

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental analitik laboratoris dengan design pre-post test dan pengulangan sampel dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan serta 2 kali pengamatan. Data hasil penelitian berupa data rasio kadar biomarker BMPR2, VE-Cadherin, Caspase3, dan TNF- α dari metode pemeriksaan ELISA bahan supernatan lisis sel.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Mei 2018 – Maret 2020 di beberapa laboratorium sebagai berikut :

1. Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta: kultur sel punca ASI media terkondisi hipoksia dan non-hipoksia,
2. Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada : pemeriksaan karakteristik penanda permukaan sel punca mesenkimal menggunakan flow cytometry metode FACS.
3. Laboratorium Bioteknologi Dermama Jakarta: pemeriksaan kadar kuantitatif protein dari sekretom sel punca ASI hipoksia dan non-hipoksia, lisis sel punca ASI hipoksia dan non-hipoksia, preparasi protein sampel untuk pemeriksaan LC-MS/MS.
4. Laboratorium Institut Pertanian Bogor: pemeriksaan LC-MS/MS untuk identifikasi proteomik sekretom sel punca ASI hipoksia dan non-hipoksia.
5. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta: kultur primer sel endotel dari HUVEC, perlakuan hipoksia serta tindakan intervensi pemberian sekretom pada media kultur, pemeriksaan ELISA kadar biomarker BMPR-2, VE-Cadherin, Caspase-3, TNF- α

C. Sampel Penelitian

Sel punca mesenkimal didapatkan melalui isolasi sel Air Susu Ibu (ASI) pada media kultur sel punca yang bebas serum (media spheroid). Wanita yang menyumbangkan ASI merupakan penduduk asli Indonesia yang menyusui pada masa 1 bulan pertama pasca persalinan. Pengambilan ASI dilakukan pada pagi hari sebanyak 50-200 ml setiap wanita penyumbang ASI diproses paling lama 3 jam setelah diperas. Sel endotel pulmonal ditumbuhkan dari kultur primer dengan mengambil sampel sel endotel *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (HUVEC). Tali pusat diambil dari persalinan cukup bulan secara normal ataupun bedah sesar tanpa penyulit gangguan pembuluh darah ibu dan janin hidup. Tali pusat segar dipotong sepanjang 20 cm dan ditampung dalam media berisikan cairan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan diproses maksimal 2 jam setelah persalinan (Dal Monte et al, 2011).

1. Kriteria Restriksi

a. Kriteria Inklusi

Wanita penyumbang ASI dengan masa laktasi < 1 bulan. Sesuai penelitian sebelumnya kandungan sitokin, faktor pertumbuhan dan sel progenitor tertinggi pada kolostrum (Margorzata et al., 2017). Wanita penyumbang ASI dengan usia kehamilan cukup bulan yang tidak memiliki kontraindikasi menyusui.

b. Kriteria Eksklusi

Wanita penyumbang ASI tidak boleh mengalami salah satu hal berikut diantaranya abses kelenjar mammae, gangguan hemolisis / DIC, terinfeksi HIV/Hepatitis B/Hepatitis C/Sepsis, dan tidak memiliki penyakit keganasan hematologi.

c. Kriteria Drop-out

Bila setelah pengambilan sampel wanita penyumbang dinyatakan terinfeksi atau menderita salah satu penyakit dieksklusi dari penelitian ini.

2. Besar sampel

Sampel pendonor ASI adalah 6 orang @ 50-200 ml, dimana seluruh ASI dicampur menjadi satu dan diisolasi dengan media terkondisi kultur sel punca untuk mendapatkan jumlah sel punca ASI yang memadai. Masing-masing kelompok perlakuan *in vitro* terdiri dari tiga sampel pengulangan (*triplicate*). Sampel pendonor tali pusat yang dibutuhkan hanya 1 orang dengan tali pusat segar sepanjang 20 cm yang dimasukkan dalam media PBS untuk selanjutnya ditumbuhkan dalam media kultur sel endotel sebanyak < 5 pasase sebelum perlakuan sehingga didapatkan jumlah sel yang memadai. (Dal Monte *et al*, 2011)

3. Teknik sampling

Sampel diambil dengan teknik *purposive sampling*, yaitu pengambilan sampel pendonor ASI dengan cara mengambil anggota populasi yang ada atau tersedia. Begitu pula untuk sampel pendonor tali pusat juga diambil dari populasi yang tersedia.

D. Rancangan Penelitian

Tahapan uji intervensi sekretom sel punca ASI:

(Laboratorium Dermama untuk LC-MS/MS):

1. Sekretom dari sel ASI dengan hipoksia (72 jam)
2. Sekretom dari sel ASI tanpa hipoksia
3. Sel ASI yang dilakukan lisis sel tanpa hipoksia
4. Sel ASI yang dilakukan lisis sel dengan hipoksia (72 jam)

Penyimpanan pada suhu -80°C , untuk:

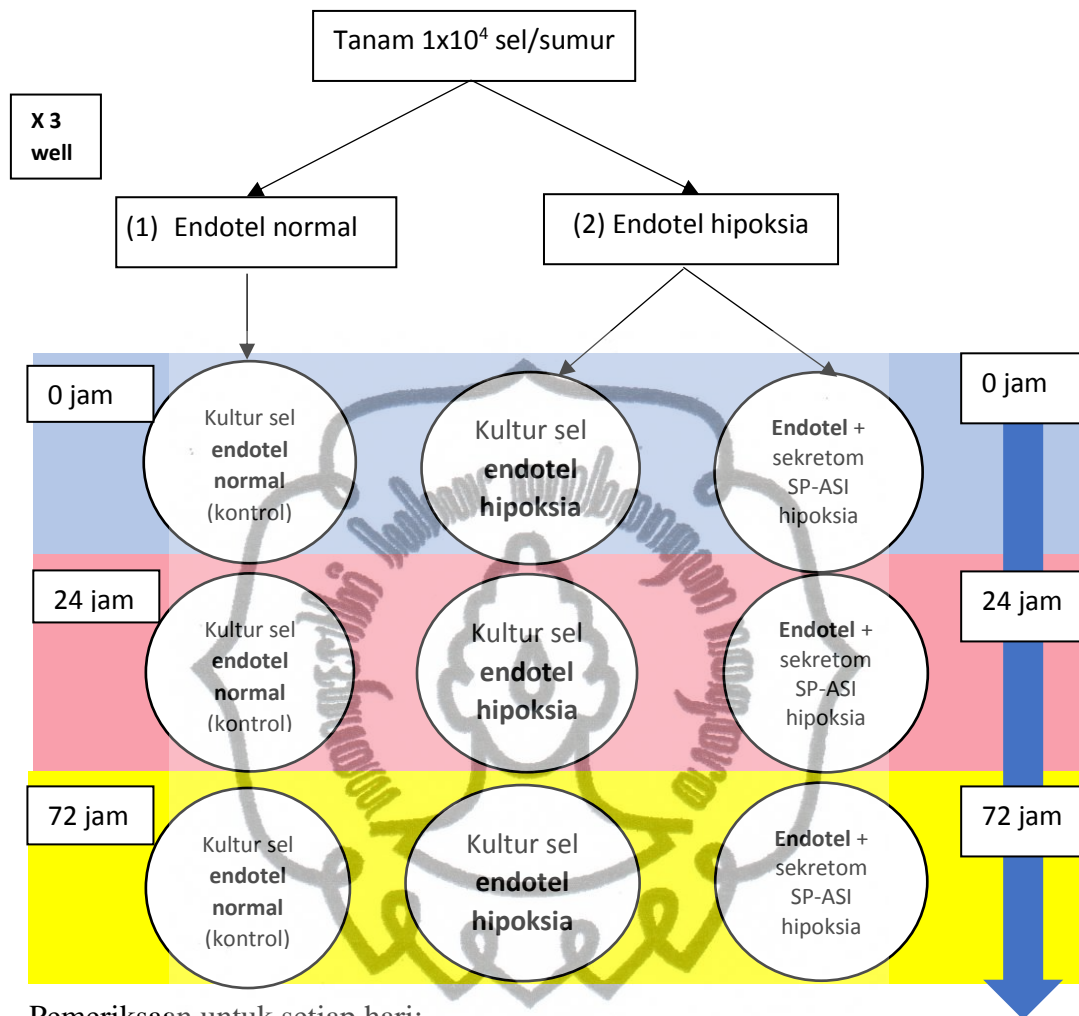
Sekretom SP-ASI hipoksia (A)

Sekretom SP-ASI tanpa hipoksia (B)

Endotel yang digunakan sbg endotel paru yaitu: HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) → kultur sel hingga tumbuh, kemudian dibagi:

1. Well dengan endotel normal
2. Well dengan endotel hipoksia

commit to user



Pemeriksaan untuk setiap hari:

0 jam (Well 1, 2):

- Foto sel
- Hitung viabilitas sel

24 jam (Well 1):

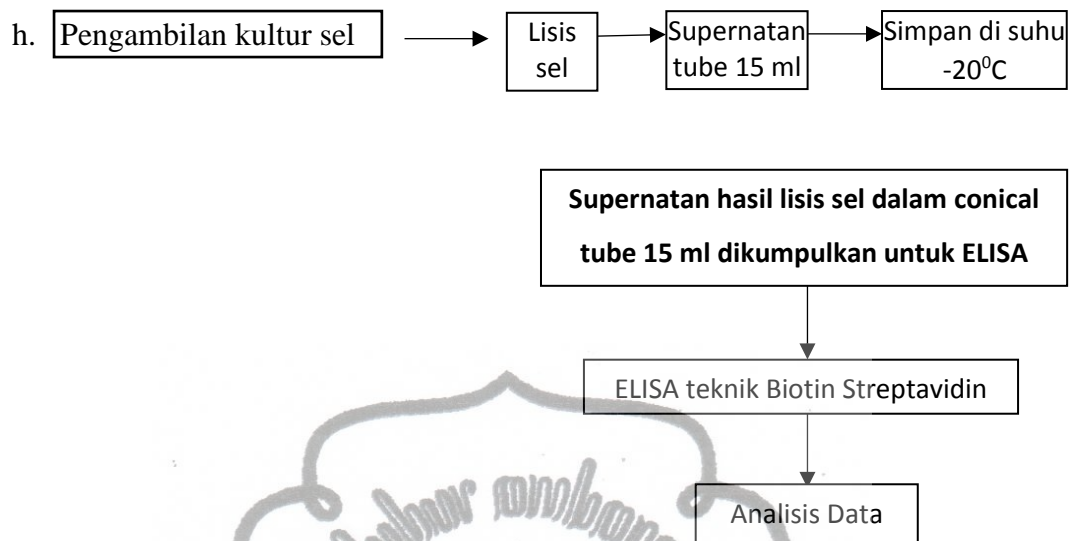
- Foto sel
- Hitung viabilitas sel

e. Pengambilan kultur sel → Lisis sel → Supernatan tube 15 ml → Simpan di suhu -20°C

72 jam (Well 2):

- Foto sel
- Hitung viabilitas sel

commit to user



Gambar 3.1. Rancangan penelitian

Sampel ASI yang didapatkan dari partisipan dijadikan satu untuk dilanjutkan dengan isolasi sel punca dari ASI. Sel isolasi kemudian dilakukan karakterisasi sel punca mesenkimal menggunakan FACS dengan marker CD44, CD73, CD90, dan CD 105 (Tang *et al.*, 2019). Sel yang secara histologis memiliki karakter sel punca kemudian dikultur dalam medium bebas serum FBS (media *spheroid*). Kultur sel punca ini kemudian dibedakan menjadi kelompok kultur sel dengan kondisi normoksia (1) dan kondisi hipoksia (chamber bertekanan 1% O₂, 10% CO₂, dengan suhu 37°C) yang diinkubasi selama 72 jam (2).

Medium yang berisi sel punca ASI dilakukan subkultur sebanyak 3 pasase dengan rentang waktu tumbuh 48-72 jam kemudian sekretomnya dipisahkan dengan sentrifugasi, sehingga dapat diambil supernatannya yang selanjutnya disebut isolat sekretom sel punca ASI pada medium spheroid (SP-ASI-MS) hipoksia (1) dan normoksia (2). Isolat sekretom sel punca ASI lalu dilakukan uji *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) untuk mengetahui analisis proteomik beserta kadarnya dan dibandingkan antara sekretom SP-ASI hipoksia dengan normoksia.

Kultur primer sel endotel dari vena umbilikalis (HUVEC) ditanam dalam T-flask 75 medium DMEM komplit dalam inkubator bersuhu 37°C

dengan kadar O₂ 21% dan CO₂ 5% selama 72 jam dan dilakukan subkultur hingga mencapai 80-90% konfluensi seluler. Kemudian sel kultur dipindahkan dalam plate sumur isi 12 dikondisikan hipoksia dengan menyimpan dalam chamber bertekanan dengan kadar O₂ 1% dan CO₂ 10% bersuhu 37°C selama 24 jam agar sel endotel mengalami *remodelling* menyerupai patofisiologi disfungsi endotel. Kondisi hipoksia sel kultur endotel dibuktikan dengan pemeriksaan kadar ekspresi gen HIF-1 α secara imunohistokimia untuk mendapatkan hasil semikuantitatif.

Kultur sel diberi sekretom sel punca ASI hipoksia setelah mediumnya dikondisikan hipoksia selama 24 jam dan ditumbuhkan kembali pada inkubator awal dalam plate selama 24-72 jam untuk menilai respon pemberian sekretom sel punca ASI terhadap viabilitas sel, hitung jumlah sel, dan kadar protein intraseluler serta ekstraseluler. Pada masing-masing kelompok ini kemudian dilakukan pengujian secara kuantitatif dengan teknik ELISA Biotin-Streptavidin terhadap kadar biomarker BMPR2, VE-Cadherin, Caspase3, dan TNF- α . Nilai hasil uji akan dilakukan analisa data secara deskriptif dan komparasi sederhana.

E. Jenis Variabel Penelitian

a. Identifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini yaitu sel endotel vena umbilikalis (HUVEC-4) hipoksia yang merupakan rekombinan dari endotel pembuluh darah pulmonal yang mengalami disfungsi. Kelompok akan dibagi menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan sel endotel kondisi hipoksia akan diberi sekretom SP-ASI-MS hipoksia. Sedangkan kelompok kontrol sel endotel rekombinan yang dikultur dalam media DMEM pada kondisi normoksia dan hipoksia. Viabilitas sel diukur secara kualitatif menggunakan foto sel dari mikroskop inverted serta hitung jumlah

sel. Penanda permukaan sel punca ASI media terkondisi diperiksa dengan metode FACS dengan hasil berupa persentase yang menunjukkan sel punca mesenkimal apabila marker CD44, CD73, CD90, CD105 yang terkandung > 90%. Sel endotel HUVEC dilakukan hitung sel secara manual dalam kamar hitung Neubauer dengan hasil terukur dalam satuan jumlah sel/ml. Kadar protein diukur secara kuantitatif dari lysate cell dan supernatan menggunakan metode Bradford yang mewakili kadar protein intraseluler dan ekstraseluler dengan satuan $\mu\text{g/ml}$. Variabel ini menggunakan skala numerik.

b. Variabel Terikat

1) *Bone Morphogenic Protein Receptor type 2* (BMPR2)

BMPR2 merupakan reseptor untuk protein *bone morphogenic-9* (BMP-9) yang pengaktifan pada jalur ini pada PAEC akan memiliki efek anti-apoptosis, integritas lapis tunggal, dan menghambat sintesis matriks ekstraseluler (ECM). BMPR2 merupakan turunan protein golongan TGF- β yang akan diperiksa secara kuantitatif. Uji kuantitatif dilakukan dengan ELISA teknik Biotin Streptavidin menggunakan reagen Human BMPR2/ Bone Morphogenetic Protein Receptor type-2 (Catalog No.E0016h) produksi Wuhan EIAab Science Co., LTd. Reagen ini memiliki spesifisitas terhadap Human BMP reseptor tipe-2 alami dan rekombinan dengan nama sinonim Bone morphogenetic protein receptor type-2 (BMPR-2), Bone morphogenetic protein receptor type II (BMPR-II). Hasil dinyatakan dalam satuan ng/ml dengan rentang kadar deteksi antara 0.156 – 10 ng/ml sensitivitas pembacaan hingga 0.082 ng/ml. Variabel ini menggunakan skala numerik.

2) *Vascular Endothelial Cadherin* (VE-Cadherin)

VE-Cadherin merupakan protein yang berfungsi menjaga integritas monolayer sel endotel. Peningkatan jumlah protein ini

menunjukkan fungsi integritas endotel yang baik. Protein ini diukur secara kuantitatif menggunakan metode ELISA teknik Biotin Streptavidin dengan reagen Human CDH5/Cadherin-5 (Catalog No. E1366h) produksi Wuhan EIAab Science Co., LTD. Reagen ini memiliki spesifisitas terhadap Human Human Cadherin-5 alami dan rekombinan dengan nama sinonim Cadherin-5, 7B4 antigen, Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin). Hasil dinyatakan dalam satuan ng/ml dengan rentang kadar deteksi antara 0.156 – 10 ng/ml sensitivitas pembacaan hingga 0.1 ng/ml. Variabel ini menggunakan skala numerik.

3) *Cysteine Aspartic Protease 3 (Caspase3)*

Caspase3 merupakan endoprotease yang berfungsi sebagai efektor dengan membelah berbagai substrat yang mati dan menyebabkan perubahan morfologi dan biokimia yang tampak pada sel yang mengalami apoptosis. Protein *Caspase3* diukur secara kuantitatif menggunakan metode ELISA teknik Biotin Streptavidin dengan reagen Human CASP-3/Caspase-3 (Catalog No.E0626h) produksi Wuhan EIAab Science Co., LTD. Reagen ini memiliki spesifisitas terhadap Human Caspase3 alami dan rekombinan dengan nama sinonim Caspase3 (CASP-3), SREBP cleavage activity 1 (SCA-1), protein Yama, Apopain, Cystein protease CPP32 (CPP-32). Hasil dinyatakan dalam satuan ng/ml dengan rentang kadar deteksi antara 0.312 – 20 ng/ml dan sensitivitas pembacaan hingga 0.078 ng/ml. Variabel ini menggunakan skala numerik.

4) *Tumor Necrotic Factor Alpha (TNF- α)*

TNF- α merupakan mediator inflamasi yang meningkat saat terjadi jejas sel oleh sebab apapun. Protein ini diukur secara kuantitatif menggunakan metode ELISA teknik Biotin Streptavidin dengan reagen Human Tumor Necrosis Factor (Catalog No.E0133h) produksi Wuhan EIAab Science Co. Ltd. Reagen ini memiliki spesifisitas terhadap Human TNF- α alami dan rekombinan dengan

nama sinonim TNF-alpha, Cachectin, Tumor necrosis factor ligand superfamily member 2 (TNF- α). Hasil dinyatakan dalam satuan pg/ml dengan rentang kadar deteksi antara 15.6 – 1000 pg/ml sensitivitas pembacaan hingga 1.56 ng/ml. Variabel ini menggunakan skala numerik.

5) *Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha* (HIF-1 α)

HIF-1 α merupakan protein faktor transkripsi yang dikode dari gen HIF-1A. Protein ini mengatur ulang proses transkripsi seluler sebagai respon atas kondisi hipoksia patologis pada gangguan vaskularisasi, proses angiogenesis, metabolisme anaerob jaringan, dan kesintasan sel yang berhasil bertahan hidup. Protein ini diukur secara kuantitatif menggunakan metode imunohistokimia (IHC) dengan reagen HIF1 α rabbit polyclonal antibody (Catalog No. Fnab03859) produksi Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. Reagen ini merupakan IgG yang memiliki spesifisitas terhadap antigen HIF-1 α alami dan rekombinan. Hasil dinyatakan dalam satuan persen dengan rentang kadar deteksi antara 0 – 100% sensitivitas pembacaan hingga 1%. Kadar purifikasi diperoleh bila hasil pembacaan IHC $\geq 95\%$ yang terbaca oleh alat SDS-PAGE. Variabel ini menggunakan skala ordinal.

c. Variabel perancu

1) Sterilitas alat dan bahan dari kontaminan selama proses penelitian

Higienitas alat dan bahan sangat penting bila melakukan penanaman kultur sel. Kontaminan dari udara luar sangat berpengaruh terhadap keberhasilan penelitian. Media kultur sel juga telah dilengkapi dengan antibiotika dan anti-fungal untuk menekan pertumbuhan mikroba komensal.

2) Jenis media kultur sel

Media kultur sel pada pasase pertama diberikan lengkap mulai dari media standar, suplemen, nutrisi yang berisi serum FBS 10%. Pada pasase berikutnya hanya diberikan media kultur standar saja untuk

menjamin media bebas serum (media spheroid) sehingga sekresi protein lebih maksimal.

3) Suplemen faktor pertumbuhan yang diberikan

Sel punca ASI diberikan suplemen bFGF sebagai faktor pertumbuhan penting yang merangsang proliferasi sel punca. Sedangkan rekombinan HUVEC diberikan suplemen EGF untuk merangsang proliferasi sel endotel.

4) Durasi penggantian media kultur sel

Media kultur diganti setiap 48-72 jam untuk menghindari kejenuhan dan kontaminasi terhadap sel di dalamnya.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 3.1. Definisi operasional

Parameter	Definisi	Metode	Satuan	Skala Data
Sel punca ASI (SP-ASI)	sel pluripoten yang berasal dari jaringan epitelial kelenjar mammae yang mampu memperbaiki diri dan berdiferensiasi menjadi sel progenitor	Hitung manual kamar hitung Neubauer hemocytometry	sel/ml	Numerik rasio
Viabilitas sel endotel HUVEC-4	Kembalinya proses keseimbangan metabolisme dalam suatu homeostasis antara faktor pro- dan anti-oksidan, vasodilator dan vasokonstriktor,	Viabilitas foto sel di mikroskop inverted	Kualitatif (kepadatan, ukuran dan bentuk sel, koneksi antar sel)	Kategorikal

Parameter	Definisi	Metode	Satuan	Skala Data
	mediator pro- dan anti-inflamasi, serta faktor pro dan anti-trombotik.			
Kadar protein HUVEC-4	Kandungan jumlah total protein dalam <i>lysate cell</i> (mewakili protein intraseluler) dan supernatant (mewakili protein ekstraseluler)	Metode Bradford	$\mu\text{g/ml}$	Numerik rasio
BMPR2	Reseptor protein <i>bone morphogenic-9</i> (BMP-9) yang memiliki efek anti-apoptosis, integritas lapis tunggal, dan menghambat sintesis matriks ekstraseluler	ELISA	ng/ml	Numerik rasio
VE-Cadherin	Protein yang berfungsi menjaga integritas monolayer sel endotel	ELISA	ng/ml	Numerik rasio
Caspase3	Endoprotease yang berfungsi sebagai efektor yang menyebabkan apoptosis sel	ELISA	ng/ml	Numerik rasio
TNF- α	Mediator inflamasi yang meningkat saat <i>submit to user</i>	ELISA	pg/ml	Numerik rasio

Parameter	Definisi	Metode	Satuan	Skala Data
	terjadi jejas sel			
HIF-1 α	Protein faktor transkripsi kondisi hipoksia patologis yang melibatkan gangguan vaskularisasi, proses angiogenesis, metabolisme anaerob, dan kesintasan sel	Imunohisto kimia (IHC)	%	Ordinal

G. Prosedur Penelitian

Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

- a. Alat pemompa ASI
- b. Ice box transport
- c. Conical tube 50 ml
- d. Sentrifuge dengan rotor gravitasi maksimal 8000G (Thermo-Herraus)
- e. *Petridish* 35 mm steril
- f. T-Flask 75
- g. *Neubauer hemocytometer*
- h. *Well-plate* 12 (1% gelatin-coated)
- i. *Ultra low binding plates* (Co-Star, Corning, Tewksbury, USA, <http://www.corning.com>)
- j. Vortex
- k. Pipet dan mikropipet
- l. Tip pipet
- m. Laminar flow
- n. Inkubator CO₂ (Thermo Scientific)

commit to user

- o. Mikroskop inverted dengan kamera (Olympus)
 - p. Lemari pendingin suhu -80°C (Ependorf)
 - q. Tangki nitrogen cair (Thermo Scientific)
 - r. Chamber hipoksia kapasitas 10 liter (Stemcell Technology)
 - s. Microplate ELISA Reader dengan filter 450 nm
 - t. GLP Kit
 - u. Tabung oksigen bertekanan 1% O_2 dan 10% CO_2
 - v. Flow Cytometry FACS Calibur Becton Dickison (BD)
 - w. Beadbug Homogenizer Microtube
2. Bahan
- a. Air Susu Ibu (ASI)
 - b. Tali pusat segar
 - c. Media DMEM low glucose (Gibco)
 - d. MammocultTM medium
 - e. Larutan Nitrogen cair
 - f. Non-essential amino acid (NEAA) (Gibco)
 - g. bFGF 10 $\mu\text{g/mL}$
 - h. VEGF 5 $\mu\text{g/mL}$
 - i. EGF 5 $\mu\text{g/mL}$
 - j. *Typsin* EDTA 0.25% (Gibco)
 - k. Aquades
 - l. Antibiotik 1% (100 IU/ml Penisilin dan 100 $\mu\text{g/mL}$ Streptomisin)
 - m. 0.5% Amphotericin B-Fungizone (Gibco)
 - n. Larutan etanol 96%
 - o. Heparin (6 $\mu\text{g/mL}$)
 - p. Hydrocortisone 15 μL
 - q. 1% L-Glutamine
 - r. 10% Human Proliferation Factor
 - s. Kit diferensiasi sel punca mesenkimal : CD-44 (PE), CD-73 (APC), CD-90 (FITC), CD-105 (PerCP cy5.5)

- t. Immunostaining kit (BMPR-2, VE-Cadherin, Caspase-3, TNF- α) : paraformaldehyde, PBS, cytopins, antibodi primer, blocking buffer, Tween-20, antibodi sekunder
- u. Media Dako Cytomation Fluor
- v. EIAab Human BMPR-2, Cadherin-5, Caspase-3, TNF- α , HIF-1A ELISA Kit, dijalankan sesuai protokol kit (www.eiaab.com)
- w. Larutan PBS PH 7,4 (Gibco)
- x. 20% *Fetal bovine serum* (FBS) (Invitrogen)
- y. Larutan buffer lysis

Penelitian ini dikerjakan terbagi menjadi 5 tahapan :

Tahap 1. Kultur dan Karakterisasi sel punca mesenkimal dalam isolat sel ASI

1. Pengumpulan Sampel ASI

Seluruh peserta yang menyumbangkan ASI dan tali pusat akan dimintai *informed consent* terlebih dahulu. Alat pemompa ASI manual digunakan untuk memperoleh ASI perah. Pengambilan ASI dilakukan pada pagi hari bangun tidur. Partisipan wanita menyusui yang diambil ASI yaitu sebanyak 6 orang, dengan volume yang didapatkan dari masing-masing partisipan sebanyak 50-200 ml ASI. ASI yang telah didapatkan kemudian ditransfer ke laboratorium secepatnya dengan metode aseptik menggunakan tabung FalconTM (BD, Heidelberg, Germany). Jarak antara pengumpulan dan pemrosesan tahap selanjutnya tidak lebih dari 3 jam (Fan et al., 2010, Hassiotou et al., 2012, Kaingade et al., 2016).

2. Isolasi Sel Punca ASI

ASI yang didapatkan kemudian didilusi dengan *phosphate buffered saline* (PBS) steril (pH 7.4, Gibco, Grand Island, NY, <http://www.invitrogen.com>) dengan perbandingan 1:1 sehingga volumenya menjadi dua kalinya. Kemudian disentrifugasi pada putaran 3000rpm selama 20 menit pada suhu 20°C. Lapisan lemak dan lapisan skim cair pada ASI dibuang, dan pellet sel kemudian dicuci tiga kali

menggunakan PBS. Pellet sel kemudian diresuspensi dalam 20% *fetal bovine serum* (FBS, Certified, Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) dalam media khusus sel punca Mammocult™ (StemCell Technology, USA). Konsentrasi total sel dan viabilitas tiap sampel kemudian dihitung menggunakan *Neubauer hemocytometer* dengan pewarnaan *Trypan Blue* (Hassiotou *et al.*, 2012).

3. Kultur Sel Punca ASI Media Spheroid

Sel yang berasal dari ASI ditanam dalam *petridish* yang dilapisi 1% *gelatin* dengan densitas antara 10^4 hingga 10^5 per 35 mm dish. Sel diinkubasi pada konsentrasi O_2 21%, CO_2 5% dan suhu $37^\circ C$, dengan penggantian media sel setiap 48-72 jam. Setelah hari ke-5 kultur, setiap koloni sel dibagi dan direlokasi ke *dish* baru dan disubkultur di medium baru, dengan tujuan membuat turunan sel kultur sekunder dan tersier. Kemudian, untuk kultur sel *spheroid*, digunakan *ultra low binding plates* untuk pembiakan sel dengan media DMEM/F12, KOSR (*knockout serum replacement*) 10%, *non-essential amino acid* 1%, bFGF $10 \mu g/mL$, dan Penisilin/Streptomisin 1%, yang ditambahkan pada *plates* tanpa penggunaan FBS untuk menjamin media bebas serum. Untuk passaging sel, sel diberikan *typsin* (Gibco) selama 5 menit pada suhu $37^\circ C$ dengan perbandingan 1:2 (Hosseini *et al.*, 2014). *Passaging* sel keempat dilakukan di dua media berbeda yang dibagi menjadi 1) media dengan kondisi normal, dan 2) media dengan kondisi hipoksia.

4. Karakterisasi Isolat Sel Punca ASI menggunakan *Flowcytometry*

Kultur sel punca yang diisolasi dari ASI kemudian dikarakterisasi dengan FACSCalibur™ Becton Dickison (BD) menggunakan metode *Magnetic Associated Cell Sorting*. Sejumlah 1×10^5 sel dilabel metode enzimatis dengan antibodi terkonjugasi fluorochrome. Sel kemudian diinkubasi dengan 100 μl allophycocyanin untuk memeriksa CD-105 dan CD-73 (Myltenill Biotech), serta 100 μl fluorescein isothiocyanate untuk CD-44 dan CD-90 (Myltenill Biotech) sebagai *blocking reagent* FCR. Sebanyak 100 μl microbeads CD-105, CD-73, CD-44, dan CD-90 ditambahkan

lalu dilakukan homogenisasi kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 4°C. Setelah itu dicuci kembali sampai bersih dan ditambahkan 1 ml buffer disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit kemudian supernatan diaspirasi hingga bersih. Supernatan diresuspensi lagi dengan 500 µl buffer lalu dimasukkan dalam kolom magnetik yang dipasang dalam *magnetic stand* untuk memperoleh sel dengan marker positif. Sel punca yang terlabel akan menempel pada kolom kemudian dicuci dengan larutan buffer sebanyak 3 kali. Suspensi sel dengan marker negatif akan masuk ke dalam tabung pengumpul selanjutnya magnet dilepas lalu kolom dicuci kembali dengan buffer untuk melepas sel punca marker positif. Data dianalisis menggunakan Cell Squest Software (Kaingade et al., 2016).

Tahap 2. Isolat sekretom sel punca ASI hipoksia dan non-hipoksia

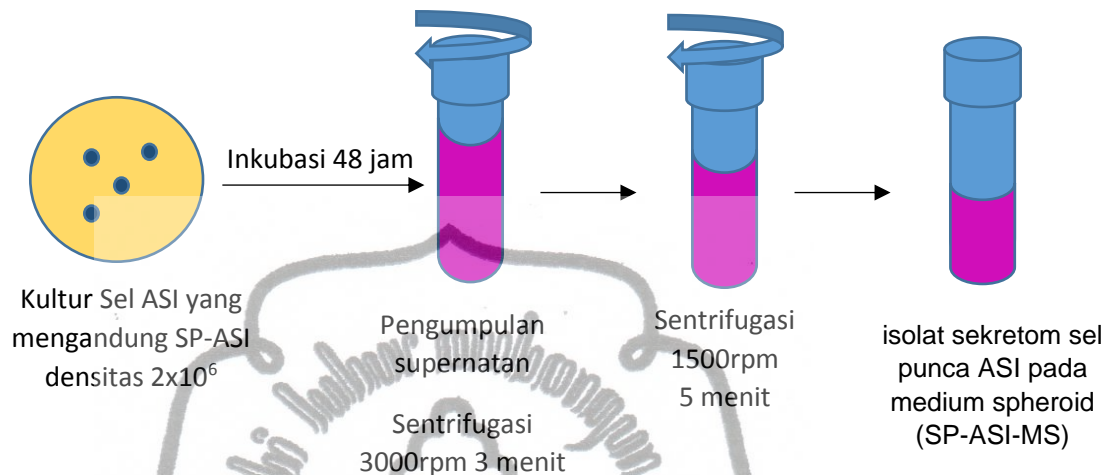
5. Perlakuan Hipoksia Sel Punca ASI Media Spheroid

Untuk menciptakan lingkungan hipoksia pada sel diinkubasi menggunakan chamber hipoksia yang diberikan tekanan O₂ 1%, CO₂ 10% selama 72 jam. Sel punca ASI yang akan diperlakukan hipoksia dicuci terlebih dahulu dengan PBS, kemudian ditempatkan pada media DMEM yang baru dan diinkubasi dalam chamber bersuhu 37°C.

6. Isolasi Sekretom Sel Punca ASI

Isolasi sekretom ini dilakukan pada pasase keempat dibagi menjadi dua kelompok yaitu 1) kultur sel ASI pada media dengan kondisi normoksia, dan 2) kultur sel ASI pada media dengan kondisi hipoksia. Sel ASI yang berasal dari kultur primer ditanam pada flask dengan densitas 2×10^6 . Kultur sel kemudian dicuci tiga kali dengan PBS dan kembali dikultur dalam DMEM selama 48 jam. Supernatan dari sel kemudian ditampung dan disentrifugasi pada 3000rpm selama 3 menit pada suhu 4°C dan disentrifugasi kembali pada 1500rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan akhir berupa isolat sekretom sel punca ASI pada medium

spheroid (SP-ASI-MS) kemudian dapat disimpan pada suhu -80°C untuk digunakan pada perlakuan sel endotel. (Lo Sicco *et al.*, 2018)



Gambar 3.2. Alur isolasi sekretom sel punca ASI pada medium spheroid (SP-ASI-MS)

Tahap 3. Pemeriksaan proteomik dengan teknik LC-MS/MS secara kualitatif dan kuantitatif dari sekretom sel punca ASI

7. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Pemeriksaan LC-MS/MS dilakukan melalui 3 tahapan *reduction*, *alkylating* dan *ingestion* menggunakan alat UHPLC Vanquish Tandem Q-Exactive Plus Orbitrap HRMS ThermoScientific. Peptida sebanyak 5 μl disuntikkan langsung pada reagen Accucore Phenyl Hexyl $100 \times 2.1 \text{ mm}$ (ThermoScientific, $2.6 \mu\text{m}$). Peptida dicuci menggunakan 0% Acetonitrile dan 20% water, 0.1% - 2% asam format selama 3 menit, 2% - 35% asam format selama 27 menit, 35% - 90% asam format selama 15 menit, lalu dicuci balik 90% - 5% asam format selama 1 menit dengan kecepatan aliran 0.3 ml/menit pada suhu 50°C . Tandem mass spectrometry dianalisis menggunakan Q-Exactive HF mass spectrometer (ThermoScientific) menggunakan fragmentasi HCD pada mode positif. Scan MS dilakukan pada gelombang 200-2000 m/z . Data mentah MS dianalisis menggunakan software Proteome Discoverer 2.2 dengan

Sequest HT sebagai alat pencarian. Identifikasi kadar peptida dan protein diatur dengan meminimalkan *false discovery rate* 1% dan *false discovery rate* 5% menggunakan teknik Percolator. Protein diharapkan memiliki nilai sekuens HT>0 dan peptida spesifik ≥ 2 . Toleransi massa diatur hingga 10 ppm. Spesifisitas enzim diperiksa menggunakan Trypsin (celah C-terminal pada Lysine dan Arginin) dengan maksimum kehilangan celah sebanyak 2 yang diperbolehkan. Modifikasi dinamis diatur menggunakan Acetyl / +42.011 Da (N-Terminus); Oksidatif / +15.995 Da (M) dan modifikasi statis menggunakan Carbamidomethyl / +57.021 Da (C).

Tahap 4. Kultur primer sel endotel rekombinan dari HUVEC

8. Kultur primer sel endotel HUVEC

Sel ditumbuhkan dalam medium DMEM (Gibco) dengan suplementasi 20% FBS, 1% penisilin/streptomisin dengan tambahan faktor pertumbuhan VEGF 5 ng/mL, EGF 5 ng/mL, dan bFGF 5 ng/mL (EGM-2, Lonza). Setelah sel mencapai populasi 90%, kemudian sel dilakukan subkultur. Kultur sekunder sel kemudian dimasukkan ke media tanpa *growth factor* (DMEM, FBS 20%, penisilin/streptomisin 1%) (ATCC, 2016). Kultur sekunder kemudian ditanam dalam *well-plate* 12 sebanyak 1×10^4 sel tiap sumur lalu dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan: kontrol (K), kondisi hipoksia (H) dan 2 kelompok kondisi hipoksia dengan penambahan sekretom sel punca ASI media sferoid (H+SP-MS).

Tahap 5. Intervensi sel endotel HUVEC

9. Intervensi Sel Endotel HUVEC

Sel endotel yang akan diperlakukan hipoksia dicuci terlebih dahulu dengan PBS, kemudian ditempatkan pada media DMEM + 20% FBS dalam hypoxic chamber bertekanan O₂ 1% CO₂ 10% bersuhu 37°C selama 24 jam (Liu *et al.*, 2017). Sel endotel yang telah dikondisikan hipoksia lalu ditambahkan sekretom sel punca ASI hipoksia sejumlah 0.1 ml (setara kepadatan sel punca 2×10^5 sel/ml) pada tiap sumur lanjut dikultur pada medium DMEM + 20% FBS selama 24 jam dan 72 jam.

10. Imunohistokimia sel endotel HUVEC hipoksia dan normoksia

Media kultur sel ditetesi dengan endogenus peroksidase metanol H₂O₂ 3% selama 20 menit. Lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan ditetesi dengan bloking serum selama 10 menit. Media dalam kultur sel ditiriskan, kemudian tetesi dengan antibodi yang telah disiapkan. Inkubasi pada suhu 4°C selama 18 jam, kemudian dicuci dengan PBS selama 2x5 menit. Setelah itu media kultur ditetesi dengan biotin selama 15 menit dan dicuci dengan PBS selama 2x5 menit. Selanjutnya kultur sel ditetesi dengan streptavidin selama 10 menit lalu dicuci kembali dengan PBS selama 2 x5 menit. Setelah itu diberikan substrat enzim peroksidase (DAB) selama 3-5 menit lalu dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit. Terakhir kultur sel ditetesi dengan hematoxylin selama 4 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Hasil *mounting* yang didapatkan ditutup dengan deckglass dan dibaca pada alat imunohistokimia (IHC).

11. Supernatan Sel Endotel HUVEC

Sel endotel HUVEC kontrol, hipoksia dan intervensi dipisahkan dari mediana untuk mendapatkan supernatan dengan melakukan sentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit pada suhu ruangan. Pellet sel yang terbentuk dicuci menggunakan PBS lalu disentrifugasi kembali 2500 rpm selama 5 menit. Pellet sel diresuspensi dengan 200 µl larutan buffer lisis dan dimasukkan dalam *beadbug homogenizer microtube* untuk dikocok dengan kecepatan 3000rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Sel lisis dilakukan resentrifugasi kembali 11.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan lisis sel endotel. Supernatan yang sudah disiapkan disimpan pada lemari pendingin suhu -80°C sampai dilakukan pemeriksaan ELISA.

12. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Uji kuantitatif yang digunakan yaitu menggunakan ELISA. Antibodi yang digunakan yaitu anti-human-BMPRII, anti-VE-cadherin, anti-TNF-α, anti-caspase-3. Supernatan kultur sel pada kelompok kontrol (sel

endotel pada media DMEM, FBS 20%), kelompok perlakuan hipoksia (sel endotel pada media DMEM, FBS 20% + hypoxic chamber), dan kelompok perlakuan sel punca dan hipoksia (sel endotel hipoksia + isolat sekretom sel punca ASI hipoksia pada media DMEM, FBS 20%) merupakan sampel yang dipakai. Semua reagen disiapkan sesuai standar/instruksi alat. Kemudian ditambahkan 100 µl larutan standar pada masing-masing sumur dan diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu ruangan. Lalu dimasukkan 100 µl antibodi primer pada setiap sumuran dan diinkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang. Lalu ditambahkan Streptavidin pada masing-masing sumuran diinkubasi selama 45 menit lalu 100 µl TMB dimasukkan dalam setiap sumuran. Kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruangan dan ditambahkan 50 µl *stop solution* pada tiap sumuran, dan hasil dibaca pada absorbansi 450 nm *ELISA Reader*.

13. Uji Viabilitas dan Hitung Jumlah Sel

Viabilitas sel diukur secara kualitatif menggunakan foto sel dari mikroskop inverted Olympus. Sel kultur pada kelompok kontrol (sel endotel pada media DMEM, FBS 20%), kelompok perlakuan hipoksia (sel endotel pada media DMEM, FBS 20% + hypoxic chamber), dan kelompok perlakuan sel punca dan hipoksia (sel endotel hipoksia + isolat sekretom sel punca ASI hipoksia pada media DMEM, FBS 20%) merupakan sampel yang dipakai. Sel ditanam dalam *plate* 12-sumuran dengan kepadatan 1×10^4 sel setiap 200 µl medium per sumuran. Viabilitas sel ditampilkan dalam bentuk presentase dari sel hidup dalam kelompok kontrol. (Mohseni Kouchesfehane *et al.*, 2013)

H. Perijinan Penelitian

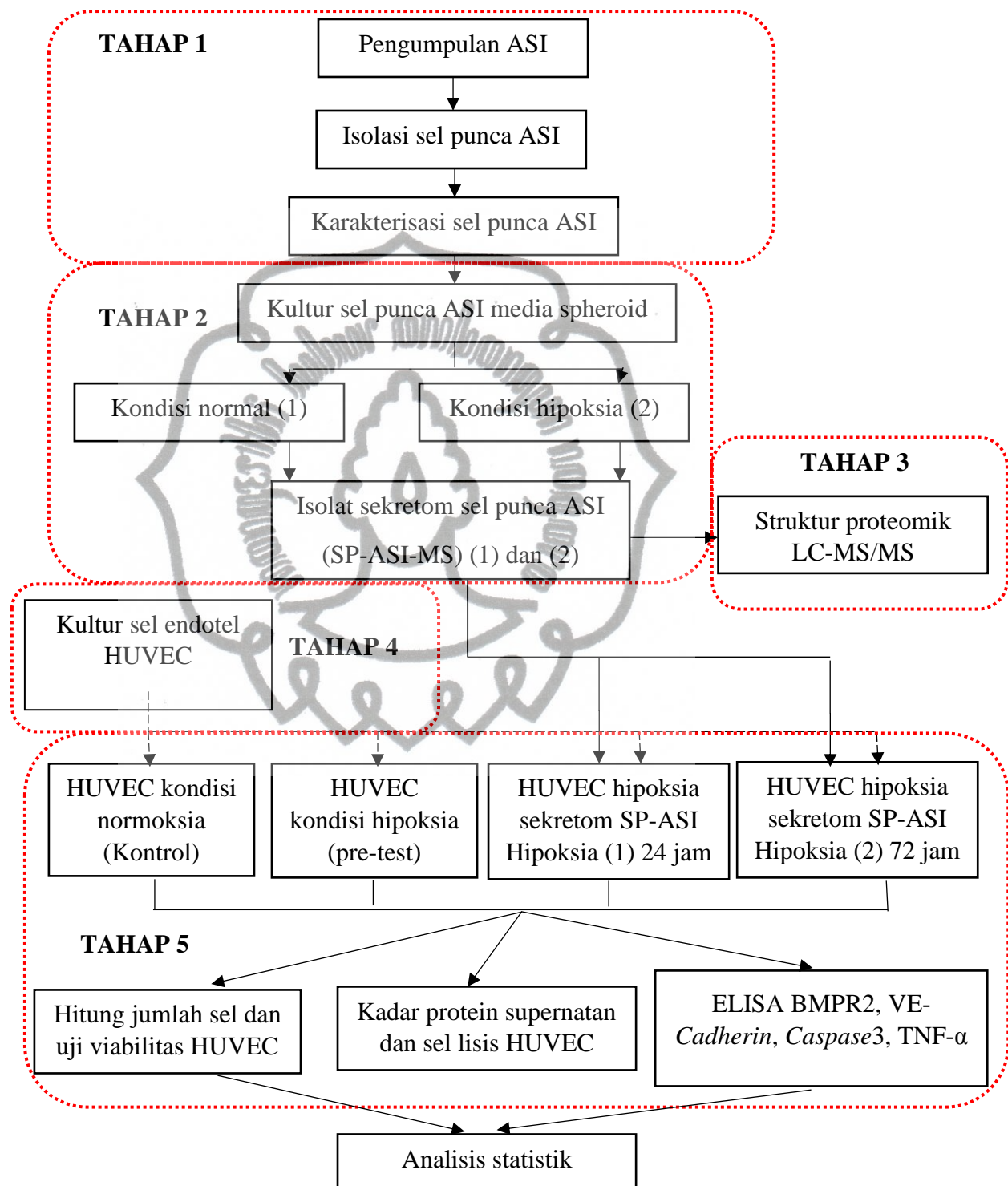
Perijinan diperoleh dari Panitia Komite Etik FK UNS (No. 353/UN27.06/KEPK/EC/ 2019) dan RSUD dr. Moewardi Surakarta (No.735/VI/HREC/2020) dalam surat Kelaikan Etik (Lampiran 1 dan 2).

Penelitian dilakukan dengan prinsip tidak bertentangan dengan etika penelitian pada manusia (Protokol Helsinki).

I. Analisis Data

Analisis data kuantitatif dengan uji normalitas data Shapiro-Wilk (sampel < 30). Uji *One-way ANOVA* dilakukan untuk signifikansi uji beda bila sebaran data normal antara: 1) sel endotel normoksia (kontrol), 2) sel endotel hipoksia (pre-test), 3) sel endotel hipoksia diberi sekretom sel punca ASI hipoksia inkubasi 24 jam (post-test 1), 4) sel endotel hipoksia diberi sekretom sel punca ASI hipoksia inkubasi 72 jam (post-test 2). Data yang diuji yaitu hitung jumlah sel tiap kelompok, beda kadar protein *lysate* dan *supernatant*, dan kadar biomarker BMPR2, VE-Cadherin, Caspase3, TNF- α . Uji statistik dilanjutkan post hoc LSD untuk mengetahui beda parsial tiap kelompok perlakuan. Nilai $p < 0,05$ dikatakan bermakna secara statistik. Analisis data kualitatif meliputi : 1) morfologi, viabilitas sel, dan penanda permukaan sel punca mesenkimal, 2) beda ekspresi HIF-1 α pada HUVEC-4 hipoksia dengan normoksia, dan 3) proteomik sekretom sel punca ASI hipoksia dan non-hipoksia.

J. Alur Penelitian



Gambar 3.3. Alur Penelitian

Keterangan gambar :

Tahap 1. Kultur dan Karakterisasi sel punca mesenkimal dalam isolat sel ASI

Pengumpulan sampel ASI dari 6 orang ibu masa laktasi < 1 bulan dengan volume @200ml, selanjutnya dilakukan isolasi sel ASI melalui pencucian PBS dilanjutkan sentrifugasi dari total sampel ASI yang didapatkan. Sel ASI ditanam pada media Mammocult dilengkapi FBS dan suplemen faktor pertumbuhan untuk mendapatkan isolat sel punca ASI. Setelah mendapat kepadatan sel konfluens > 90% dilakukan pasase ke media kultur sferoid menggunakan media bebas serum DMEM (tanpa penambahan FBS) untuk merangsang sekresi sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan lebih optimal. Setelah penanaman sel punca ASI dalam media sferoid sebanyak 2 pasase untuk mendapatkan viabilitas sel punca ASI yang baik, dilakukan pemeriksaan karakterisasi sel punca mesenkimal metode FACS penanda permukaan CD-44, CD-73, CD-90, dan CD-105.

Tahap 2. Isolat sekretom sel punca ASI hipoksia dan non-hipoksia

Sel punca ASI yang telah ditumbuhkan dalam media sferoid dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan, normoksia dan hipoksia. Sel yang akan dikondisikan hipoksia dipindahkan dalam media kultur sferoid yang baru, lalu dimasukkan dalam chamber hipoksia dengan pengaturan tekanan O₂ 1%, CO₂ 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Sedangkan kelompok sel normoksia ditumbuhkan dalam kondisi lingkungan mikro bertekanan O₂ 21%, CO₂ 5% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Sel yang didapatkan dipanen lalu disentrifugasi untuk mendapatkan supernatan yang disebut sebagai isolat sekretom sel punca ASI.

Tahap 3. Pemeriksaan proteomik dengan teknik LC-MS/MS secara kualitatif dan kuantitatif dari sekretom sel punca ASI

Sekretom sel punca ASI hipoksia dan normoksia dilakukan pemeriksaan kadar protein total dengan metode Bradford. Selanjutnya dipreparasi untuk pemeriksaan proteomik menggunakan teknik LC-MS/MS yang dilakukan melalui 3 tahapan

reduction, *alkylating* dan *ingestion* menggunakan alat UHPLC Vanquish Tandem Q-Exactive Plus Orbitrap HRMS ThermoScientific. Pemeriksaan LC-MS/MS berguna untuk membandingkan variasi jenis dan kadar peptida di dalam sekretom sel punca ASI hipoksia dengan normoksia.

Tahap 4. Kultur primer sel endotel rekombinan dari HUVEC

Isolasi sel endotel dari pembuluh darah vena tali pusat menggunakan teknik tripsinisasi kemudian ditanam pada media DMEM dengan FBS dan suplementasi pertumbuhan untuk mendapatkan sel endotel pulmonal rekombinan. Media kultur dilakukan subkultur untuk mendapatkan jumlah sel endotel yang optimal pada penanaman di media sumuran perlakuan berikutnya.

Tahap 5. Intervensi sel endotel HUVEC

Sel endotel ditanam dalam media sumuran 12 dengan kepadatan 1×10^4 sel/ml, lalu dibagi menjadi kelompok kontrol yang diinkubasi pada kondisi normoksia dan kelompok pre-test yang diperlakukan hipoksia. Seluruh kelompok sel dikerjakan secara *triplicate* untuk mendapatkan hasil yang *reliable*. Perlakuan hipoksia dengan meletakkan media kultur dalam chamber hipoksia bertekanan O_2 1%, CO_2 10% diinkubasi dalam suhu $37^\circ C$ selama 24 jam untuk mendapatkan respon seluler menyerupai patogenesis hipertensi pulmonal. Kelompok pre-test diberi perlakuan pemberian sekretom sel punca ASI hipoksia sebanyak 0.1 ml setiap sumuran lalu dilanjutkan inkubasi selama 24 jam dan 72 jam pengamatan. Viabilitas sel diamati secara kualitatif dibawah mikroskop inverted untuk mendapatkan morfologis sel endotel dan dihitung jumlah sel menggunakan kamar hitung Neubauer, lalu pengukuran kadar protein intraseluler dan ekstraseluler dengan metode Bradford, pemeriksaan kadar biomarker BMPR2, VE-Cadherin, Caspase3, serta $TNF-\alpha$ dengan teknik ELISA setelah inkubasi 24 jam dan 72 jam. Hasil kuantitatif yang didapatkan akan dianalisis statistik menggunakan program SPSS versi 20.