

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
ABSTRAK	iii
<i>ABSTRACT</i>	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN	xi
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian.....	7
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. <i>Acute Lung Injury</i> (ALI)	9
2.1.1. Sel A549	11
2.2. Sel Punca (<i>Stem Cell</i>).....	12
2.2.1. Sel Punca Mesenkim	13
2.2.2. <i>Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell</i> (hWJ- <i>MSC</i>).....	16
2.2.3. Sekretom	18
2.3. Sferoid 3D.....	19
2.4. Sinyal Parakrin	21
2.5. Faktor Pertumbuhan (<i>Growth Factor</i>).....	22
2.5.1. <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> (PDGF)	23
2.5.2. <i>Hepatocyte Growth Factor</i> (HGF).....	24
2.5.3. <i>Transforming Growth Factor-β</i> (TGF-β)	24
2.6. Lipopolisakarida (LPS)	26
2.7. <i>Dexamethasone</i> (Dex)	27
2.8. <i>Co-culture</i>	28
2.9. <i>Scratch Assay</i>	29
2.10. Hipotesis	30
III. METODE PENELITIAN	31
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	31
3.2. Rancangan Percobaan	31
3.3. Alat dan Bahan	33
3.3.1. Alat	33
3.3.2. Bahan.....	34
3.4. Diagram Alir Penelitian.....	35
3.5. Cara Kerja	36
3.5.1. Kajian Pustaka.....	36
3.5.2. Preparasi Alat dan Bahan	36
3.5.3. Kultur Sel	37
3.5.4. Pembuatan Sferoid.....	40

3.5.5. Pemberian Induksi.....	41
3.5.6. Melakukan Terapi.....	41
3.5.7. Uji Migrasi	42
3.5.8. Uji Karakterisasi.....	43
3.6. Analisis Data	46
IV.HASIL DAN PEMBAHASAN	48
4.1. Model <i>Acute Lung Injury</i> (ALI) pada Sel A549 secara <i>In Vitro</i>	48
4.2. Efektivitas Terapi Sel dengan Co-culture dan Sekretom asal hWJ-MSC .	55
4.2.1. Efek Terapi Sel melalui Metode <i>Co-culture</i> asal hWJ-MSC terhadap Regenerasi Sel A549 Model ALI	55
4.2.2. Efek Terapi Sekretom asal hWJ-MSC terhadap Regenerasi Sel A549 Model ALI	60
4.2.3. Perbandingan Persentase Luka.....	62
4.3. Analisis Kadar Protein Total Pascaterapi	69
4.4. Analisis Profil Protein Pascaterapi.....	72
4.5. Analisis Kadar Sitokin Pascaterapi	76
4.6. Mekanisme Regulasi Sitoskeleton dalam Proses Migrasi Sel A549 Model ALI	80
V. KESIMPULAN DAN SARAN	87
5.1. Kesimpulan.....	87
5.2. Saran.....	87
DAFTAR PUSTAKA	89
UCAPAN TERIMA KASIH	101
LAMPIRAN.....	105
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	122

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Patofisiologi ALI.....	10
Gambar 2. 2. Morfologi sel A549	12
Gambar 2. 3. Morfologi sel punca mesenkim	14
Gambar 2.4. Karakterisasi hWJ-MSC menggunakan <i>Flowcytometry</i> (FACS) (a); dan kemampuan diferensiasi hWJ-MSC (b).....	17
Gambar 2. 5. Fungsi sekretom SPM.	19
Gambar 2. 6. Morfologi sferoid.....	20
Gambar 2. 7. Contoh pensinyalan pada sel	22
Gambar 2. 8. Struktur lipopolisakarida	26
Gambar 2. 9. Visualisasi <i>co-culture</i> secara <i>in-direct</i>	28
Gambar 2. 10. Mekanisme dari <i>scratch assay</i>	29
Gambar 3. 1. Diagram alir penelitian.....	35
Gambar 4. 1. Morfologi kultur sel A549 pramodel & pascamodel ALI.	48
Gambar 4. 2. Mekanisme aktivasi reseptor TLR4.	50
Gambar 4. 3. Hasil pengujian BCA (a) dan analisis visual protein target (b)	51
Gambar 4. 4. Hasil CBA sitokin pro-inflamasi IL-8 pada kelompok pramodel dan pascamodel.	53
Gambar 4.5. Mekanisme terapi berbasis sel menggunakan metode <i>co-culture</i>	56
Gambar 4. 6. Perbandingan proses penutupan area luka pada kultur sel A549 model ALI setelah diberikan terapi berbasis sel melalui metode <i>co-culture</i>	58
Gambar 4.7. Perbandingan proses penutupan area luka sel pada kultur monolayer sel A549 model ALI setelah diberikan terapi sekretom.....	61
Gambar 4. 8. Grafik perbandingan persentase penutupan luka pada kultur sel A549 model ALI.	63
Gambar 4.9. Hasil pengukuran konsentrasi total protein pascaterapi 9 hari.	69
Gambar 4.10. Hasil visualisasi profil protein pada gel poliakrilamida menggunakan SDS-PAGE.....	73
Gambar 4.11. Hasil analisis sitokin (a) sitokin IL-8, (b) VEGF, & (c) TGF- β pada sampel pascaterapi.....	77
Gambar 4. 12. Pensinyalan PI3K/Akt dalam proses migrasi sel A549.	81
Gambar 4. 13. Pensinyalan TGF- β /SMAD dalam proses migrasi sel A549.....	83
Gambar 4. 14. Lamelipodia dan filopodia pada proses migrasi sel.	84
Gambar 4.15. Penutupan area luka pada kultur sel A549 hari ke-9 pascaterapi <i>co-culture</i> sferoid.....	85
Gambar L.1. 1. Kegiatan kultur jaringan	105
Gambar L.1. 2. Pembuatan Sferoid hWJ-MSC	105
Gambar L.1. 3. Pemberian <i>nanoshuttle</i>	105
Gambar L.1. 4. Kultur Sel A549 pada 24 <i>well plate</i>	105
Gambar L.1. 5. Serbuk LPS <i>Escherichia coli</i>	105
Gambar L.1. 6. Kultur hWJ-MSC pada <i>transwell insert</i>	105
Gambar L.1. 7. Pengamatan proses migrasi Sel A549.....	105
Gambar L.1. 8. Dilakukan variasi terapi.....	105
Gambar L.1. 9. Serbuk <i>dexamethasone</i>	105
Gambar L.1. 10. Pengujian menggunakan metode BCA	106

Gambar L.1. 11. Pengujian menggunakan metode SDS-PAGE.....	106
Gambar L.1. 12. Terapi hari terakhir (Hari ke-9).....	106
Gambar L.1. 13. Pengujian menggunakan metode CBA.....	106

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1.Rancangan penelitian	32
Tabel 3. 2. Rancangan Acak Lengkap (RAL)	33
Tabel 4. 1.Konsentrasi total protein Pascaterapi 9 hari	70
Tabel L.2.1. 1. BCA pramodel dan pascamodel	107
Tabel L.2.1. 2. Uji BCA pascaterapi 9 hari	107
Tabel L.2.1. 3.Persentase penutupan luka	107
Tabel L.2.2. 1. BCA pramodel & pascamodel	109
Tabel L.2.2. 2.BCA pascaterapi 9 hari	109
Tabel L.2.2. 3. Persentase penutupan luka	109
Tabel L.2.3. 1. BCA pascaterap 9 hari	109
Tabel L.2.4. 1. BCA pramodel & pascamodel	109
Tabel L.2.4. 2. BCA pascaterapi 9 hari	109
Tabel L.2.5. 1. BCA pramodel dan pascamodel	110
Tabel L.2.6. 1. Persentase Penutupan luka	110

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi selama penelitian skripsi berlangsung.....	105
Lampiran 2. Hasil Analisis Statistik.....	107

DAFTAR SINGKATAN

ALI	: <i>Acute Lung Injury</i>
ARDS	: <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
A549	: <i>Human alveolar epithelial cell line</i>
BCA	: <i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
CBA	: <i>Cytometric Bead Array</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
DAD	: <i>Diffuse Alveolar Damage</i>
Dex	: <i>Dexamethasone</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
FACS	: <i>Flourescence Activated Cell Sorting</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLA-DR	: <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
hWJ-MSC	: <i>Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
KGF	: <i>Keratocyte Growth Factor</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Factor-1</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PI3K/Akt	: <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase / Protein Kinase B</i>
RANTES	: <i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SPM	: <i>Sel Punca Mesenkim</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TLR	: <i>Toll-like Receptor</i>
TLR-4	: <i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UC-MSC	: <i>Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit *Acute Lung Injury* (ALI) merupakan komplikasi dari berbagai gangguan sistemik paru terkait dengan pneumonia, sepsis, dan sindrom pernafasan akut dengan angka mortalitas global mencapai kurang lebih 40% (Long *et al.*, 2024; Fadanni & Calixto, 2023). ALI ditandai dengan terjadinya penurunan kemampuan paru-paru dalam proses pertukaran gas akibat terjadinya kerusakan endotel vaskuler dan epitel alveolar (Joslyn *et al.* 2019). Kondisi ini umumnya dipicu oleh infeksi virus atau bakteri yang memicu respon imun berlebih (Qin *et al.*, 2025). Cedera yang akut ini dapat memicu sistem imun untuk merespon inflamasi berlebihan yang tidak terkontrol, keadaan ini berpotensi berkembang menjadi *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) bila tidak segera ditangani dengan baik (Zhai *et al.*, 2024).

Infeksi patogen pada sel-sel alveolar ini memicu aktivasi sistem imun yang ditandai dengan pelepasan sitokin pro-inflamasi, kemokin, dan mediator antimikroba (Qin *et al.*, 2025). Respon inflamasi yang berlebihan ini dapat menyebabkan terjadinya badai sitokin (*cytokine storm*), yaitu kondisi hiper-inflamasi akibat pelepasan sitokin pro-inflamasi secara masif dan tidak terkontrol (Zhu *et al.*, 2024). Keadaan tersebut memicu infiltrasi leukosit, terutama neutrofil masuk ke dalam jaringan paru-paru yang memperberat inflamasi, merusak penghalang (*barrier*) alveolar-kapiler, dan menimbulkan edema. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya penghambatan dalam proses pertukaran gas di dalam alveolus (Zhang *et al.*, 2024).

Pengobatan spesifik untuk ALI hingga saat ini masih belum tersedia (Xie *et al.*, 2025). Berbagai terapi seperti antibiotik, kortikosteroid (*dexamethasone*), farmakonutrien, antioksidan, inhibitor protease, ketokonazol, ibuprofen, serta obat-obatan yang mempengaruhi ventilasi, difusi, dan perfusi telah digunakan secara luas, namun efek terapinya masih belum memuaskan (Chen *et al.*, 2024). Jeong *et al.* (2025) juga melaporkan bahwa hingga saat ini belum ada terapi farmakologis yang terbukti efektif untuk menekan badai sitokin (*cytokine storm*) maupun memperbaiki kerusakan pada alveolar secara langsung. Terapi yang tersedia masih memiliki keterbatasan, salah satunya adalah risiko resistensi akibat penggunaan antibiotik jangka panjang (Long *et al.* 2024). Lebih lanjut, penggunaan *dexamethasone* yang diharapkan dapat mengurangi proses inflamasi juga berpotensi menimbulkan gangguan hormonal dan immunosupresi jika digunakan dalam jangka panjang (Noreen *et al.*, 2021). Keterbatasan tersebut menjadi dasar dan mendorong pengembangan terapi alternatif yang lebih aman dan efektif dan berpotensi tidak hanya menekan inflamasi, tetapi juga mampu merangsang regenerasi jaringan secara efektif melalui pendekatan terapi berbasis sel punca (Zhang *et al.*, 2024).

Terapi berbasis sel punca (*stem cell therapy*) muncul sebagai pendekatan inovatif untuk mengatasi keterbatasan pada terapi konvensional. Sel punca memiliki kemampuan regeneratif serta kapasitas diferensiasi yang sangat tinggi sehingga berpotensi memperbaiki jaringan yang rusak terutama pada sel-sel alveolar paru-paru (Hussen *et al.*, 2024). Sel punca memiliki berbagai klasifikasi berdasarkan sumber dan potensinya, salah satunya sel

punca mesenkim (*mesenchymal stem cell*). Sel punca mesenkim memiliki sifat imunomodulator dan anti-inflamasi yang memungkinkan penggunaannya pada terapi sel untuk penyakit inflamasi maupun penyakit autoimun. Berbagai jenis sel punca mesenkim terutama *Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells* (hWJ-MSC) yang berasal dari jaringan tali pusat yang merupakan kandidat unggul karena mudah diisolasi dan memiliki imunogenitas yang rendah (Lakshminarayanan *et al.*, 2025).

Sel hWJ-MSC juga memiliki sifat imunomodulator yang penting dalam kondisi inflamasi. Kemampuan ini dapat menekan kerusakan jaringan baik secara langsung melalui regenerasi jaringan maupun secara tidak langsung dengan cara menghambat pelepasan sitokin pro-inflamasi (He *et al.*, 2022). Potensi terapeutik tersebut sebagian besar dimediasi oleh sekretom, sekumpulan senyawa bioaktif yang dikeluarkan oleh hWJ-MSC yang mengandung sitokin anti-inflamasi, faktor pertumbuhan (*growth factor*), dan kemokin (Zhu *et al.* 2024). Sekretom ini mempercepat proses penyembuhan dan regenerasi jaringan melalui mekanisme parakrin (Rasouli *et al.*, 2024). Sari *et al.* (2023) menjelaskan bahwa sekretom dari hWJ-MSC terbukti dapat menekan badai sitokin (*cytokine storm*) melalui peningkatan pelepasan sitokin anti-inflamasi seperti *Interleukin-10* (IL-10), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Geindreau, *et al.*, 2022). hWJ-MSC melalui sekresi sekretom sebagai agen anti-inflamasi berperan dalam menekan pelepasan sitokin pro-inflamasi berlebihan, menjaga integritas alveolar-kapiler, serta mempercepat regenerasi jaringan paru-paru yang rusak hal ini menandakan bahwa potensi

terapi berbasis sel punca khususnya hWJ-MSC dapat meningkatkan fungsi paru-paru dalam jangka panjang (He *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil uji klinis tahap satu yang tercatat pada ClinicalTrials.gov oleh Michael A. Matthay dari University of California, San Francisco tahun 2017, bahwa terapi ALI menggunakan sel punca mesenkim asal sumsum tulang atau *Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (hBM-MSC) (NCT 01775774) menunjukkan profil keamanan dan efektivitas yang baik pada pasien dengan kondisi sedang hingga berat. Temuan ini memperkuat potensi sel punca mesenkim beserta sekretomnya sebagai pendekatan terapi inovatif sekaligus alternatif yang menjanjikan dalam penanganan ALI.

Penelitian ini akan mengkaji pemanfaatan dan membuktikan potensi terapi sel punca mesenkim, khususnya sel hWJ-MSC dan sekretom, sebagai kandidat terapi alternatif dan inovatif untuk ALI melalui metode *co-culture* dan pemberian sekretom. Fokus penelitian ini diarahkan pada interaksi hWJ-MSC dan sel A549 sebagai model ALI secara *in-vitro*. Sel A549 banyak dan sering digunakan karena karakteristiknya yang menyerupai sel epitel alveolar tipe II, dapat menunjukkan perubahan morfologi, kemampuannya dalam merespon stres oksidatif, mampu melepaskan sitokin pro-inflamasi, serta memperlihatkan perubahan pola pertumbuhan dan penyebaran (Barosova *et al.*, 2021).

Model ALI dikembangkan melalui induksi mekanis menggunakan *scratch assay* dan kimiawi melalui Lipopolisakarida (LPS) asal bakteri *Escherichia coli*. Kombinasi kedua metode tersebut dapat mencerminkan

kerusakan jaringan yang terjadi pada alveolus paru-paru, kondisi inflamasi, serta memicu badai sitokin (*cytokine storm*) dengan meningkatkan sekresi sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6), dan *Interleukin-8* (IL-8) secara berlebihan yang dapat memperburuk inflamasi (Chang & Zhang, 2023). Aktivasi *Toll Like Receptor* (TLR) oleh LPS dan *scratch assay* juga dapat menstimulasi hWJ-MSC untuk mensekresikan sekretom yang mengandung sitokin anti-inflamasi seperti *Interleukin-10* (IL-10), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) untuk menekan badai sitokin, memperbaiki jaringan atau sel-sel yang rusak, mengatur dan menstabilkan permeabilitas epitel dan endotel paru-paru, serta mencegah kerusakan lebih lanjut (Drobiova *et al.*, 2023).

Penelitian ini menerapkan beberapa model terapi dengan memanfaatkan sel melalui metode *co-culture insert transwell* dan pemberian sekretom. Sun *et al.* (2024) melaporkan bahwa PDGF, HGF, dan, TGF- β yang terkandung dalam sekretom hWJ-MSC memiliki peran dalam merangsang migrasi dan proliferasi sel epitel serta mempercepat regenerasi jaringan. *Dexamethasone* yang merupakan golongan glukokortikoid dan lazim digunakan dalam terapi klinis ALI, digunakan sebagai kontrol positif karena bersifat sebagai anti-inflamasi yang kuat dan sering digunakan untuk menekan dan menurunkan sitokin pro-inflamasi dalam terapi klinis ALI (Zhai *et al.*, 2024).

Perbandingan antara terapi berbasis sel menggunakan metode *co-culture* dan terapi sekretom asal hWJ-MSC diharapkan dapat memberikan

gambaran menyeluruh mengenai efektivitas serta keunggulan masing-masing, meskipun sekretom hWJ-MSC menawarkan keunggulan sebagai terapi *cell-free based* yang bersifat siap dipakai, terapi berbasis sel memiliki keunikan berupa kemampuan *sensing* dan adaptasi terhadap *microenvironment* inflamasi. Perbedaan dinamika biologis ini berpotensi menghasilkan respon regeneratif yang berbeda, khususnya dalam proses migrasi sel dan pemanfaatan molekul bioaktif. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan landasan ilmiah bagi pengembangan terapi alternatif untuk ALI di masa mendatang.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini antara lain:

- 1.2.1. Apakah terdapat perbedaan integritas morfologi kultur sel A549 dan profil sitokin proinflamasi berdasarkan analisis FACS antara kondisi pramodel dan pascamodel ALI yang diberi induksi *scratch* dan LPS ?
- 1.2.2. Bagaimana pengaruh berbagai terapi berbasis sel melalui *co-culture* (hWJ-MSC, hWJ-MSC + *inducer*, sferoid, & sferoid + *inducer*) dan terapi sekretom (hWJ-MSC, hWJ-MSC + *inducer*, sferoid, & sferoid + *inducer*) terhadap kemampuan migrasi sel A549 pada model ALI secara *in vitro*?
- 1.2.3. Bagaimana peran protein bioaktif yang dihasilkan sel maupun yang terkandung di dalam sekretom terhadap proses migrasi sel dan penutupan luka model ALI secara *in vitro*?