 menit.
- n. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.

- o. Jaringan diinkubasi dengan substrat (Dako Kit) sampai timbul warna coklat pada jaringan, selama ± 15 menit.
- p. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- q. Jaringan diwarnai dengan hematoksin.
- r. Jaringan dicuci dengan air mengalir.
- s. Jaringan ditutup dengan kaca penutup (*deck glass*) dan lem dengan entelan.
- t. Dilihat ekspresi molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan terlihat berwarna coklat perak di bawah mikroskop cahaya. Sel yang positif dihitung dalam distribusi dan intensitas.
- u. Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif.

N. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Analisis normalitas data dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk dan Box-Plots serta uji homogenitas varians dengan Levene's test.
2. Analisis komparatif numerik. Data yang menyebar normal dan homogen, maka digunakan uji ANOVA-F pada taraf kemaknaan $\alpha=0,05$ untuk mengetahui efek pemberian sekretom sel punca mesenkimal. Dilanjutkan dengan *multiple comparison test* dengan menggunakan *Least Significant Difference (LSD) Post-Hoc test* untuk mengetahui kelompok-kelompok yang berbeda.

Jika data hasil penelitian berdistribusi normal namun varian tidak homogen, maka digunakan uji ANOVA-Welch pada taraf kemaknaan $\alpha=0,05$ untuk mengetahui efek pemberian sekretom sel punca mesenkimal. Dilanjutkan dengan Games-Howell Post-Hoc test untuk

mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna.

Apabila distribusi data tidak normal maka digunakan uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui signifikansi beda antara dua kelompok untuk tiap kelompok. Komparasi dilakukan terhadap setiap variabel tergantung pada kelompok K, P, dan S.

