

Perpanjangan Usia Tikus Tua Setelah Xenotransplantasi *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUC-MSCs)*

*(PROLONGED LIFESPAN OF AGING RAT AFTER XENOTRANPLANTATION
OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS (hUC-MSCs))*

**Elpita Tarigan¹, Adisti Dwijayanti²,
Frans Dhyana Giri Suyatna³, Indra Bachtiar⁴,
Sandy Qlintang⁴, I Ketut Mudite Adnyane¹, Arief Boediono^{1*}**

¹Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16680

²Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran
Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya No 6, Jakarta, Indonesia, 10430

³Departemen Farmakologi Klinik dan Terapeutik
Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya No 6, Jakarta, Indonesia, 10430

⁴Stem Cell and Cancer Institute
Jl. A Yani No2, Pulo Mas, Jakarta, Indonesia, 13210

*Email: ab@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Currently, mesenchymal stem cells (MSCs) for implementing regenerative medicine in aging become interest in medical research science, especially in degenerative disease and other aging problems. This research was aimed to determine the effectiveness of hUC-MSCs on inhibiting the aging process through the lifetime of the rat and the effect of intravenous administration of hUC-MSCs in physiologically aging female rat on the blood analysis. This study was used 40 aged female rats with 29-30 months of age divided into four groups with 10 rats each. The control rat group was given physiological NaCl (0.9%) 0.5 mL, and the treated rat group was given hUC-MSCs 1×10^7 cells/kg body weight in 0.5 mL NaCl 0.9%, was injected intravenously in caudo lateralis tail vein with stratified frequency; one time injection (SC1), three times injections (SC3) and five times injections (SC5). Perifer blood was collected from retro-orbital sinus vein 30 days before and after injection of hUC-MSCs for hematology and blood chemistry analysis. Based on the results were obtained, it indicated that hUC-MSCs increased the survival of aging rat were in treatment group, life span of rats was extended up to 40 months compared to the average life of control rat aged up to 34 ± 2 months. The injection of hUC-MSCs 1×10^7 cells/kg of body weight with one, three and five times injection were affected to blood profiles and blood chemistry with correlation were low. The conclusions are hUC-MSCs extend the lifespan of aging rat and were affect the blood in general but in normal range of aging rat, affect in ALT and creatinin as tissue repair and tolerated by aging rat.

Keywords: aging; hUC-MSCs; blood; lifespan

ABSTRAK

Saat ini, implementasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) untuk terapi regeneratif menjadi hal yang menarik pada penelitian bidang medis. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat efektivitas hUC-MSCs dalam menghambat proses penuaan melalui masa hidup tikus dan mengetahui efek dari penyuntikan secara intravena hUC-MSCs *xenogenic* pada tikus betina tua (secara normal fisiologis) terhadap gambaran darah. Penelitian ini menggunakan 40 ekor tikus betina tua usia 29-30 bulan yang dibagi menjadi empat kelompok dengan jumlah masing-masing 10 ekor tikus. Kelompok tikus kontrol diberikan NaCl fisiologis (0,9%) 0,5 mL, dan kelompok tikus perlakuan diberikan hUC-MSCs 1×10^7 sel/

kg berat badan (BB) 0,5 mL secara intravena melalui vena *lateralis caudalis* di ekor dengan frekuensi bertingkat; satu kali penyuntikan (SC1), tiga kali penyuntikan (SC3) dan 5 kali penyuntikan (SC5) dengan interval satu bulan. Pengambilan darah perifer dilakukan melalui sinus retro-orbitalis 30 hari sebelum dan sesudah penyuntikan hUC-MSCs untuk pemeriksaan darah lengkap dan biokimiawi darah. Berdasarkan hasil yang diperoleh, hUC-MSCs meningkatkan survival dari tikus tua, masa hidup tikus pada kelompok perlakuan diperpanjang hingga usia 40 bulan dibandingkan dengan rata-rata hidup tikus kontrol yang berusia hingga 34±2 bulan. Penyuntikan hUC-MSCs 1×10^7 sel/kg berat badan dengan frekuensi satu, tiga dan lima kali memengaruhi parameter darah dan biokimiawi darah dengan korelasi yang rendah. Kesimpulan penelitian ini adalah hUC-MSCs memperpanjang usia tikus tua dan hUC-MSCs memengaruhi perubahan darah secara umum namun dalam kisaran normal tikus tua, perubahan ALT dan kreatinin mengarah ke perbaikan jaringan, dan hUC-MSCs ditoleransi secara klinis oleh tikus tua.

Kata-kata kunci: penuaan; hUC-MSCs; darah; usia

PENDAHULUAN

Penyakit degeneratif akibat senilitas merupakan penyakit yang semakin banyak diderita oleh masyarakat di seluruh dunia. Pada keadaan senilitas, degenerasi lebih tinggi terjadi daripada tingkat regenerasi sel, menyebabkan semakin turunnya fungsi jaringan hingga organ, terjadinya akumulasi kerusakan sel, inflamasi dan *immunosenescence* (Franceschi dan Campisi, 2014; Gonzalez *et al.*, 2015). Inovasi-inovasi terus dilakukan untuk meningkatkan efektivitas pencegahan penyakit degeneratif akibat senilitas (Tran dan Damaser 2015; Schulman *et al.*, 2018). Salah satunya penyuntikan *umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs)*, dimana *stem cells* akan berfungsi sebagai *cell replacement* untuk resipien yang sesuai dan efek parakrin untuk resipien yang tidak sesuai (Nagamura 2014; Sane *et al.*, 2019). *Cell replacement* atau penggantian sel, diharapkan penyuntikan *stem cells* pada resipien yang sama (*autologus* atau *allogenic*) dapat menggantikan sel yang rusak dengan meningkatkan regenerasi sel sehingga mampu mengembalikan fungsi jaringan hingga organ (Gonzalez *et al.*, 2015; Tran dan Damaser 2015; Pittenger *et al.*, 2019). Efek induksi parakrin, melalui penyuntikan *stem cells* pada resipien (xeno-transplantation) mampu menggerakkan mekanisme biokimiawi dalam tubuh untuk menciptakan medium atau lingkungan yang sesuai sehingga sel yang rusak mampu melakukan regenerasi dengan baik (Schulman *et al.*, 2018; Sane *et al.*, 2019). Penyuntikan hUC-MSCs meningkat untuk pengobatan regenerasi jaringan (Nagamura 2014; Ullah *et al.*, 2015; Bartolucci *et al.*, 2017; Sane *et al.*, 2019). Efek regenerasi *stem cells* dimediasi oleh kemampuannya mensekresikan metabolit-metabolit bioaktif. Faktor-faktor yang

disekresikan oleh hUC-MSCs meliputi *growth factor* dan sitokin (secretome), exosome, dan mikrovesikel (Tran dan Damaser 2015; Chen *et al.*, 2016; Bartolucci *et al.*, 2017; Eleuteri dan Fierabracci 2019). Perubahan beberapa parameter darah terjadi baik pada manusia ataupun hewan tua, ada yang mengalami penurunan dan ada yang mengalami kenaikan seiring bertambahnya usia. Penyuntikan hUC-MSCs secara intravena sudah dilakukan pada fase *clinical trial* (Park *et al.*, 2018), namun informasi perubahan gambaran darah pada hewan percobaan akibat penyuntikan hUC-MSCs masih terbatas.

Penelitian penyuntikan hUC-MSCs secara *in-vivo* pada tikus semakin meningkat jumlahnya, namun informasi mengenai gambaran hematologi dan biokimiawi darah setelah penyuntikan *stem cells* masih terbatas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas penyuntikan intravena hUC-MSCs *xenogenic* dalam meningkatkan kualitas hidup dan untuk mengetahui respon fisiologis pada gambaran patologi klinik darah perifer setelah disuntik hUC-MSCs.

METODE PENELITIAN

Pemeliharaan Hewan Coba.

Sebanyak 40 ekor tikus strain Sprague Dawley usia 29-30 bulan dengan jenis kelamin betina, sehat, dan telah diaklimatisasi. Pakan yang digunakan adalah pakan standar rodensia yang komposisinya mengacu pada Harlan Laboratories (2014) dengan standar pemenuhan kebutuhan metabolisme basal. Air minum yang digunakan adalah air mineral komersial yang ditambahkan *hydrochloric acid (HCl)* 1N. Pemberian pakan dan minum dilakukan secara *ad libitum* serta pemeliharaan memenuhi

kaidah pemeliharaan hewan laboratorium pada panduan komisi etik hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor dengan No: 5-2016 RSHP FKH-IPB.

Penyediaan hUC-MSCs.

Sumber hUC-MSCs diperoleh dari Stem Cell and Cancer Institute PT Kalbe Farma Jakarta, dan telah dikarakterisasi terhadap marker CD105, CD73, CD90, CD34, CD45, CD14, CD19, dan HLA-II (Sidharta *et al.*, 2018). Tikus tua dibagi menjadi 4 kelompok dengan jumlah masing-masing 10 ekor tikus. Kelompok tikus kontrol diberikan NaCl fisiologis (0,9%) 0,5 mL, dan kelompok tikus perlakuan diberikan hUC-MSCs 1×10^6 sel/kg berat badan (BB) 0,5 mL dengan frekuensi bertingkat; satu kali penyuntikan (SC1), tiga kali penyuntikan (SC3) dan lima kali penyuntikan (SC5) dengan interval penyuntikan satu bulan. Rute penyuntikan secara intravena pada vena *lateralis caudalis* di ekor.

Pengamatan Kemampuan Hidup Tikus Tua

Tikus dipelihara sebanyak dua ekor pada setiap kandang, pengamatan masa hidup dimulai dari sejak awal aklimatisasi hingga waktu terminasi yaitu 36 minggu setelah penyuntikan hUC-MSCs. Kondisi tikus diamati setiap hari dan data tikus yang mati dicatat sesuai tanggal kematian.

Pemeriksaan Darah Lengkap dan Kimia Darah.

Pengambilan darah dilakukan melalui sinus retro-orbitalis sebanyak ± 2 mL 30 hari sebelum dan sesudah penyuntikan *stem cells*. Proses pengambilan darah dilakukan setelah hewan dianaestesi dengan Ketamin-Xilazyn *cocktails*, dengan dosis Ketamin 75-150mg/kgBB dan Xylazyn 20mg/kgBB secara intraperitoneal. Hematologi lengkap dan biokimiawi darah diukur dengan alat Mindray *hematology analyzer*. Parameter yang diamati adalah jumlah leukosit total, jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, trombosit, jenis sel leukosit (limfosit, monosit, granulosit), nilai hematokrit (Hct), indek eritrosit yaitu *mean corpuscular volume* (MCV), *mean corpuscular haemoglobin* (MCH) dan *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC). Parameter biokimiawi darah yang diamati adalah *serum glutamic oxaloacetic transaminase* (SGOT) atau aspartate transaminase (AST), *serum glutamic*

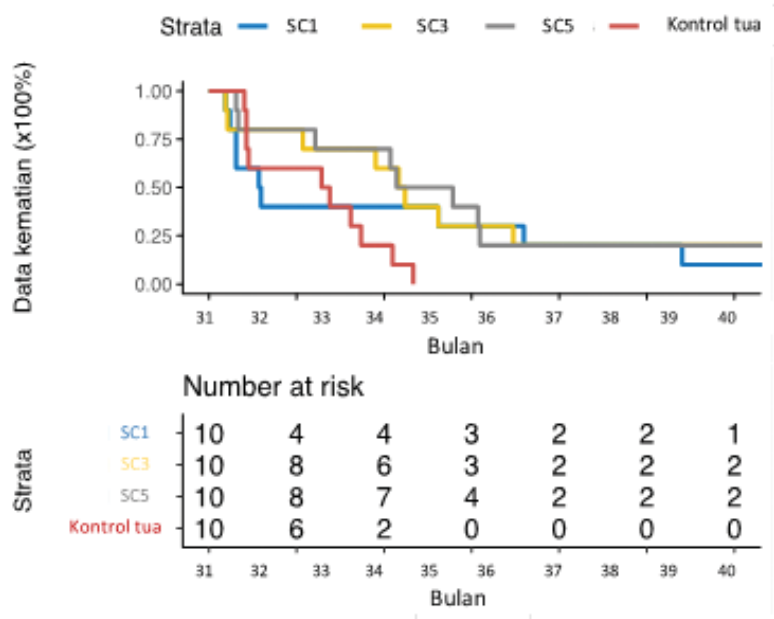
pyruvic transaminase (SGPT) atau alanine transaminase (ALT), *blood urea nitrogen* (BUN) dan kreatinin. Data dianalisis statistika dengan *software R* ver 3.6.1. untuk data perbandingan antar kelompok diuji dengan Wilcoxon *rank sum test*. Data korelasi antara jumlah injeksi dengan perubahan fisiologi darah diukur dengan metode Pearson serta perubahan profil darah sebelum dan sesudah penyuntikan *stem cells* dengan *Fold Change* (FC). Penghitungan FC dilakukan menurut Vaes *et al.* (2014) dengan formula, $FC = \frac{\ln(x) - \ln(y)}{\ln(x) + \ln(y)}$. Dalam formula tersebut x adalah data setelah penyuntikan hUC-MSCs dan y adalah data sebelum penyuntikan hUC-MSCs. Interpretasi hasil berupa *upregulation* ($FC > 0$) dan *down regulation* ($FC < 0$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

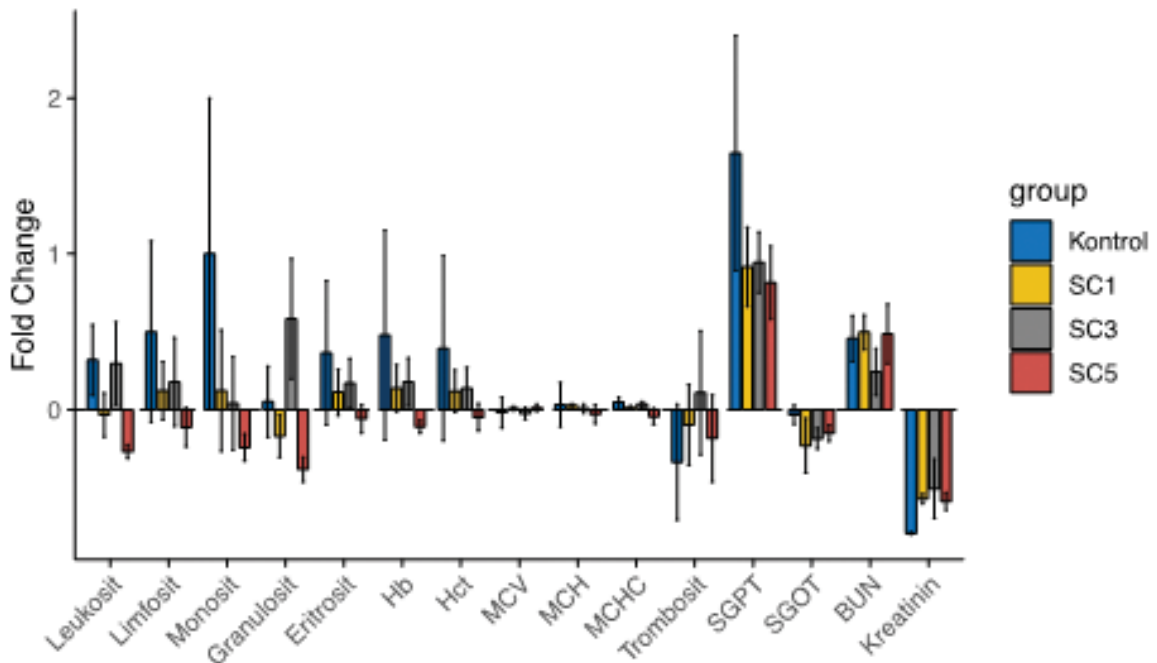
Kemampuan Hidup Tikus.

Hasil data kemampuan hidup tikus menunjukkan bahwa kelompok kontrol tanpa penyuntikan hUC-MSCs mengalami kematian mulai pada usia 32 bulan hingga 36 bulan (minggu ke tiga hingga minggu ke 12 setelah jadwal pertama penyuntikan hUC-MSCs) lalu semua kontrol mengalami kematian pada usia 36 bulan. Kelompok tikus tua yang mendapatkan penyuntikan hUC-MSCs dengan frekuensi satu kali menunjukkan kematian 60% pada usia 33 bulan, yaitu 4 minggu setelah penyuntikan hUC-MSCs, kemudian mati secara berurutan di bulan ke 36, 38, 39 dan tersisa 1 ekor di akhir penelitian dengan usia 40 bulan (minggu ke 36 setelah penyuntikan hUC-MSCs). Kelompok SC3 dengan frekuensi penyuntikan 3 kali menunjukkan kematian bertahap setiap bulan 33, 34, 35, 36, 37 dan 2 ekor bertahan hingga akhir penelitian. Kelompok SC5 dengan frekuensi penyuntikan 5 kali mengalami kematian dengan graduasi waktu 33, 34, 35, 36 minggu dan bertahan hingga terminasi sebanyak 2 ekor (Gambar 1).

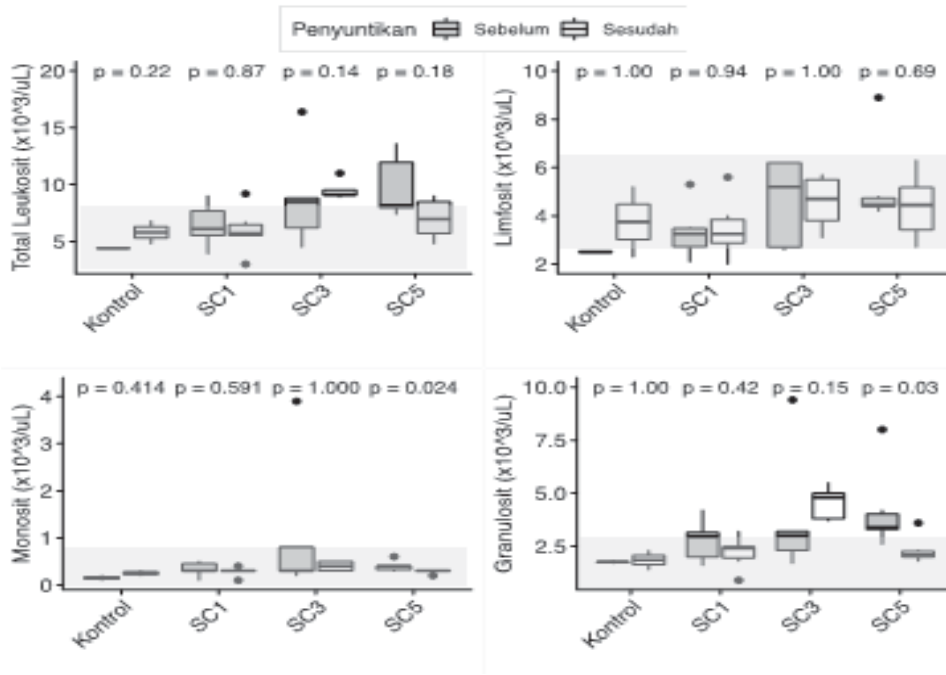
Hasil penelitian ini menunjukkan penyuntikan hUC-MSCs meningkatkan daya hidup tikus tua. Hasil yang sama ditunjukkan oleh Mansilla *et al.* (2016) yang menggunakan tikus muda usia enam bulan dan penyuntikan hUC-MSCs setiap dua minggu hingga waktu terminasi, hasil mereka menunjukkan survival tikus hingga usia 44 bulan. Rata-rata masa hidup tikus di laboratorium mencapai hingga tiga tahun dan biasanya diperlakukan dengan limitasi kalori untuk memperpanjang usia tikus



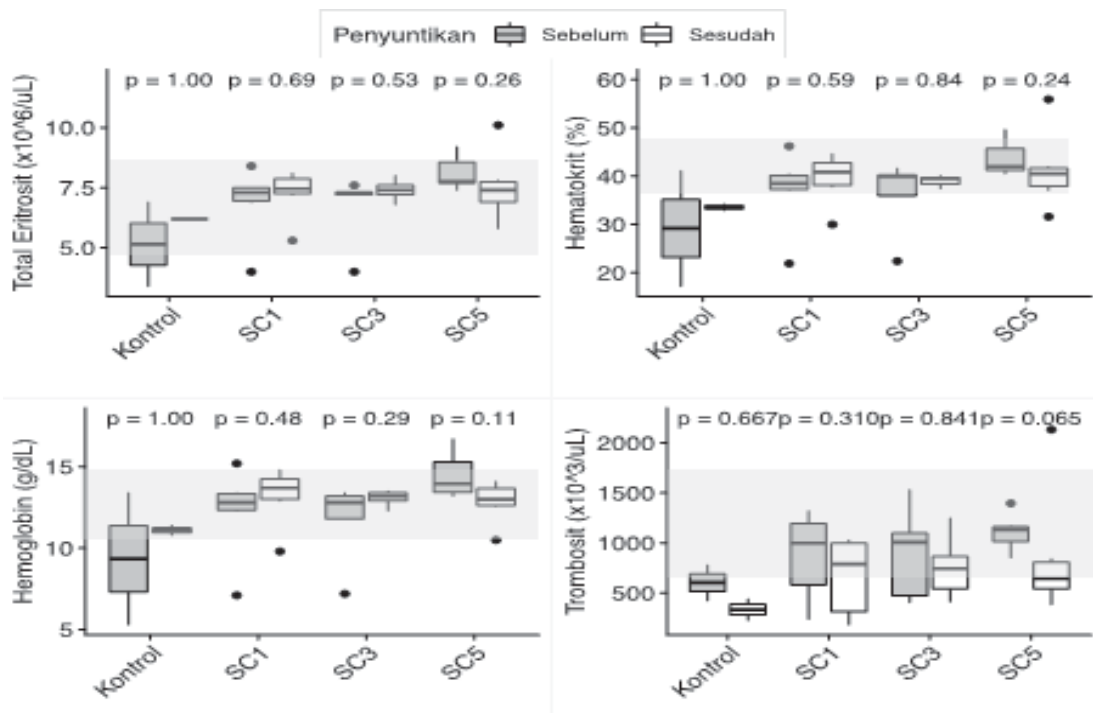
Gambar 1. Data kematian tikus tua dengan analisa survival analysis pada R software ver 3.6.1. Tikus kelompok kontrol tua mati secara gradual dan total mati pada usia 36 bulan (15 minggu setelah jadwal pertama penyuntikan hUC-MSCs). Tikus kelompok yang disuntik hUC-MSCs 1 kali (SC1), 3 kali (SC3) dan 5 kali (SC5) mengalami kematian gradual dan masih hidup lebih dari usia 40 bulan (36 minggu setelah penyuntikan hUC-MSCs).



Gambar 2. *Fold Change* (FC) gambaran darah lengkap sebelum penyuntikan hUC-MSCs dan setelah penyuntikan hUC-MSCs. Interpretasi hasil berupa *upregulation* (FC>0) dan *down regulation* (FC<0).



Gambar 3. Gambaran leukosit, limfosit, monosit, dan granulosit sebelum dan sesudah penyuntikan hUC-MSCs. Penurunan jumlah total leukosit dan monosit akibat penyuntikan hUC-MSCs SC1 dan SC5, peningkatan leukosit pada SC3, jumlah granulosit meningkat pada SC3. Perubahan yang terjadi masih dalam ambang batas normal fisiologis (kotak hijau).



Gambar 4. Gambaran eritrosit, trombosit serta Hb sebelum dan sesudah penyuntikan hUC-MSCs. Gambaran eritrosit menunjukkan peningkatan hingga diatas ambang batas normal pada kelompok perlakuan yang disuntik dengan hUC-MSCs sebanyak lima kali, sedangkan Hb dan trombosit kenaikan masih dalam ambang batas normal, (kotak hijau).

(JHU-ACUC). Usia tikus tua rata-rata 24-26 bulan dan mulai mengalami kematian dengan progresif sekitar usia 30-36 bulan (Mansilla *et al.*, 2016). Usia tikus tua dengan kriteria 29-30 bulan sama dengan usia manusia 75 tahun (Andreollo *et al.*, 2012; Sengupta 2013). Penggunaan tikus tua secara fisiologis diharapkan mewakili perlakuan terhadap manusia yang mengalami penuaan. Usia 36 bulan tikus tua sama dengan usia 90 tahun manusia dan usia 40-42 bulan pada tikus tua setara dengan usia 105 tahun pada manusia (Andreollo *et al.*, 2012; Sengupta 2013). Pada penelitian ini rata-rata usia hidup tikus kontrol adalah 34 bulan dan usia tikus perlakuan bertambah mencapai 40 bulan, sehingga dapat dikatakan bahwa penyuntikan hUC-MSCs memengaruhi perpanjangan masa hidup tikus. Frekuensi penyuntikan 1 kali, tiga kali dan lima kali menunjukkan hasil yang sama memperpanjang usia tikus, namun terlihat penyuntikan tiga sampai lima kali jumlah tikus tua yang bertahan hidup lebih banyak.

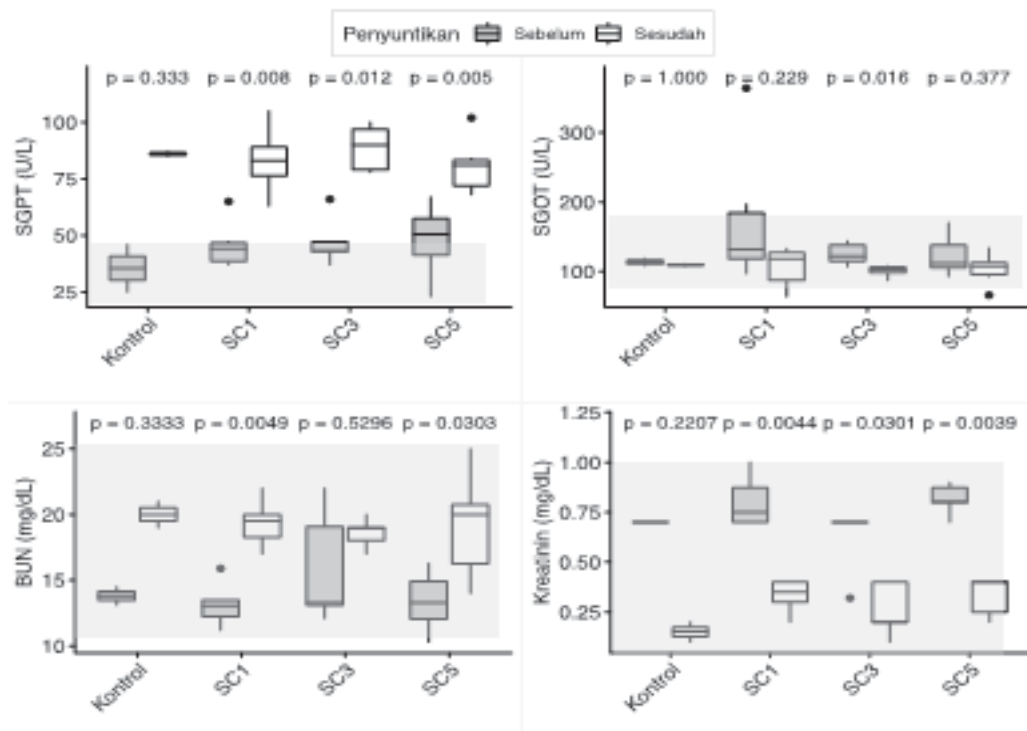
Pemeriksaan Profil Leukosit.

Perbedaan rata-rata pemeriksaan darah lengkap sebelum dan sesudah penyuntikan hUC-MSCs tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0.05$) baik pada kelompok Kontrol, SC1, SC3 dan SC5 (Gambar 3 dan 4). Hasil pengukuran jumlah leukosit total menunjukkan, bahwa jumlah leukosit total kelompok kontrol dan penyuntikan hUC-MSCs berada pada kisaran normal. Data perubahan total leukosit terlihat pada kelompok SC3 yang menunjukkan *upregulation*/peningkatan ($FC = 0,296 \pm 0,595$) namun lebih rendah dari kontrol ($FC = 0,318 \pm 0,321$), sedang SC1 dan SC5 menunjukkan *down regulation*/penurunan ($FC < 0$) (Gambar 2). Profil limfosit menunjukkan hanya kelompok SC5 yang menunjukkan *down regulation* sedangkan SC1 dan SC3 menunjukkan peningkatan namun FC lebih rendah dari kontrol. Gambaran monosit menunjukkan bahwa group SC1 dan SC3 mengalami peningkatan yang rendah ($FC = 0,122 \pm 0,457$ dan $0,178 \pm 0,633$) dibandingkan dengan kontrol ($FC = 1,000 \pm 1,414$) dan SC5 mengalami *down regulation*. Profil granulosit menunjukkan kelompok SC3 mengalami peningkatan yang cukup tinggi bahkan lebih tinggi dari kontrol, sedangkan SC1 dan SC5 mengalami penurunan ($FC < 0$). Perubahan hematologi yang terjadi sebagian besar dalam batasan normal fisiologis (Gambar 3) dimana nilai kisaran normal

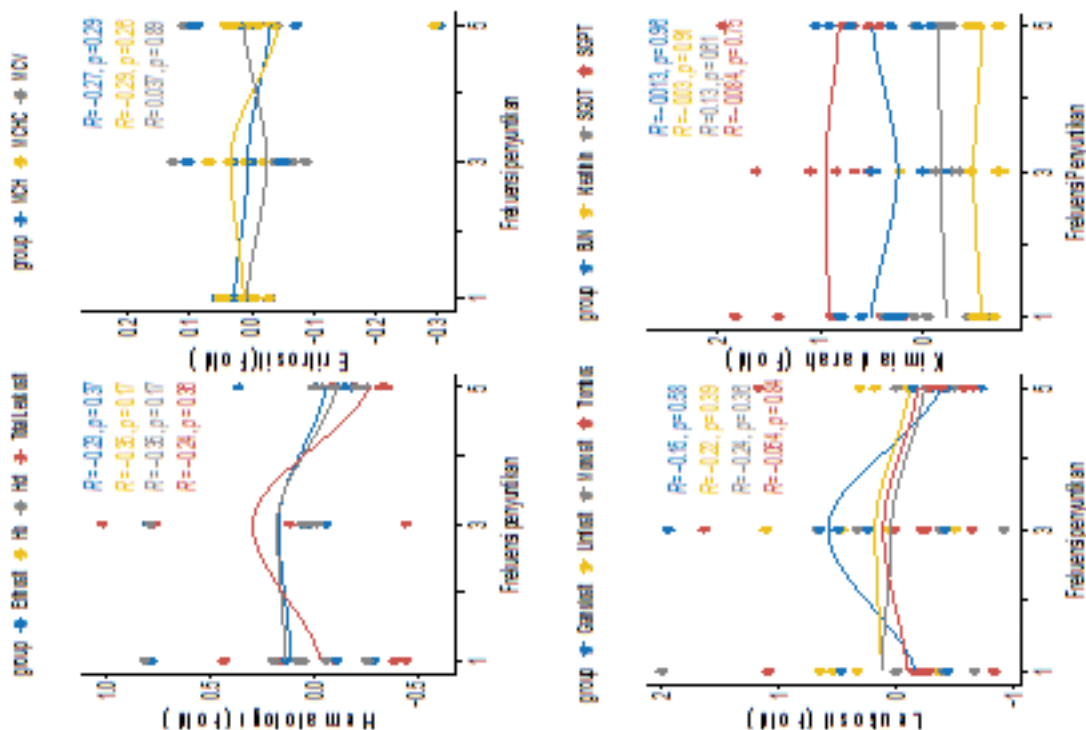
leukosit pada tikus betina tua adalah $3,61-7,96 \times 10^3/\text{mm}^3$, limfosit $2,09-6,39 \times 10^3/\text{mm}^3$, monosit $0,13-0,8 \times 10^3/\text{mm}^3$, dan granulosit $0,19-2,56 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Aleman *et al.*, 1998; Filho *et al.*, 2017; Delwatta *et al.*, 2018). Penurunan kadar limfosit disertai dengan meningkatnya kadar granulosit terutama neutrofil dan eosinofil (He *et al.*, 2017; Elyahu *et al.*, 2019) seiring bertambahnya usia khususnya pada tikus betina. Perubahan parameter leukosit yang terjadi juga karena pengaruh penyuntikan hUC-MSCs. Menurut William dan Hare (2011), sel-sel monosit, sel dendritik, sel T, eosinofil, dan makrofag menjadi berkurang karena pengaruh MSCs untuk kepentingan transplantasi ke dalam jaringan. Kadar limfosit dan monosit pada kelompok yang disuntik hUC-MSCs menurun kemungkinan karena pengaruh hUC-MSCs untuk transplan-tasi *stem cells* ke jaringan yang dituju. Dari hasil penelitian menunjukkan terjadinya peningkatan granulosit setelah penyuntikan hUC-MSCs pada kelompok SC3. Neutrofil adalah salah satu sel darah putih granulosit. Pengaruh MSCs terhadap neutrofil adalah menghambat apoptosis dari neutrofil akibat IL-6 yang disekresikan MSCs (Raffaghello *et al.*, 2009). Kenaikan profil granulosit kemungkinan karena pengaruh dari jumlah neutrofil.

Pemeriksaan Profil Eritrosit.

Hasil pemeriksaan profil eritrosit menunjukkan bahwa profil sel darah merah pada kelompok kontrol meningkat ($FC > 0$) baik pada eritrosit, hemoglobin, Hct, trombosit, MCV, MCH dan MCHC, namun sebaliknya pada kelompok SC5 menunjukkan penurunan ($FC < 0$). Pada kelompok perlakuan SC1 dan SC3 menunjukkan peningkatan namun tidak setinggi kelompok kontrol (Gambar 2). Sejalan dengan hasil pemeriksaan profil sel darah putih, perubahan yang terjadi paska penyuntikan hUC-MSCs, perubahan profil eritrosit masih dalam batasan fisiologis normal dan nilai kisaran normal jumlah eritrosit pada tikus tua betina berkisar antara $5,7-9,0 \times 10^6/\text{mm}^3$, hemoglobin antara $11,7-17,8 \text{ g/dL}$, nilai hematokrit 40-46% dan trombosit antara $563-1580 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Wolford *et al.*, 1986; Bailly dan Duprat 1990; Delwatta *et al.*, 2018). Kadar eritrosit, hemoglobin, nilai hematokrit dan trombosit yang terukur pada penelitian ini menunjukkan berada pada kisaran normal (Gambar 4). Kisaran normal MCV tikus betina tua $55,21-64,80 \text{ fL}$, MCH $18,70-21,20 \text{ pg}$, dan MCHC $318-347 \text{ g/L}$ (Wolford *et al.*, 1986;



Gambar 5. Gambaran kimia darah sebelum dan sesudah penyuntikan hUC-MSCs. Penyuntikan hUC-MSCs menunjukkan perubahan gambaran biokimiawi darah, kadar ALT meningkat pada kelompok kontrol namun lebih rendah pada kelompok yang disuntik hUC-MSCs, namun secara umum dalam kisaran batas normal (kotak hijau).



Gambar 6. Pearson Korelasi antara gambaran darah dengan frekuensi penyuntikan (dosis suntikan) hUC-MSCs. Hasil analisa korelasi menunjukkan tingkat korelasi yang lemah antara gambaran darah dengan peningkatan frekuensi penyuntikan.

He *et al.*, 2017). Kadar MCV, MCH dan MCHC yang terukur pada penelitian ini juga menunjukkan hasil pada kisaran normal (data tidak ditunjukkan). Kadar hemoglobin kelompok yang disuntik hUC-MSCs terlihat mengalami peningkatan dibandingkan dengan kontrol tapi tidak signifikan (Gambar 4). Li *et al.*, (2016) dan Gonzaga *et al.* (2017) mengemukakan bahwa penyuntikan MSCs meningkatkan kadar hemoglobin dan meningkatkan masa hidup tikus model anemia. Meningkatnya kadar hemoglobin akan meningkatkan fungsi eritrosit dalam mengikat oksigen dan transportasi sehingga kecukupan oksigenasi di paru-paru dan seluruh tubuh tercukupi dengan baik (Marengo-Rowe 2006). *Mesenchymal stem cells* mampu mempertahankan viabilitas dan fungsi dari eritrosit (Shroff *et al.*, 2017) namun tidak meningkatkan jumlah dan juga tidak memengaruhi arsitektur eritrosit.

Pemeriksaan Profil Biokimiawi Darah.

Hasil pemeriksaan profil ALT atau SGPT menunjukkan peningkatan baik pada kelompok kontrol ataupun kelompok yang disuntik hUC-MSCs. Kelompok kontrol menunjukkan peningkatan secara signifikan ($FC=1,646\pm 1,067$), namun peningkatan lebih rendah ditunjukkan pada SC1, SC3 dan SC5 ($FC=0,916\pm 0,621$, $0,945\pm 0,435$, $0,815\pm 0,573$). Sebaliknya profil AST atau SGOT pada semua kelompok mengalami penurunan, namun pada kelompok SC1, SC3 dan SC5 ($FC=-0,231\pm 0,431$, $-0,185\pm 0,147$, $-0,150\pm 0,128$) menunjukkan penurunan yang lebih besar dibandingkan kontrol ($FC=-0,032\pm 0,085$) namun tidak signifikan (Gambar 5). Kadar BUN meningkat pada semua kelompok ($FC>0$), namun SC3 yang menunjukkan peningkatan yang lebih rendah dari kontrol dan kelompok penyuntikan hUC-MSCs lain ($FC=0,242\pm 0,337$). Kadar kreatinin menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) (Gambar 5) antara kelompok kontrol dan penyuntikan hUC-MSCs. Penurunan kreatinin pada kelompok penyuntikan hUC-MSCs ($FC=-0,573\pm 0,076$, $-0,508\pm 0,1426$, $-0,588\pm 0,136$) lebih sedikit dari kelompok kontrol ($FC=-0,793\pm 0,010$).

Nilai kisaran normal ALT pada tikus betina tua adalah 21-52,9 U/l, AST 59-139 U/l, BUN 12,33-27,6 mg/dL dan kreatinin 0,35-0,59 mg/dL (Aleman *et al.*, 1998; Filho *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Delwatta *et al.*, 2018). Kadar AST dan ALT akan meningkat seiring bertambahnya usia tikus, nilai paling tinggi pada rentang usia 30-

40 bulan (Warner *et al.*, 1991). Kadar AST dan ALT merupakan profil kimia darah untuk hati dan BUN dan kreatinin profil kimia darah untuk fungsi ginjal dan aktivitas otot (Park *et al.*, 2018). Pada penuaan rentan terhadap berbagai penyakit seperti penyakit hati ataupun ginjal, tingkat regenerasi yang rendah hingga terjadi penurunan fungsi. Pada penelitian ini nilai kadar AST dan BUN berada dalam kisaran normal tikus betina tua. Kadar ALT meningkat pada semua kelompok, mengindikasikan terjadinya gangguan fungsi hati pada tikus tua, namun pada kelompok perlakuan hUC-MSCs kadar ALT yang lebih rendah dari kelompok kontrol mengindikasikan terjadi perbaikan fungsi hati. *Stem cells* bermanfaat dalam meregenerasi jaringan melalui sekresi sitokin dan *growth factor* dengan efek parakrin (Ullah *et al.*, 2018). Kadar kreatinin dalam serum ditentukan oleh sekresi tubulus ginjal dan juga dipengaruhi oleh komposisi otot, fungsi otot dan status kesehatan (Odden *et al.*, 2009). Pada usia tua terjadi penurunan kadar kreatinin yang berkaitan dengan fungsi ginjal dan penurunan dari massa dan aktivitas otot (Ciarambino *et al.*, 2017). Kadar kreatinin menurun pada semua kelompok, namun penurunan kadar kreatinin pada kelompok perlakuan lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan adanya perbaikan dari fungsi ginjal ataupun otot. Adanya efek perbaikan dari organ hati dan ginjal kemungkinan memengaruhi perpanjangan masa hidup tikus tua yang disuntik hUC-MSCs. Seperti yang dikemukakan Hu *et al.* (2019) dan Choia *et al.* (2019) bahwa efek terapi transplantasi MSCs meregenerasi hati pada kejadian fibrosis, perbaikan fungsi hati meningkatkan kualitas hidup dan memperpanjang masa hidup pasien Hu *et al.* (2019). Penelitian Putra *et al.* (2019) menemukan MSCs melepaskan *hepatocyte growth factor* (HGF) secara aktif menginduksi regenerasi jaringan ginjal yang rusak dengan mekanisme parakrin. *Hepatocyte growth factor* ini juga merupakan faktor utama yang berperan pada regenerasi hepatosit (Choia *et al.*, 2019). Perubahan yang terjadi pada gambaran biokimiawi darah pada penelitian ini secara umum dalam batas kisaran normal fisiologis tikus tua.

Pengujian korelasi antara frekuensi penyuntikan dan gambaran darah diuji dengan Pearson Korelasi. Nilai korelasi dilihat melalui angka nilai korelasi (R), jika nilai $-0,3 < R < 0,3$ = lemah; $-0,6 < R < -0,3$ atau $0,3 < R < 0,6$ =

menengah; $-0,6 < R < -1$ atau $0,6 < R < 1$ = kuat. Nilai korelasi gambaran darah berada pada kisaran nilai lemah (Gambar 6), sehingga dapat disimpulkan nilai perubahan pada gambaran darah berkorelasi lemah dengan frekuensi penyuntikan hUC-MSCs. Hasil uji klinis menunjukkan bahwa penyuntikan hUC-MSCs hingga 5 kali penyuntikan tidak mengganggu fisiologis tubuh baik pada gambaran leukosit, eritrosit, hemoglobin, trombosit dan kimia darah, hal ini sejalan dengan penelitian Park *et al.* (2018) dan Wang *et al.* (2013), yang menunjukkan tidak ada kelainan pada hematologi dan kimia darah, baik selama dan setelah penyuntikan hUCB-MSCs secara intravena.

Dari hasil uji klinis menunjukkan bahwa penyuntikan hUC-MSCs hingga 5 kali penyuntikan tidak mengganggu fisiologis tubuh baik pada gambaran leukosit, eritrosit, hemoglobin, trombosit dan kimia darah. Perubahan nilai data klinis menunjukkan adanya mekanisme transplantasi hUC-MSCs dan adanya perbaikan pada organ hati dan ginjal. Perubahan nilai data klinis yang terjadi secara umum masih dalam kisaran normal yang diartikan bahwa penyuntikan hUC-MSCs ditoleransi secara klinis oleh tikus percobaan.

SIMPULAN

Efek penyuntikan hUC-MSCs mampu meningkatkan kualitas hidup tikus tua sehingga memperpanjang usia tikus tua. Secara klinis penyuntikan hUC-MSCs pada tikus tua menunjukkan tidak adanya perubahan signifikan pada hematologi darah. Perubahan pada biokimiawi darah secara umum dalam kisaran normal tikus tua, perubahan ALT dan kreatinin pada kelompok perlakuan mengarah pada perbaikan jaringan. Penyuntikan hUC-MSCs secara *xenogenic* pada pemberian frekuensi satu, tiga ataupun lima kali penyuntikan dengan dosis 1×10^7 sel/kg BB ditoleransi secara klinis oleh tikus percobaan.

SARAN

Penelitian lanjutan menganalisa secara molekuler dan penelitian terhadap media kultur (conditioned medium) hUC-MSCs yang mengandung sekretom untuk penelitian *in vivo*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Stem Cell and Cancer Institute PT. Kalbe Farma Jakarta yang telah menyediakan materi penelitian hUC-MSCs dan Dr Boenjamin Setiawan Ph.D yang telah mendukung dana atas penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemán CL, Más RM, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, Gámez R. 1998. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Anim* 32: 457–466.
- Andreollo NA, Santos EF dos, Araújo MR, Lopes LR. 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship?. *Arq Bras Cir Dig* 25: 49–51.
- Bailly Y, Duprat P. 1990. Normal Blood Cell Values, Rat. In: *Monograph on Pathology of Laboratory Animals*. Jones TC, Ward JM, Mohr U, Hunt RD (Eds). Berlin, Jerman. Springer-Verlag. Hlm: 27–38.
- Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, Larrea RE, Abarzua E, Goset C, Rojo P, Palma I, Lamich R, Pedreros PA, Valdivia G, Lopez VM, Nazzari C, Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Brobeck MJ, Patel AN, Figueroa FE, Khoury M. 2017. Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: A phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [Randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal stem cells on cardiopathy]). *Circ Res* 121: 1192–1204.
- Chen W, Huang Y, Han J, Yu L, Li Y, Lu Z, Li H, Liu Z, Shi C, Duan F, Xiao Y. 2016. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunol Res* 64: 831–840.
- Choia JS, Aae H, Sae R, Cheonc H, Kimb S. 2019. Human Adipose Derived Stem Cells Exhibit Enhanced Liver Regeneration in Acute Liver Injury by Controlled Releasing Hepatocyte Growth Factor. *Cell Physiol Biochem* 52: 935-950.

- Ciarambino T, Paolo C, Giordano M. 2017. Age and frailty: Are they related in decline of renal function?. *J Gerontol Geriatr* 65: 161–168.
- Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, Seneviratne MD, Dissanayaka MLB, Batagoda SS, Udagedara AH, Walpola PB. 2018. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. *Anim Model Exp Med* 1: 250–254.
- Eleuteri S, Fierabracci A. 2019. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *Int J Mol Sci* 20 (18): 4597
- Elyahu Y, Hekselman I, Eizenberg-Magar I, Berner O, Strominger I, Schiller M, Mittal K, Nemirovsky A, Eremenko E, Vital A, Simonovsky E, Chalifa-Caspi V, Friedman N, Yegeer-Lotem E, Monsonego A. 2019. Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes. *Sci Adv* 5(8): eaaw8330.
- Filho WJ, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhão MS, Caldeira M, Bocalini D, de Souza RR. 2017. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging Male* 21: 145–148.
- Franceschi C, Campisi J. 2014. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 69: S4–S9.
- Gonzalez R, Woynarowski D, Geffner L. 2015. Stem cells targeting inflammation as potential anti-aging strategies and their therapies. *Cell Tissue Transpl Ther* 7: 1-8.
- Gonzaga VF, Wenceslau CV, Lisboa GS, Frare EO, Kerkis I. 2017. Mesenchymal Stem Cell Benefits Observed in Bone Marrow Failure and Acquired Aplastic Anemia. *Stem Cells Int* 2017: 8076529.
- Harlan Laboratories. 2014. Teklad Global Diet 2014. Available at: <https://www.envigo.com/p/teklad/laboratoryanimaldiets/naturalingredient/rodent/2014diets.aspx>. [Oktober 28 Oktober 2019].
- He Q, Su G, Liu K, Zhang F, Jiang Y, Gao J, Liu L, Jiang Z, Jin M, Xie H. 2017. Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. *PLoS One* 12: 1–18.
- Hu C, Zhao L, Duan J, & Li L. 2019. Strategies to improve the efficiency of mesenchymal stem cell transplantation for reversal of liver fibrosis. *J of Cell and Mol Med* 23(3): 1657–1670.
- Li J, Chen H, Lv Y-B, Wang Q, Xie Z-J, Ma L-H, He J, Xue W, Yu S, Guo J, Wang T-H, Wu T-X, Pan X-H. 2016. Intraperitoneal Injection of Multipotent Pooled Cells Treatment on a Mouse Model with Aplastic Anemia. *Stem Cells Int* 2016: 3279793.
- JHU-ACUC (Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee). Normative values for rats. Available at: <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>. [28 Oktober, 2019].
- Mansilla E, Roque G, Sosa YE, Tarditti A, Goya RG. 2016. A rat treated with mesenchymal stem cells lives to 44 months of age. *Rejuvenation Res* 19: 318–321.
- Marengo-Rowe AJ. 2006. Structure function relations of human hemoglobins. *Proceedings* (Baylor University Medical Center). 19(3): 239–245.
- Nagamura-Inoue T. 2014. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells* 6: 195.
- Odden MC, Shlipak MG, Tager IB. 2009. Serum creatinine and functional limitation in elderly persons. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. 64: 370–376.
- Park EH, Lim H suk, Lee S, Roh K, Seo KW, Kang KS, Shin K. 2018. Intravenous Infusion of Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis: A Phase Ia Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med* 7: 636–642.
- Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. 2019. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 4: 22.

- Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo JW. 2019. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Macedonian J of Med Sci.* 7 (3): 305–310.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. 2008. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells* 26(1): 151–162.
- Sane MS, Tang H, Misra N, Pu X, Malara S, Jones CD, Mustafi SB. 2019. Characterization of an umbilical cord blood sourced product suitable for allogeneic applications. *Regen Med.* 14: 769–789.
- Schulman IH, Balkan W, Hare JM. 2018. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Aging Frailty. *Front Nutr* 5: 2–11.
- Sengupta P. 2013. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med* 4: 624–630.
- Shroff G, Gupta R, Zadeng L. 2017. Human embryonic stem cell therapy for aplastic anemia. *Clin Case Reports* 5(6): 919–922.
- Sidharta VM, Herningtyas EH, Lagonda CA, Fauza D, Kusnadi Y, Susilowati R, Partadiredja G. 2018. High VEGF level is produced by human umbilical cord-mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in amino acid-rich medium and under hypoxia condition. *Indonesia Biomed J.* 10: 222–230.
- Tran C, Damaser MS. 2015. Stem cells as drug delivery methods: application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 82: 1–11.
- Ullah I, Subbarao RB dan Rho GJ. 2015. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep* 35: e00191.
- Ullah M, Sun Z. 2018. Stem cells and anti-aging genes: double-edged sword-do the same job of life extension. *Stem cell Res & Ther* 9(1): 3.
- Warner T, Nyska A, Chen R. 1991. Population distribution profiles of the activities of blood alanine and aspartate aminotransminase in normal F344 inbred rat by ag and sex. *Lab Anim Sci.* 25: 705-710.
- Wang L, Cong X, Wang L, Liu G, Zhou J, Bai B, Li Y, Bai W, Li M, Ji H, Zhu D, Wu M, dan Liu Y. 2013. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: Safety and efficacy. *Stem Cells Dev* 22(4): 3192-3202.
- Williams AR, Hare JM. 2011. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 109: 923–940.
- Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, Ruhren R. 1986. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health* 18: 161–188.