

BAB 5

ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian isolasi dan karakterisasi sel punca mesenkimal membran sinovial yang berasal dari pasien osteoarthritis sendi lutut derajat IV yang menjalani operasi *Total Knee Replacement* (TKR). Sel punca mesenkimal membran sinovial yang sudah diisolasi dan dikarakterisasi, disuntikkan ke sendi lutut tikus model osteoarthritis yang diinduksi dengan *monosodium iodoasetat* (MIA). Tikus hewan coba terdiri dari 24 ekor tikus yang dibagi atas 3 kelompok, yang terdiri dari kelompok 1 (kontrol negatif), kelompok 2 (kontrol positif), dan kelompok 3 (kelompok perlakuan).

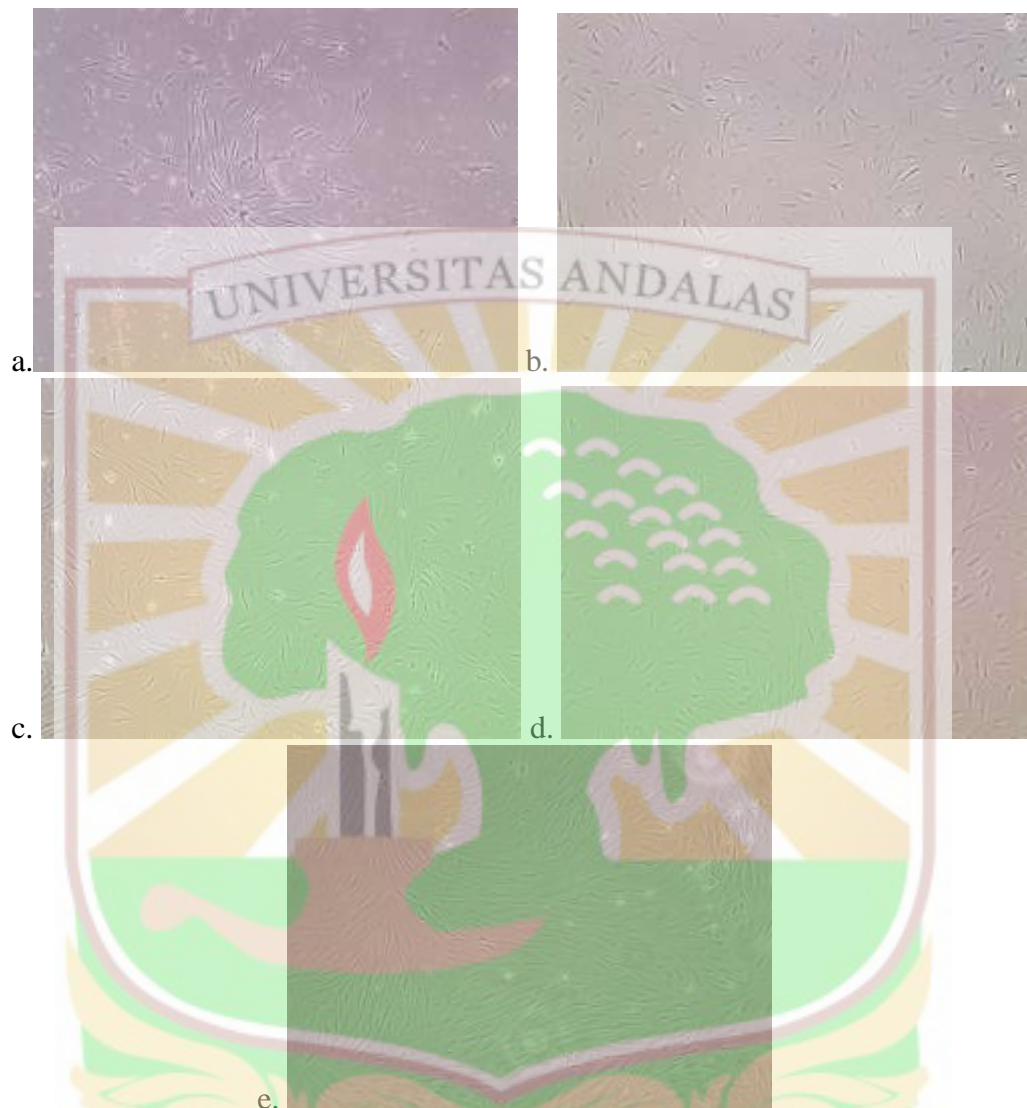
5.1 Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Membran Sinovial Pasien OA Sendi Lutut Derajat IV

Jaringan sinovial yang digunakan merupakan jaringan sinovial sendi lutut pasien yang mengalami osteoarthritis sendi lutut derajat IV, saat menjalani tindakan operasi TKR. Jaringan sinovial yang diambil adalah pada bagian superoanterior suprakondilar femur dan bagian anterior intra-artikuler. Jaringan sinovial daerah ini rutin diambil saat tindakan TKR guna mempermudah eksposur untuk pengukuran dan pemasangan implan. Proses yang dilalui untuk mendapatkan SPM-MS adalah melalui tahapan isolasi dan karakterisasi sehingga memenuhi syarat sebagai sel punca mesenkimal.

5.1.1 Isolasi Sel Punca Mesenkimal Membran Sinovial (SPM-MS)

Proses isolasi SPM-MS dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Setelah proses isolasi berhasil dilanjutkan dengan proses kultur sampai pasase ke 4 (P4). Pada gambar 5.1 terlihat kultur SPM-MS

menempel pada dasar media kultur, dengan morfologi memanjang, berupa sel berbentuk *spindle*.



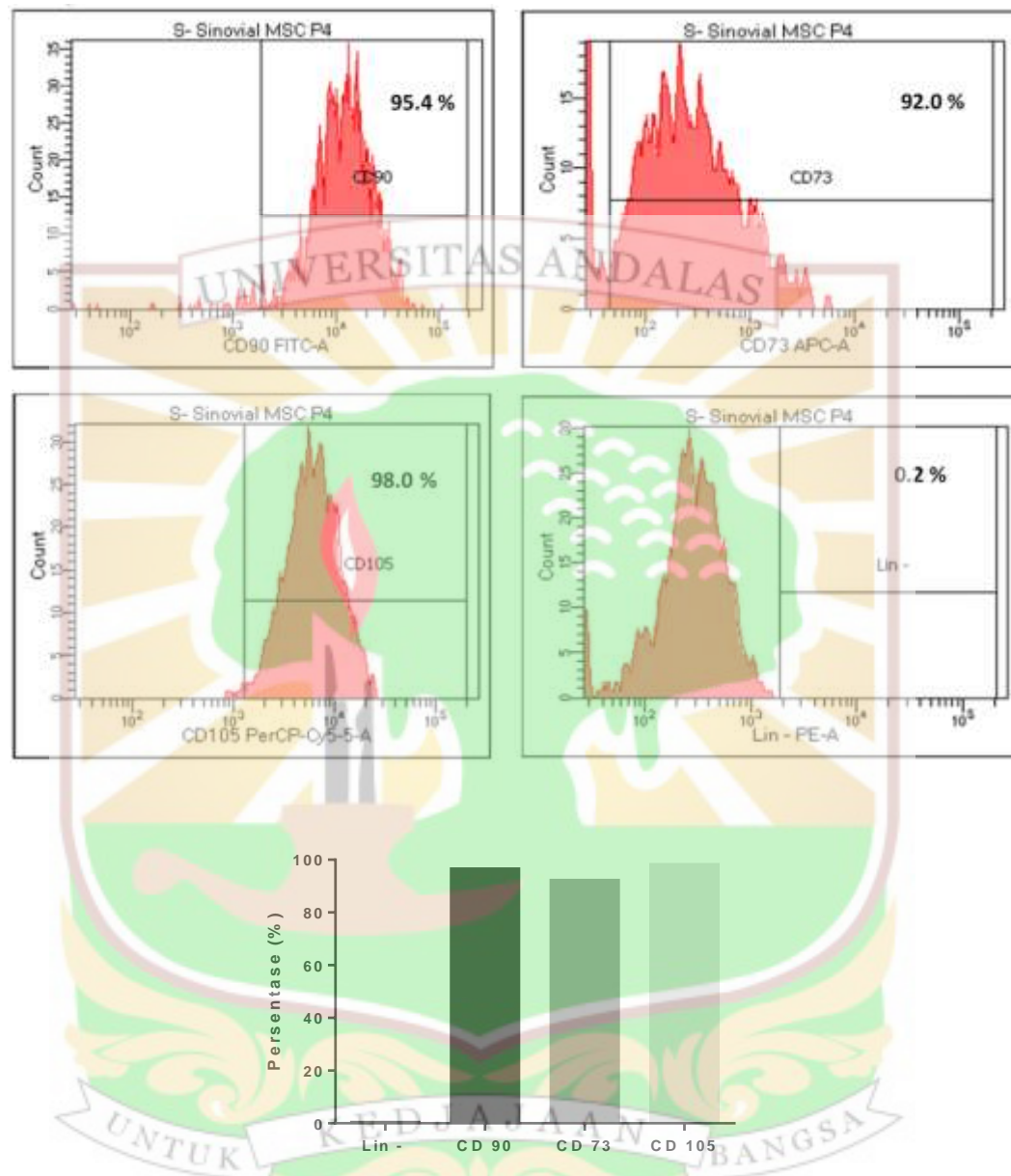
Gambar 5. 1. a) Pasase 0 (P 0) kultur SPM-MS dengan karakteristik memanjang dan berbentuk *spindle* pada perbesaran 100x b) Pasase 1 (P 1) kultur SPM-MS c) Pasase 2 (P 2) kultur SPM-MS d) Pasase 3 (P 3) kultur SPM-MS e) Pasase 4 (P 4) kultur SPM-MS

5.1.2 Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Membran Sinovial (SPM-MS)

5.1.2.1 Uji *Flow Cytometry* Sel Punca Mesenkimal Membran Sinovial

Hasil kultur SPM-MS pasase ke-4 diambil dan dilakukan uji karakterisasi menggunakan mesin *flow cytometer*, untuk melihat karakterisasi *marker* permukaan sel punca mesenkimal. Pada penelitian ini konfirmasi dilakukan dengan

mengamati ekspresi positif dari marker CD90, CD73, CD105 dan ekspresi negatif *marker Lin negative marker*.



Gambar 5. 2. Grafik hasil analisa *Flow Cytometry* SPM-MS terhadap ekspresi *marker* sel punca mesenkimal CD90, CD73, CD 105 dan negatif terhadap marker hematopoetik Lin (-)

Pada uji karakterisasi menggunakan *flow cytometry* menunjukkan bahwa SPM-MS mampu mengekspresikan CD90 (95,4%), CD73 (92%), CD105 (98%) dan mengekspresikan Lin *negative marker* (0,2%). Hasil ini sesuai dengan standar *International Society Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006).

5.1.2.2 Uji Diferensiasi Sel Punca Mesenkimal Membran Sinovial

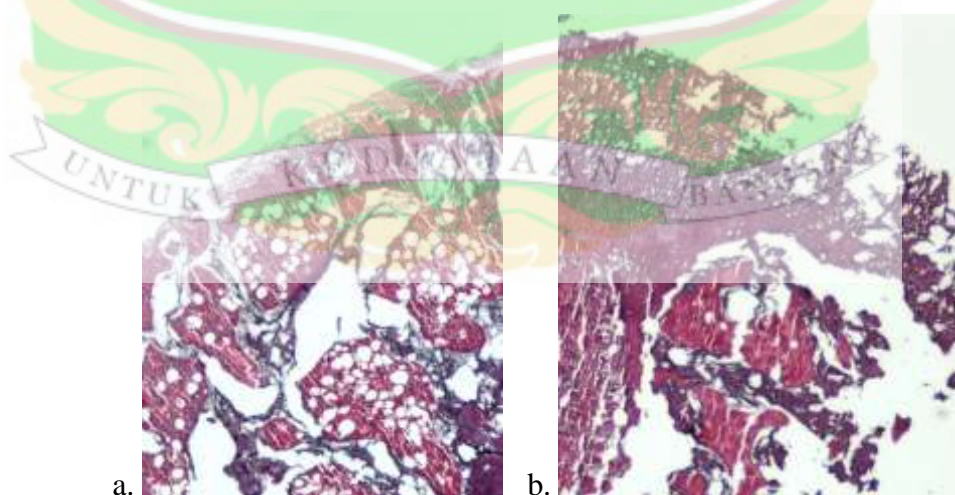
Uji Diferensiasi SPM-MS dilakukan pada sel pasase ke-4 yang telah mencapai pertumbuhan hingga 80-90% konfluensi. Uji diferensiasi SPM-MS dimulai dengan menambahkan medium diferensiasi untuk menginduksi terjadinya diferensiasi kondrogenik, adipogenik dan osteogenik. Medium diferensiasi diganti setiap 3 hari sekali, dengan proses induksi berlangsung selama 21 hari. Sel diwarnai dengan pewarna masing-masing. Kemampuan perubahan osteogenik SPM-MS ditunjukkan dengan pewarnaan Alizarin red S, dengan tampilan warna merah dan adanya deposit kalsium. Kemampuan kondrogenik diperlihatkan dengan pewarnaan *Alcian blue* dengan tampilan biru tua karena adanya *glycosaminoglican* sebagai *marker* kondrogenesis. Adanya gambaran titik minyak menunjukkan gambaran positif kemampuan adipogenik SPM-MS yang diwarnai dengan pewarnaan *Oil Red O*, seperti yang terlihat pada gambar 5.3.



Gambar 5. 3. Hasil uji diferensiasi osteogenik, kondrogenik dan adipogenik kultur SPM-MS

5.2. Model Hewan Coba Osteoarthritis Sendi Lutut dan Injeksi SPM-MS ke Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar sebanyak 24 ekor dengan berat 200 -250 mg. Proses pembuatan hewan coba model osteoarthritis sendi lutut dilakukan dengan induksi secara kimiawi menggunakan *monosodium iodoasetat* (MIA). Pembuatan model hewan coba didahului dengan penelitian pendahuluan untuk menentukan mampu laksana dan dosis yang optimal. Penelitian pendahuluan dilakukan di Laboratorium Bimana Indomedical Bogor, dengan menguji 2 dosis induksi MIA 300 μ g dan 1000 μ g pada lutut tikus. Selain itu, penelitian pendahuluan juga berguna untuk memastikan bahwa metode yang direncanakan mampu terlaksana, baik dalam pengerjaan maupun uji yang akan diperiksa. Pada penelitian pendahuluan dilakukan sebanyak 2 kelompok tikus yang masing-masing terdiri dari 3 ekor tikus. Pada penelitian pendahuluan ini didapatkan bahwa dosis MIA 1000 μ g lebih bermakna dalam menimbulkan keadaan osteoarthritis pada sendi lutut hewan coba pada 3 minggu perlakuan.



Gambar 5. 4. Gambaran histologis sendi lutut hewan coba menggunakan MIA, a) dosis 300 μ g, b) dosis 1000 μ g (Pembesaran 40x)

Pada gambaran histologis diatas terlihat perbedaan perubahan susunan permukaan tulang rawan sendi. Pada model hewan coba dengan menggunakan MIA dosis 300 μg pada gambaran histologis menunjukkan adanya *deep fissure* dan *crack* pada permukaan rawan, pada bagian tertentu terlihat adanya *loss of cartilage* dan *reduplication of tidemark*. Gambaran histologis pada gambar b, yang menggunakan MIA 1000 μg memperlihatkan kerusakan permukaan sendi yang lebih berat, dengan adanya *complete loss of cartilage*, eburnasi tulang, dan adanya fokus-fokus nekrosis tulang.



a.



b.

Gambar 5. 5. Gambaran radiologis sendi lutut hewan coba menggunakan MIA, dosis 300 μg , terlihat penyempitan sela sendi dan osteofit minimal b) dosis 1000 μg , terlihat penyempitan dan pembentukan osteofit berat (tanda panah merah) (ukuran 100%)

Pada hasil pemeriksaan radiologis model OA sendi lutut didapatkan tingkat kerusakan permukaan sendi dengan aplikasi MIA 1000 μg menghasilkan OA derajat

3 dan 4 dibandingkan dengan MIA 300 μ g menghasilkan OA derajat 1 dan 2 pada 3 minggu perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan ini diputuskan untuk menggunakan MIA 1000 μ g untuk pembuatan model hewan coba OA.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar sebanyak 24 ekor yang dibagi atas 3 kelompok, dengan kelompok 1 sebagai kontrol negatif, kelompok 2 sebagai kelompok kontrol positif, dan kelompok 3 sebagai kelompok perlakuan. Kelompok 2 dan 3 dilakukan induksi osteoarthritis sendi lutut dengan injeksi 1000 μ g MIA dalam 50 μ l cairan *normal saline* (NaCl 0,9%) intraartikular melalui *medial parapatellar*. Hewan coba dirawat selama 3 minggu sebelum dilakukan intervensi.

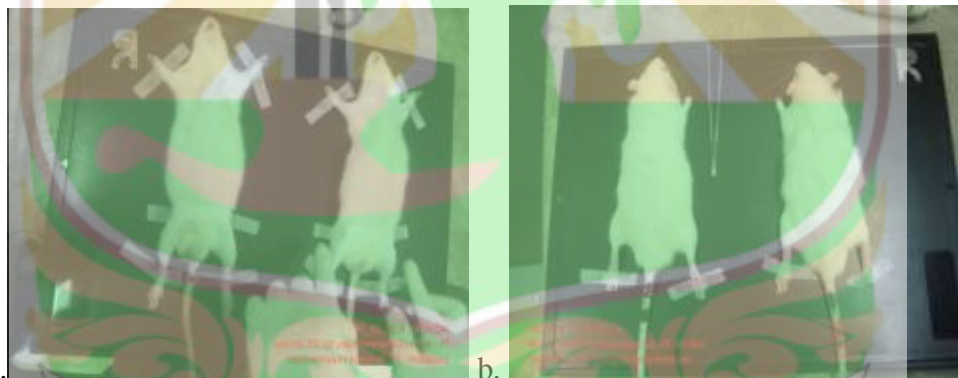
Injeksi SPM-MS dilakukan pada kelompok ke 3 (kelompok perlakuan) sebanyak 8 ekor hewan coba model OA, dilakukan penyuntikan SPM-MS sebanyak 1×10^6 sel/50 μ l intraartikular dengan septik dan antiseptik pada medial parapatellar.



Gambar 5. 6. Proses penyuntikan SPM-MS pada sendi lutut tikus. a) pengambilan 1×10^6 sel/50 μ l SPM-MS, b) injeksi SPM-MS pada medial parapatellar

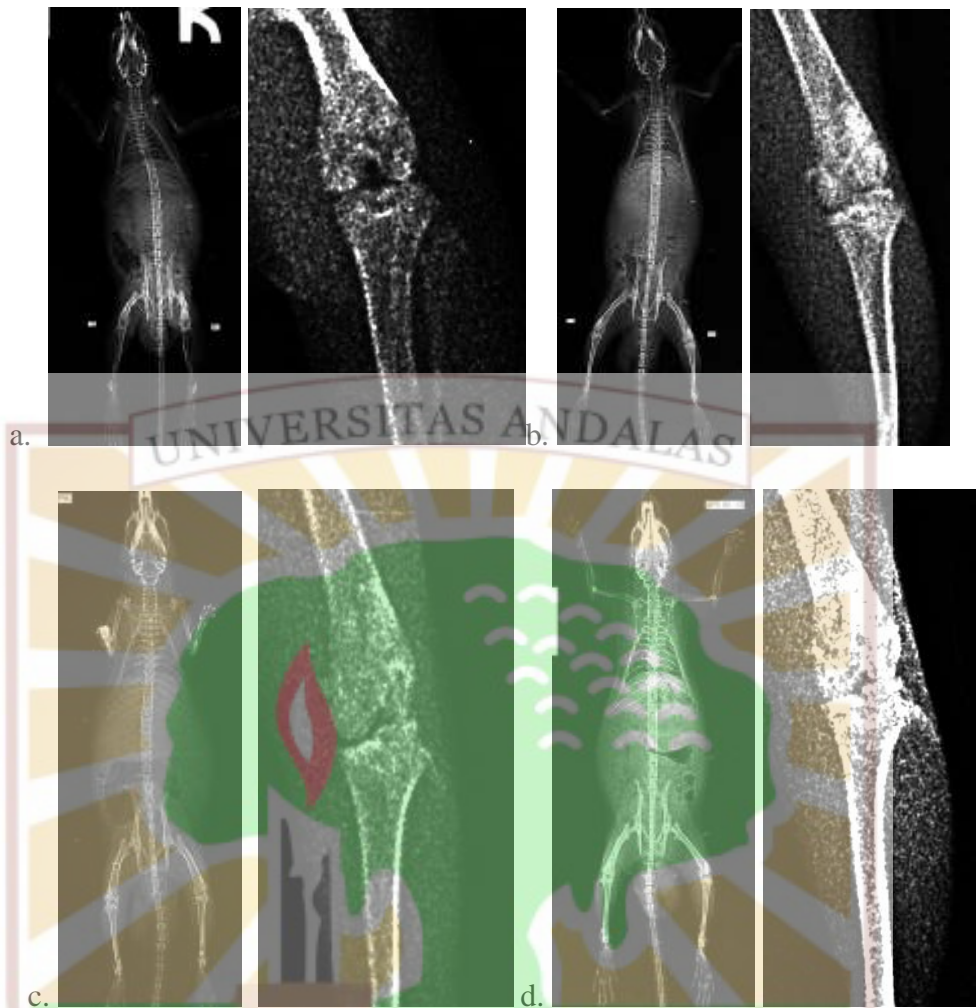
5.3. Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkimal dari Membran Sinovial Pasien Osteoartritis Sendi Lutut Derajat IV Terhadap Perbaikan Tulang Rawan Sendi Lutut Tikus Model Osteoartritis Secara Radiologis

Pemeriksaan radiologis dilakukan untuk mendeteksi perubahan bentuk sendi lutut hewan coba model OA yang diobati dengan SPM-MS. Sendi lutut ditempatkan pada kaset dan difiksasi dengan plester. Optimalisasi pengambilan proyeksi AP dan lateral sendi lutut telah dilakukan sebelumnya pada penelitian pendahuluan, untuk memastikan fisibilitas pemeriksaan radiologi pada model hewan coba tikus pada kasus OA. Hal ini dikarenakan kecilnya sendi lutut tikus dan posisi anatomi sendi lutut tikus yang sulit untuk diposisikan di kaset X-ray untuk mendapatkan gambaran AP dan lateral. Pengambilan gambar radiologis dengan menggunakan *X-ray tube*, dengan *X-ray beam* diarahkan vertikal tegak lurus kaset. Pada gambar 5.7 terlihat foto pemeriksaan radiologi sendi lutut hewan coba proyeksi AP dan lateral.



Gambar 5. 7. Proses pemeriksaan radiologis hewan coba proyeksi a. posisi hewan coba disaat pemeriksaan proyeksi AP b. posisi hewan coba disaat pemeriksaan proyeksi lateral

Berikut gambaran radiologi yang didapatkan pada pemeriksaan radiologi hewan coba yang menggambarkan masing-masing kelompok derajat kerusakan dengan proyeksi radiologi Antero Posterior (AP) dan Lateral.



Gambar 5. 8. Gambaran radiologi hewan coba berdasarkan derajat kerusakan sendi berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence: a. derajat 0 (normal) b. derajat 1 c. derajat 2 dan d. derajat 3 (ukuran 100%).

Pada gambaran radiologi sendi lutut derajat 0 (normal) pada gambar 5.7(a) didapatkan gambaran sela sendi yang lebar dan tidak ditemukan deformitas dan osteofit. Pada gambaran radiologi 5.7(b) model hewan coba OA derajat 1 didapatkan gambaran sela sendi yang masih lebar namun sudah mulai terbentuk osteofit, sedangkan pada derajat 2 pada gambar 5.7(c) sudah mulai terlihat osteofit ukuran kecil dan sklerotik sunkondral. Pada derajat 3 gambar 5.7(d) didapatkan ukuran osteofit dengan ukuran sedang, deformitas dan celah sendi mulai menyempit.

Hasil pemeriksaan radiologis ketiga kelompok hewan coba diklasifikasikan berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence seperti pada tabel berikut:

Tabel 5. 1. Perbedaan derajat kerusakan sendi lutut kelompok hewan coba berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence

Sampel	Kelompok 1 (kontrol)	Kelompok 2 (OA)	Kelompok 3 (OA+SPM-MS)
1	0	2	0
2	0	3	2
3	1	2	1
4	0	3	0
5	1	2	1
6	0	3	2
7	0	2	2
8	0	3	0

Pada tabel 5.1. terlihat terdapat derajat OA yang lebih baik pada gambaran radiologis sendi lutut hewan coba pada kelompok perlakuan yang diterapi dengan SPM-MS dengan klasifikasi radiologis Kellgren and Lawrence dibandingkan dengan kontrol positif.

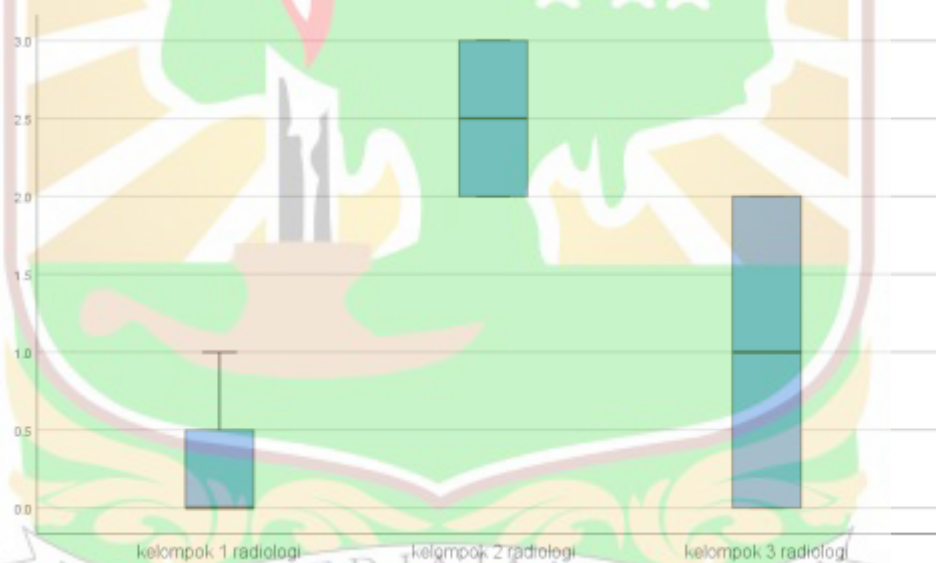
Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai *p value* untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0,001, nilai *p value* kelompok kontrol positif sebesar 0,001 dan nilai *p value* untuk kelompok perlakuan sebesar 0,030. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa data pemeriksaan radiologis untuk ketiga kelompok adalah tidak berdistribusi normal, karena *p value* < 0,05. Oleh karena itu, uji yang digunakan untuk melihat perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan radiologis berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence adalah uji Kruskal Wallis yang dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5. 2. Uji *Kruskal Wallis* pemeriksaan radiologis kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence

Kelompok	N	Median	Minimum	Maximum	P Value
Kelompok 1	8	0	0	1	
Kelompok 2	8	2,5	2	3	0,001
Kelompok 3	8	1,0	0	2	

Ketentuan pengambilan keputusan pada Uji *Kruskal Wallis* adalah:

1. Jika nilai p value $> 0,05$, maka tidak ada perbedaan atau H_0 diterima
2. Jika nilai p value $< 0,05$, maka ada perbedaan atau H_0 ditolak



Gambar 5. 9. Grafik *box plot* analisa radiologi derajat kerusakan sendi lutut pasca aplikasi SPM-MS hewan coba yang terdiri dari kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (OA) dan kelompok 3 (OA+SPM-MS)

Berdasarkan hasil analisis statistika di atas, diketahui terdapat nilai median untuk kelompok negatif sebesar 0, kelompok kontrol positif sebesar 2,5 dan kelompok perlakuan sebesar 1. Nilai minimum untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0, kelompok kontrol positif sebesar 2, dan kelompok perlakuan sebesar 0. Nilai maksimum untuk kelompok kontrol negatif sebesar 1, kelompok kontrol

positif sebesar 3, dan kelompok perlakuan sebesar 2. Nilai *p value* yang didapatkan adalah sebesar $0,001 < 0,05$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak dan H_a diterima yang berarti ada perbedaan yang signifikan antara ketiga nilai derajat kerusakan sendi lutut berdasarkan klasifikasi radiologis Kellgren and Lawrence dimana kelompok yang mendapatkan SPM-MS menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan kontrol positif.

Tabel 5. 3. Uji *Mann Whitney U* pemeriksaan radiologis kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence

Kelompok	<i>p value (homogeneity of variances)</i>	<i>p value</i>
1 dan 2	0,149	0,001
2 dan 3	0,149	0,004
1 dan 3	0,060	0,079

Histogram yang terdapat pada kelompok data 1 dan 2 mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data sama. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai *p value* 0,001 yang berarti *p value* < batas kritis 0,05 maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 1 dan 2.

Pada histogram 2 dan 3, mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data yang tidak sama. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai *p value* 0,004 yang berarti *p value* < batas kritis 0,05 maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 2 dan 3.

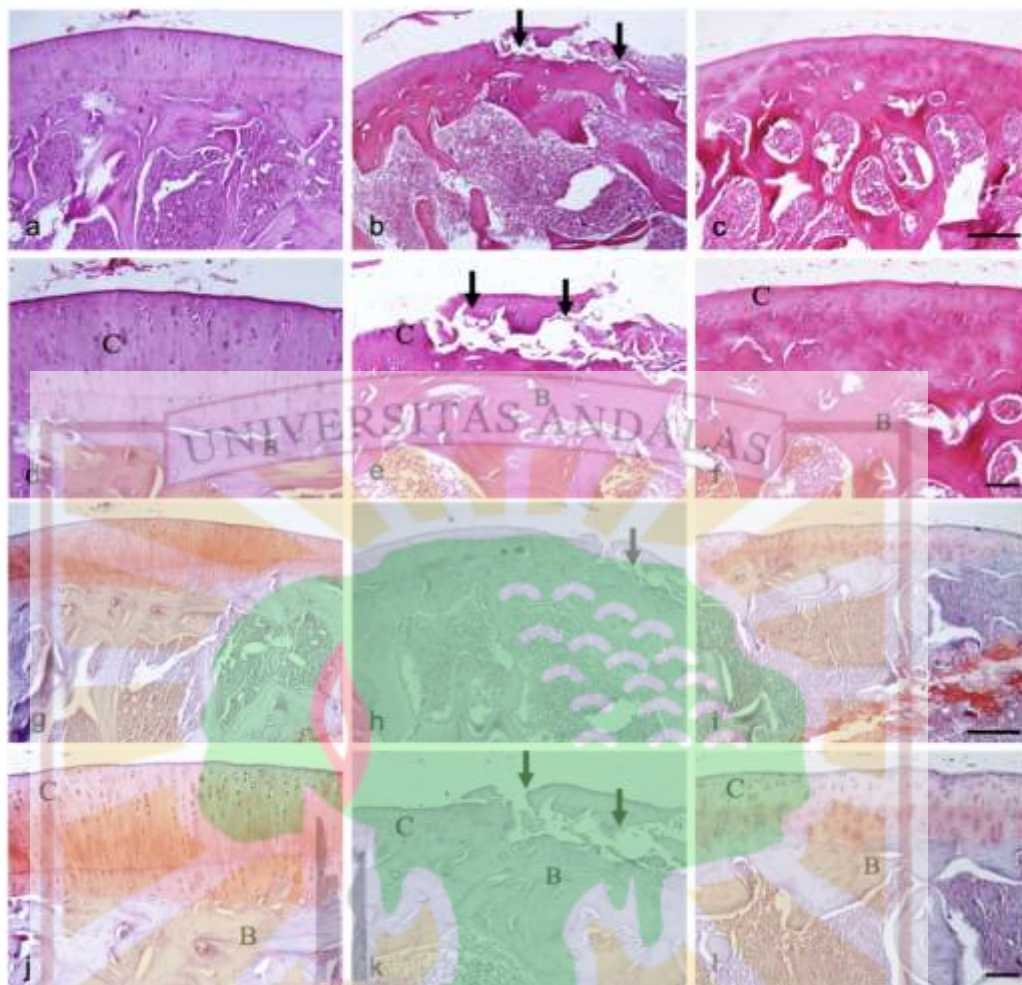
Pada histogram 1 dan 3, mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data yang tidak sama. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai *p value* 0,079 yang berarti *p value* > batas kritis 0,05 maka tidak terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 1 dan 3.

5.4. Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkimal Dari Membran Sinovial Pasien Osteoarthritis Sendi Lutut Derajat IV Terhadap Perbaikan Tulang Rawan Sendi Lutut Tikus Model Osteoarthritis Secara Histopatologis

Setelah dilakukan pemeriksaan radiologis, dilakukan pengambilan sampel sendi lutut tikus bagian kondilus medial femur dan tibia yang difiksasi menggunakan cairan formalin 10% berbuffer *phosphate*, kemudian di dekalsifikasi dalam 8% HCl. Setelah proses dekalsifikasi dilakukan proses blok paraffin dan dipotong dengan microtom ketebalan 4 μ m. Sediaan diwarnai dengan *haematoxylin eosin*(H&E), *safranin O* dan *fast green*.

Prosedur pengukuran dilakukan dengan pemotretan sediaan H&E serta sediaan *Safranin O* dengan mikroskop cahaya *Olympus BX 51* pada perbesaran 200x (*objective 20x*) fotomikrograf pada daerah yang representatif. Penilaian tingkat kerusakan tulang rawan sendi pada gambaran histopatologi menggunakan skor Mankin.

Secara histologis terlihat perbedaan gambaran histologis antara ketiga kelompok hewan coba. Kelompok hewan kontrol negatif dengan gambaran histologis tulang rawan sendi normal pada pewarnaan HE dan intensitas *Safranin* yang kuat.



Gambar 5. 10. Histologi sendi lutut hewan coba pada potongan longitudinal distal femur, memperlihatkan area tulang rawan (C), dan *sub chondral bone* (B), kelompok kontrol negatif (panel kiri (a,d,g,j), kelompok kontrol positif (tengah (b,e,h,k), dan kelompok perlakuan dengan sel punca (panel kanan (c,f,i,l). Tampak kelompok kontrol positif dengan area destruksi permukaan rawan sendi dari lapisan superfisial sampai lapisan deep radial (panah) disertai penurunan pewarnaan *Safranin O*. pemberian sel memperlihatkan perbaikan gambaran histologis rawan sendi serta perbaikan intensitas pewarnaan *Safranin O* dibanding kontrol positif. pada beberapa tempat tampak populasi sel pada rawan sendi meningkat secara fokal terutama pada kelompok perlakuan dengan sel punca. (Pembesaran 20x)

Pada kelompok OA (kontrol positif) yang di induksi MIA tampak tanda kerusakan sendi mulai dari tanda kerusakan ringan berupa iregularitas permukaan sendi di lapisan superfisial, sampai tanda kerusakan berat berupa destruksi rawan sendi sampai ke lapisan radial dalam, disertai dengan berkurangnya intensitas

pewarnaan *Safranin O*. Kelompok perlakuan dengan pemberian SPM-MS memperlihatkan gambaran sendi yang lebih baik dibanding kontrol positif dengan permukaan rawan sendi yang lebih baik, terdapat tanda regenerasi sel ditandai dengan daerah dengan populasi sel yang lebih tinggi pada beberapa tempat, serta intensitas pewarnaan Safranin yang lebih baik dibanding kontrol positif.



Gambar 5. 11. Histologi sendi genu hewan coba pada potongan longitudinal proksimal tibia, memperlihatkan area tulang rawan (C), dan *sub chondral bone* (B), kelompok kontrol negatif (panel kiri (a,d,g,j), kelompok kontrol positif (tengah (b,e,h,k)). Tampak kelompok kontrol positif dengan area destruksi permukaan rawan sendi dari lapisan superfisial sampai lapisan (panah) disertai penurunan pewarnaan *Safranin O*. pemberian sell memperlihatkan perbaikan gambaran histologis rawan sendi serta perbaikan intensitas pewarnaan *Safranin O* dibanding kontrol positif (Pembesaran 20x).

Tabel 5. 4. Tabel derajat Mankin kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Sampel	Kelompok 1 (Kontrol)			Kelompok 2 (OA)			Kelompok 3 (OA+SPM-MS)		
	Skor Mankin		Derajat OA	Skor Mankin		Derajat OA	Skor Mankin		Derajat OA
	Femur	Tibia		Femur	Tibia		Femur	Tibia	
1	0	1	1	6	8	3	5	5	2
2	0	0	1	8	8	3	6	5	3
3	0	2	1	7	7	3	4	4	2
4	0	1	1	8	8	3	5	5	2
5	2	0	1	10	10	4	5	5	2
6	0	2	1	10	10	4	3	3	2
7	1	1	1	8	11	4	3	2	2
8	2	0	1	8	9	3	2	2	2

Berdasarkan pemeriksaan histopatologi dengan penilaian menggunakan skor Mankin dapat dilihat pada tabel diatas adanya kerusakan sendi akibat aplikasi MIA intraartikuler pada kelompok 2 (OA) jika dibandingkan dengan kelompok 1 (kontrol negatif) yang merupakan hewan coba tanpa aplikasi MIA. Aplikasi SPM-MS pada kelompok 3 memperlihatkan derajat kerusakan sendi lebih baik berdasarkan skor Mankin jika dibandingkan dengan kelompok 2.

Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk* pada Skor Mankin Femur, didapatkan nilai *p value* untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0,002, nilai *p value* kelompok kontrol positif didapatkan sebesar 0,195 dan nilai *p value* untuk kelompok perlakuan sebesar 0,512. Sementara pada Skor Mankin Tibia, didapatkan nilai *p value* untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0,067, nilai *p value* kelompok kontrol positif didapatkan sebesar 0,512 dan nilai *p value* untuk kelompok

perlakuan sebesar 0,018. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa data pemeriksaan histopatologis untuk ketiga kelompok tidak berdistribusi normal, karena $p \text{ value} < 0,05$. Oleh karena itu, uji yang digunakan untuk melihat perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan histopatologis berdasarkan klasifikasi Kellgren and Lawrence adalah uji *Kruskal Wallis* yang dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5. 5. Uji Kruskal Wallis pemeriksaan histopatologis kelompok kontrol negatif kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan berdasarkan skor Mankin Femur

Kelompok	N	Median	Minimum	Maximum	P Value
Kelompok 1	8	0	0	2	0,001
Kelompok 2	8	8	6	10	
Kelompok 3	8	4,5	2	6	

Tabel 5. 6. Uji Kruskal Wallis pemeriksaan histopatologis kelompok kontrol negatif kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan berdasarkan skor Mankin Tibia

Kelompok	N	Median	Minimum	Maximum	P Value
Kelompok 1	8	1	0	2	0,001
Kelompok 2	8	8,5	7	11	
Kelompok 3	8	4,5	2	5	

Ketentuan pengambilan keputusan pada Uji *Kruskal Wallis* adalah:

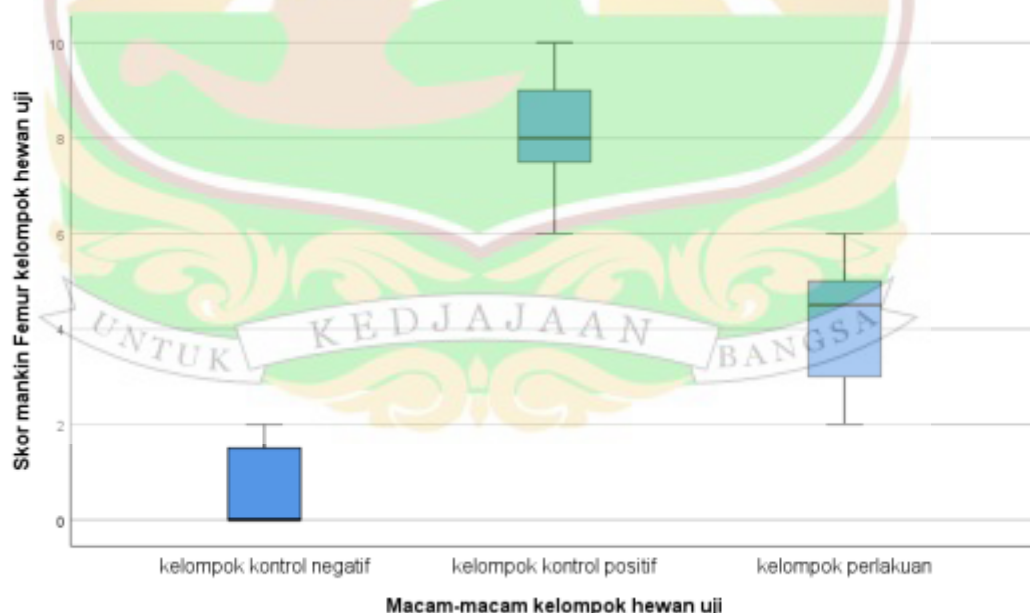
1. Jika nilai $p \text{ value} > 0,05$, maka tidak ada perbedaan atau H_0 diterima
2. Jika nilai $p \text{ value} < 0,05$, maka ada perbedaan atau H_0 ditolak

Berdasarkan hasil analisis statistika di atas, Skor Mankin femur diketahui terdapat nilai median untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0, kelompok kontrol positif sebesar 8 dan kelompok perlakuan sebesar 4,5. Nilai minimum untuk

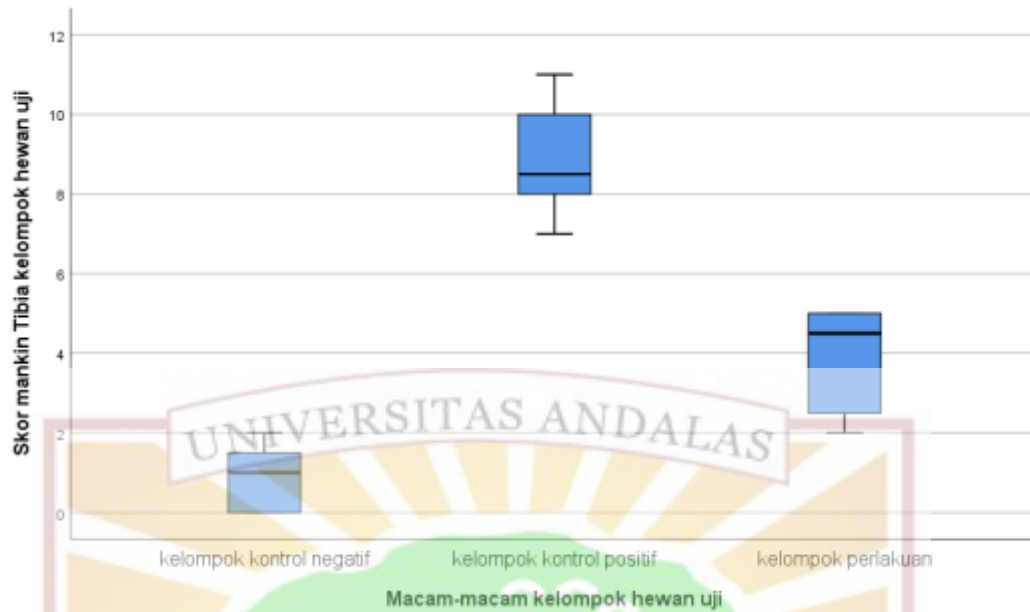
kelompok kontrol negatif sebesar 0, kelompok kontrol positif sebesar 6, dan kelompok perlakuan sebesar 2. Nilai maksimum untuk kelompok kontrol negatif sebesar 2, kelompok kontrol positif sebesar 10, dan kelompok perlakuan sebesar 6.

Sementara untuk Skor Mankin Tibia, didapatkan nilai median untuk kelompok kontrol negatif sebesar 1, kelompok kontrol positif sebesar 8,5 dan kelompok perlakuan sebesar 4,5. Nilai minimum untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0, kelompok kontrol positif sebesar 7, dan kelompok perlakuan sebesar 2. Nilai maksimum untuk kelompok kontrol negatif sebesar 2, kelompok kontrol positif sebesar 11, dan kelompok perlakuan sebesar 5.

Nilai *p value* Skor Mankin femur dan tibia untuk ketiga kelompok hewan uji tersebut adalah sebesar $0,001 < 0,05$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak dan H_a diterima yang berarti ada perbedaan yang signifikan antara ketiga nilai derajat OA berdasarkan Skor Mankin.



Gambar 5. 12. Grafik *box plot* analisa histopatologi skor mankin femur pasca aplikasi SPM-MS pada hewan coba yang terdiri dari kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (OA) dan kelompok 3 (OA+SPM-MS).



Gambar 5. 13. Grafik *box plot* analisa histopatologi skor mankin tibia pasca aplikasi SPM-MS pada hewan coba yang terdiri dari kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (OA) dan kelompok 3 (OA+SPM-MS).

Tabel 5. 7. Uji *Mann Whitney U* pemeriksaan histopatologis kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan berdasarkan Skor Mankin femur

Kelompok	<i>p value (homogeneity of variances)</i>	<i>p value</i>
1 dan 2	0,662	0,001
2 dan 3	0,640	0,001
1 dan 3	0,205	0,001

Pada Skor Mankin femur, hubungan antara semua kelompok data adalah homogen karena didapatkan *p value* pada *Levene test* > 0,05. Histogram yang terdapat pada kelompok data 1 dan 2 mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang berbeda serta puncak tertinggi yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data berbeda dan terdapat perbedaan median antara kelompok hewan uji 1 dan 2. Pada uji *Mann Whitney U*, didapatkan nilai *p value* 0,001 yang

berarti p value < batas kritis 0,05, maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 1 dan 2.

Pada histogram 2 dan 3, mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang sama serta puncak tertinggi yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data yang sama dan terdapat perbedaan median antara kelompok hewan uji 2 dan 3. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai p value 0,001 yang berarti p value < batas kritis 0,05 maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 2 dan 3.

Pada histogram 1 dan 3, mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang berbeda serta puncak tertinggi yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data berbeda dan terdapat perbedaan median antara kelompok hewan uji 1 dan 3. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai p value 0,001 yang berarti p value < batas kritis 0,05, maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 1 dan 3.

Tabel 5. 8. Uji *Mann Whitney U* pemeriksaan histopatologis kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan berdasarkan Skor Mankin tibia

Kelompok	p value (homogeneity of variances)	p value
1 dan 2	0,108	0,001
2 dan 3	0,918	0,001
1 dan 3	0,069	0,001

Pada Skor Mankin tibia, hubungan antara semua kelompok data adalah homogen karena didapatkan p value pada *Levene test* > 0,05. Histogram yang terdapat pada kelompok data 1 dan 2 mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang berbeda serta puncak tertinggi yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa bentuk

dan penyebaran data berbeda dan terdapat perbedaan median antara kelompok hewan uji 1 dan 2 . Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai *p value* 0,001 yang berarti *p value* < batas kritis 0,05 maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 1 dan 2.

Histogram 2 dan 3 mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang sama serta puncak tertinggi yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran data sama dan terdapat perbedaan median antara kelompok hewan uji 2 dan 3. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai *p value* 0,001 yang berarti *p value* < batas kritis 0,05, maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 2 dan 3.

Histogram 1 dan 3 mempunyai bentuk kemiringan dan lebar yang berbeda serta puncak tertinggi yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa bentuk dan penyebaran berbeda dan terdapat perbedaan median antara kelompok hewan uji 1 dan 3. Pada uji Mann Whitney U, didapatkan nilai *p value* 0,001 yang berarti *p value* < batas kritis 0,05, maka terdapat perbedaan bermakna rata-rata antara kelompok hewan uji 1 dan 3.

5.5. Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkimal Dari Membran Sinovial Pasien Osteoartritis Derajat IV Terhadap Perbaikan Tulang Rawan Sendi Lutut Tikus Model Osteoartritis Terhadap Ekspresi Gen COL-2

Sampel jaringan sendi lutut ketiga kelompok hewan coba dilakukan pemeriksaan dengan RT-qPCR untuk menentukan kadar kolagen tipe-2. Kolagen tipe 2 merupakan salah satu komponen ekstraseluler matriks dalam jaringan tulang rawan yang memiliki peranan penting dalam proses pembentukan kondrosit yang dapat terspesialisasi menjadi kartilago. Kerusakan atau degradasi pada kolagen tipe 2 menjadi peristiwa penting dalam patologi penyakit osteoartritis. Oleh karena itu

pada penelitian dilakukan penentuan kadar ekspresi gen kolagen tipe 2 pada ketiga kelompok hewan coba untuk mengetahui efek aplikasi SPM-MS terhadap regulasi kadar ekspresi gen kolagen tipe 2 pada hewan coba yang telah di induksi penyakit OA.

Pemeriksaan dengan RT-qPCR diawali dengan mengisolasi RNA dari sampel jaringan lutut hewan coba yang telah di berikan perlakuan. Isolasi RNA dilakukan menggunakan reagent GENEzol™ Reagent – Geneaid, dan prosedur isolasi mengikuti petunjuk manufaktur. Semua RNA yang telah diisolasi kemudian ditentukan konsentrasinya menggunakan alat nanodrop yang prinsip kerjanya adalah spektrofotometri. RNA hasil isolasi kemudian disimpan pada freezer -80 °C. Sebelum digunakan untuk analisa dengan RT-qPCR, terlebih dahulu dilakukan proses sintesis cDNA dari RNA hasil isolasi. Pada penelitian ini sintesis cDNA dilakukan menggunakan reagent SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit. Sintesis cDNA adalah proses mengubah rantai RNA menjadi *complement* RNA (cDNA) yang digunakan sebagai *template* DNA sampel dalam proses analisa RT-qPCR. Reagen yang digunakan untuk analisa RT-qPCR pada penelitian ini adalah SensiFAST™ SYBR® No-ROX- *Bioline* menggunakan primer gen kolagen tipe-2 yang telah didesain secara khusus. *Design* primer kolagen tipe 2 yang digunakan pada penelitian ini dapat di lihat pada table 5.6. Pengambilan data untuk analisa ekspresi gen kolagen tipe-2 dilakukan secara duplo. Hasil kuantifikasi analisa ekspresi gen kolagen tipe 2 menggunakan RT-qPCR dapat terlihat pada tabel 5.7.

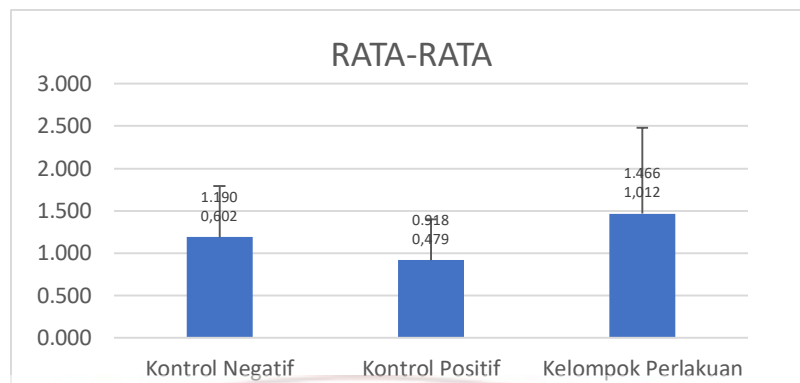
Tabel 5. 9. Primer kolagen tipe 2

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Amplicon
Kolagen Tipe 2	CTCCGTCTACT GTCCACTGAG	GTTTCGTGCAG CCATCCTTCAG	190 bp

Tabel 5. 10. Data kuantifikasi *relative level* ekspresi gen kolagen tipe 2 terhadap GAPDH berdasarkan hasil analisa RT-Qpcr

Sampel	Kelompok 1 (kontrol)	Kelompok 2 (OA)	Kelompok 3 (OA+SPM-MS)
1	0,49	0,76	0,49
2	1,32	0,93	1,03
3	1,35	2,03	1,30
4	2,28	0,98	3,54
5	0,43	0,66	1,28
6	1,50	0,44	0,74
7	1,32	0,79	0,95
8	0,83	0,75	2,40

Sampel jaringan lutut pada ke tiga hewan coba yang diberikan perlakuan selama 3 minggu diperoleh hasil yang terlihat pada gambar 5.13. Pada grafik dapat terlihat bahwa level ekspresi kolagen tipe-2 pada kelompok 2 yakni kelompok hewan coba yang diinduksi OA jika di bandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu kelompok 1 terdapat perbedaan. Hal ini sesuai dengan literatur sebagaimana pada kondisi patologi OA akan terjadi proses degradasi kolagen tipe 2. Selanjutnya, dari grafik juga terlihat bahwa dengan menyertakan aplikasi SPM-MS pada hewan coba yang di induksi OA terjadi memperlihatkan hasil level ekspresi gen yang lebih tinggi.



Gambar 5. 14. Grafik *error bar* hasil analisa ekspresi gen kolagen tipe 2 pada hewan coba model OA, kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (OA), dan kelompok 3 (OA+SPM-MS)

Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk* pada didapatkan nilai *p value* untuk kelompok kontrol negatif sebesar 0,440, nilai *p value* kelompok kontrol positif sebesar 0,080 dan nilai *p value* untuk kelompok perlakuan sebesar 0,066.

Tabel 5. 11. Uji *one-way* anova level ekspresi gen kolagen tipe-2 kelompok kontrol negatif, kelompok positif, dan kelompok perlakuan

Kelompok	Mean	Std.Deviation	Test of Homogeneity of Variances (p value)	p value
Kelompok 1	1,190	0,602		
Kelompok 2	0,917	0,478	0,157	0,346
Kelompok 3	1,466	1,012		

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa data level ekspresi gen kolagen tipe-2 untuk ketiga kelompok adalah berdistribusi normal, karena *p value* > 0,05. Oleh karena itu, uji yang digunakan untuk melihat perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan level ekspresi gen kolagen tipe-2 adalah *one-way* anova yang dapat dilihat pada table 5.8.

Pada tabel 5.8. di atas, didapatkan nilai *p value* untuk test of *homogeneity of variances* pada *Levene test* sebesar 0,157. Karena nilai signifikansi 0,157 lebih

besar dari 0,05, maka varian level ekspresi gen kolagen tipe-2 ketiga kelompok hewan uji tersebut adalah sama atau homogen. Maka dapat disimpulkan bahwa uji *one-way* anova tepat pada kelompok data ini.

Ketentuan pengambilan keputusan pada Uji *One Way* Anova adalah:

1. Jika nilai p value $> 0,05$, maka tidak ada perbedaan atau H_0 diterima
2. Jika nilai p value $< 0,05$, maka ada perbedaan atau H_0 ditolak

Nilai p untuk rata-rata level ekspresi gen kolagen tipe-2 ketiga kelompok hewan uji tersebut adalah 0,346, artinya H_0 diterima dan tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna dimana p value tidak memenuhi signifikansi $p < 0,05$.

5.6. Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkimal Dari Membran Sinovial Pasien Osteoarthritis Derajat IV Terhadap Perbaikan Tulang Rawan Sendi Lutut Tikus Model Osteoarthritis Terhadap Kadar Enzim MMP-13

Sampel jaringan yang didapat dari sendi lutut hewan coba ditambahkan 10 μ l PBS setiap 1 mg jaringan dan dihaluskan menggunakan *homogenizer*. *Extract crude protein* masing masing sampel dilakukan penentuan kadar MMP-13 dengan metoda ELISA di laboratorium Biomedik FK Unand. Reagen yang digunakan untuk penentuan kadar MMP-13 pada penelitian ini yaitu Kit ELISA Rat MMP13 *Bioassay Technology Laboratory*. Hasil pengukuran kadar MMP-13 pada ketiga kelompok hewan coba dengan metode ELISA diperoleh seperti yang terlihat pada tabel 5.9.

Ditinjau dari kadar MMP-13 yang diperoleh terlihat bahwa kadar MMP-13 pada ketiga kelompok hewan coba cenderung tetap yakni rata-rata kadar MMP-13 pada masing-masing kelompok berkisar 5,560 ng/mL pada kelompok 1, 5,593 ng/mL pada kelompok 2, dan 5,653 ng/mL pada kelompok 3. Grafik kadar MMP-

13 pada hewan coba berdasarkan kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 5.15.

Tabel 5. 12. Data hasil penentuan kadar MMP-13 berdasarkan kelompok perlakuan

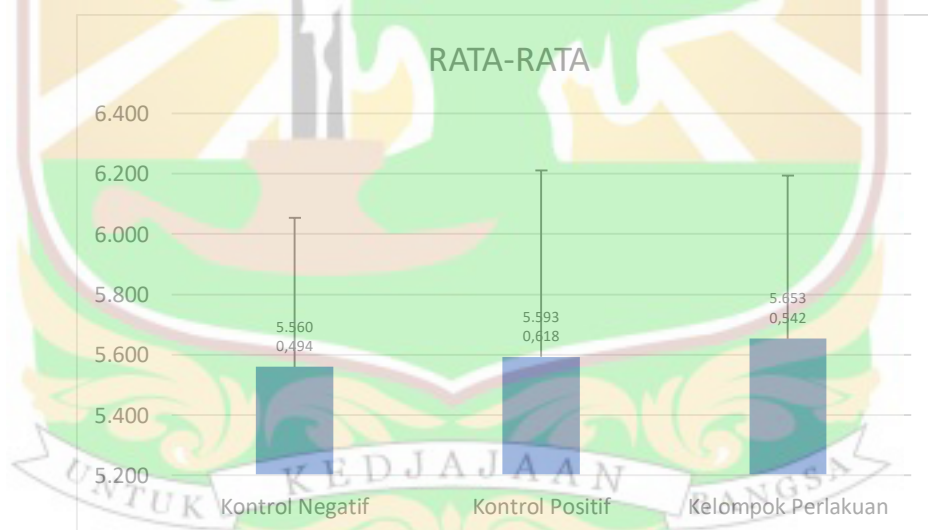
Sampel	Kelompok 1 (kontrol) (ng/mL)	Kelompok 2 (OA) (ng/mL)	Kelompok 3 (OA + SPM-MS) (ng/mL)
1	5,04	5,795	4,982
2	5,025	5,475	5,504
3	5,78	5,809	5,751
4	5,243	6,012	5,272
5	6,419	4,662	6,114
6	6,056	6,462	6,52
7	5,475	4,735	5,069
8	5,446	5,795	6,012
Rata-rata	5,560	5,593	5,653

Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, nilai *p value* untuk kelompok kontrol negatif adalah sebesar 0,510, nilai *p value* kelompok kontrol positif sebesar 0,287 dan nilai *p value* untuk kelompok perlakuan sebesar 0,783. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa data pemeriksaan kadar MMP-13 untuk ketiga kelompok adalah berdistribusi normal, karena *p value* > 0,05. Oleh karena itu, uji yang digunakan untuk melihat perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan kadar MMP-13 adalah uji *one-way* anova yang dapat dilihat pada tabel 5.13.

Tabel 5. 13. Uji *one way* anova kadar MMP-13 kelompok kontrol negatif, kelompok positif, dan kelompok perlakuan

Kelompok	Mean	Std.Deviation	Test of Homogeneity of Variances (p value)	p value
Kelompok 1	5,560	0,494		
Kelompok 2	5,593	0,618	0,848	0,944
Kelompok 3	5,653	0,542		

Pada tabel di atas, didapatkan nilai *p value* untuk *test of homogeneity of variances* sebesar 0,848. Karena nilai signifikansi 0,848 lebih besar dari 0,05, maka varian kadar MMP-13 ketiga kelompok hewan uji tersebut adalah sama atau homogen. Maka dapat disimpulkan bahwa uji *one-way* anova tepat pada kelompok data ini.



Gambar 5. 15. Grafik *error bar* kadar MMP-13 pada hewan coba berdasarkan kelompok perlakuan, kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (OA), dan kelompok 3 (OA+SPM-MS).

Rata-rata kadar MMP-13 ketiga kelompok hewan uji tersebut tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna karena diperoleh nilai $p = 0,944$, dimana p tidak memenuhi signifikansi $p < 0,05$.