

**PENGARUH GEL TOPIKAL *SECRETOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs) TERHADAP
EKSPRESI GEN TGF- β dan IL-6**

(Studi Eksperimental *in Vivo* pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi)

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Metalia

MBK.22.19.010290

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2023**

TESIS

**PENGARUH GEL TOPIKAL *SECRETOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCs) TERHADAP
EKSPRESI GEN TGF- β dan IL-6**

(Studi Eksperimental *in Vivo* pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi)

disusun oleh

Metalia

MBK.22.19.010290

Telah disetujui oleh:

Menyetujui,

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Dr. dr. Hj Chodajjah, M. Kes

Dr. dr. H. Hadi Sarosa, M. Kes

NIK. 210.186.023

NIK. 210.101.059

Mengetahui,

Ketua program studi megister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med

NIK. 210.199.050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu perguruan tinggi dan lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.



Semarang, Agustus 2023



Metalia

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Metalia
Tempat/tanggal lahir : Muaradua, 15 Desember 1988
Agama : Islam
Jenis kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Aisyiyah Muaradua : Lulus tahun 1994
2. SDN 02 Muaradua : Lulus tahun 2000
3. SMP 01 Muaradua : Lulus tahun 2003
4. SMA Al-kautsar Lampung : Lulus tahun 2006
5. S1 Dokter Umum FK Univ. Malahayati : Lulus tahun 2014
6. S2 Biomedik FK UNISSULA : 2022 – Sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2014 - 2015 : Klinik Rawat Inap Panaragan Jaya
2. Tahun 2015 - 2017 : Klinik dr. Haikal Mubarak
3. Tahun 2017 - Sekarang : Klinik Kecantikan Elsha Clinic

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua

Ayah : H. Basnudin

Ibu : Hj. Hermawati

2. Suami : Mayor Pnb Muhammad Qorie Prasetya, S.H.

3. Anak : 1. Elshanum Qalesya Azzahra
2. Elshavira Adiva Salma

KATA PENGANTAR

Segala Puji atas ke hadirat Allah SWT atas Rahmat, Nikmat dan Taufiknya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “ **Pengaruh Gel Topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs)* Terhadap Ekspresi Gen TGF- β dan IL-6 (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Dengan Model Luka Eksisi)**”. Tesis ini diajukan sebagai bagian dari tugas akhir menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Dalam penyelesaian tesis, penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, S.H., M.Hum. selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.F selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, sekaligus penguji dalam sidang proposal yang memberikan banyak kritik serta saran untuk perbaikan.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan semangat dalam penyusunan tesis, sekaligus penguji dalam sidang proposal yang memberikan kritik serta saran untuk perbaikan.
4. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes. selaku Pembimbing I yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta dorongan semangat selama penyusunan perbaikan tesis ini.

5. Dr. dr. H. Hadi Sarosa, M.Kes selaku Pembimbing II yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, serta saran selama penyusunan perbaikan tesis ini.
6. Prof. Dr. Ir. Hj Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji yang telah memberikan masukan, semangat, dan membantu segala hal terkait dalam penyelesaian perbaikan tesis ini.
7. Kedua Orang tua, suami dan anak-anak tercinta yang telah memberikan doa, semangat, dukungan sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.
8. Seluruh staf dan pengajar biomedik serta staf SCCR Fakultas Kedokteran Unissula yang telah banyak membantu tiap tahapan selesainya tesis ini.

Akhirnya penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan. Untuk itu saran dan masukannya akan sangat membantu agar tesis ini dapat menjadi lebih baik.

Semarang, Agustus 2023



Metalia

MBK.22.19.010290

ABSTRAK

Latar Belakang: Luka pada kulit mengakibatkan rusaknya jaringan epitel dan struktur kulit, penyembuhan luka terhambat dan menyebabkan luka akut menjadi kronis. *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* mampu mengeluarkan sitokin dan faktor pertumbuhan, Tujuan penelitian adalah membuktikan pengaruh gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6 pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* desain penelitian *Post test Only Control Group Design*. Jumlah sampel 18 ekor tikus *Wistar* dengan model luka eksisi dibagi tiga kelompok, kelompok I diberikan basic gel placebo, kelompok II diberikan *Clobetasol* dosis 0,25g/kg, dan kelompok III diberikan gel SH-MSCs dosis 400 μ l/kgBB, perlakuan selama 5 hari, hari ke-6 jaringan kulit diperiksa dengan RT-PCR untuk melihat ekspresi gen TGF- β dan IL-6 dinalisa dengan uji *One Way Anova*, dilanjutkan uji *Post Hoc LSD*.

Hasil: Rerata ekspresi gen TGF- β di kelompok P1 yang tertinggi (1,38) dan rerata ekspresi gen IL-6 di kelompok P1 yang terendah (0.72). Uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan yang bermakna pada ekspresi gen TGF- β dengan nilai $p=0.056$ ($p<0,05$) dan IL-6 $p=0,47$ ($p<0,05$). Uji *Post Hoc LSD* pada ekspresi gen TGF- β menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs 400 μ l/kgBB dapat meningkatkan ekspresi gen TGF- β dan menurunkan ekspresi IL-6 pada tikus wistar dengan model luka eksisi.

Kesimpulan: Pemberian gel topikal SH-MSCs 400 μ l/kgBB terbukti bermakna dapat meningkatkan kadar TGF- β pada tikus wistar model luka eksisi sedangkan pemberian gel topikal SH-MSCs 400 μ l/kgBB dapat menurunkan kadar IL-6 pada tikus wistar model luka eksisi.

Kata Kunci: SH-MSCs, Hipoksia, TGF- β , IL-6, Luka eksisi

ABSTRACT

Background: Injury to the skin results in damage to epithelial tissue and skin structure, inhibits wound healing and causes acute wounds to become chronic. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells are able to secrete cytokines and growth factors. The aim of this study was to prove the effect of SH-MSCs topical gel on TGF- β and IL-6 gene expression in Wistar rats with excision wound models.

Methods: In vivo experimental study research design Post test Only Control Group Design. The total sample of 18 Wistar rats with the excision wound model was divided into three groups, group I was given basic placebo gel, group II was given Clobetasol at a dose of 0.25 g/kg, and group III was given SH-MSCs gel at a dose of 400 μ l/kg BW, treatment for 5 days, on the 6th day the skin tissue was examined by RT-PCR to see the expression of the TGF- β and IL-6 genes analyzed by the One Way Anova test, followed by the Post Hoc LSD test.

Results: The mean TGF- β gene expression in the P1 group was the highest (1.38) and the mean IL-6 gene expression in the P1 group was the lowest (0.72). The One Way Anova test showed a significant difference in the expression of the TGF- β gene with a value of $p=0.056$ ($p<0.05$) and IL-6 $p=0.47$ ($p<0.05$). Post Hoc LSD test on TGF- β gene expression showed that 400 μ l/kgBB administration of SH-MSCs increased TGF- β gene expression and decreased IL-6 expression in W

Conclusion: Administration of topical SH-MSCs gel 400 μ l/kgBW proved to be significantly able to increase TGF- β levels in Wistar rats excision wound model while topical SH-MSCs gel 400 μ l/kgBW can reduce IL-6 levels in Wistar rats excision wound model.

Keywords: SH-MSCs, Hypoxia, TGF- β , IL-6, Excision woundistar rats with excision wound model.

DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS.....	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Originalitas penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Luka	9
2.1.1 Pengertian Luka.....	9
2.1.2 Luka Eksisi	10
2.1.3 Fase penyembuhan luka	11
2.1.4 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka.....	17
2.2 <i>Transforming Growth Factor Beta</i> (TGF- β)	17
2.2.1 Pengertian.....	17
2.2.2 Sifat Aktivitas TGF- β	18
2.2.3 TGF- β dalam mengendalikan Proses Proliferasi Sel.....	20
2.3 Interleukin 6 (IL-6)	20

2.3.1 Pengertian.....	20
2.3.2 Mekanisme aktivasi IL-6.....	21
2.3.3 Peran IL-6 dalam penyembuhan luka.....	23
2.4 <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC).....	24
2.4.1 Pengertian.....	24
2.4.2 Sumber.....	25
2.4.3 Klasifikasi.....	25
2.4.4 MSC hipoksia.....	26
2.4.4.4 Efek <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> pada penelitian terdahulu.....	28
2.5 Hubungan Sekretome Hipoksia MSC terhadap ekspresi TGF- β dan IL-6 pada luka eksisi.....	29
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	31
3.1 Kerangka Teori.....	31
3.2 Kerangka Konsep.....	35
3.3 Hipotesis Penelitian.....	35
BAB IV METODE PENELITIAN.....	36
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	36
4.2.1 Populasi.....	37
4.2.2 Sampel penelitian.....	37
4.3 Variabel dan definisi operasional.....	38
4.3.1 Variabel penelitian.....	38
4.3.2 Definisi Operasional.....	39
4.4 Bahan/materi penelitian.....	39
4.5 Peralatan.....	39
4.6 Cara penelitian.....	40
4.6.1 Etik Penelitian.....	40
4.6.2 Perlakuan pada luka hewan coba.....	40
4.6.3 Teknik Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord.....	40
4.6.4 Proses Hipoksia.....	42
4.6.5 Pembuatan Sediaan Gel.....	42
4.6.6 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	

.....	43
4.6.7 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA.....	45
4.6.8 Pembacaan Ekpresi gen TGF- β dan IL-6 metode RTq-PCR	47
4.7 Teknik pengumpulan dan Analisis data.....	48
4.8 Jadwal pelaksanaan penelitian.....	49
4.8.1 Tempat pelaksanaan	49
4.8.2 Waktu penelitian.....	49
4.8.3 Alur kerja penelitian	50
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	51
5.1 Hasil Penelitian	51
5.1.1 Pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 400 μ L terhadap ekspresi gen TGF- β	56
5.1.2 Pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 400 μ L terhadap ekspresi gen IL-6.....	59
5.2 Pembahasan	61
5.3 Keterbatasan.....	63
BAB VI KESIMPULAN.....	65
6.1 Kesimpulan	65
6.2 Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN.....	75
Lampiran 1 Perhitungan dosis.....	75
Lampiran 2. Data hasil analisa makroskopis luka eksisi antar kelompok perlakuan hari ke 2 dan ke 6.....	76
Lampiran 3. Data hasil analisa statistik ekspresi gen TGF- β dan IL-6 antar kelompok perlakuan	79
Lampiran 4. <i>Ethical Clearance</i>	82
Lampiran 5. Surat Selesai penelitian	83
Lampiran 6. Foto kegiatan penelitian.....	84
Lampiran 7. Hasil makroskopis luka eksisi.....	86

DAFTAR SINGKATAN

MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
MSC CM	: <i>Mesenchymal stem cell conditioned medium</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
SH-MSC	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
N-MSCs	: <i>Normoksia Mesenchymal Stem Cell</i>
H-MSCs	: <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
HMSCs-CM	: <i>Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>
EGFR	: <i>Estimation Glomerular Filtration Rate</i>
TACE	: <i>Trans Arterial Chemo Embolization</i>
ADAM17	: <i>A Disintegrin and Metalloproteinase 17</i>
HCC	: <i>Hepatocellular carcinoma</i>
TGFBR2	: <i>Transforming Growth Factor beta receptor type 2</i>
KLF11	: <i>Krüppel-like factor 11</i>
TLRs	: <i>Toll like receptor</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular pattern</i>
HMGB1	: <i>High Mobility Group Box Protein 1</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>

RAGE	: <i>Receptor for advanced glycation end products</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
ROS	: <i>Reaktive Oxygen Spesies</i>
GAG	: <i>Glikosaminoglikan</i>
HIF	: <i>Hypoxic Induce Factor</i>
GSH	: <i>Glutathion</i>
SOD	: <i>Superoksida dismutase</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
TSG	: <i>Tumor Necrosis Factor α Stimulated Gene/Protein 6</i>
PKA	: <i>Protein kinase A</i>
SCF	: <i>Stem cell factor</i>
BMSC	: <i>Bone Marrow-derived Stem Cells</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4.1 Definisi Operasional	39
Tabel 5.1 Uji normalitas dan homogenitas makroskopik luka eksisi antar kelompok perlakuan hari ke 2.....	55
Tabel 5.2 Uji normalitas dan homogenitas makroskopik luka eksisi antar kelompok perlakuan hari ke 6.....	56
Tabel 5.3 Uji normalitas dan homogenitas ekspresi gen TGF- β antar kelompok perlakuan.....	57
Tabel 5.4 Uji <i>Post Hoc</i> LSD ekspresi gen TGF- β pada masing-masing kelompok	58
Tabel 5.5 Uji normalitas dan homogenitas ekspresi gen IL-6 antar kelompok perlakuan.....	59
Tabel 5.6 Uji <i>Post Hoc</i> LSD ekspresi gen IL-6 pada masing-masing kelompok..	60

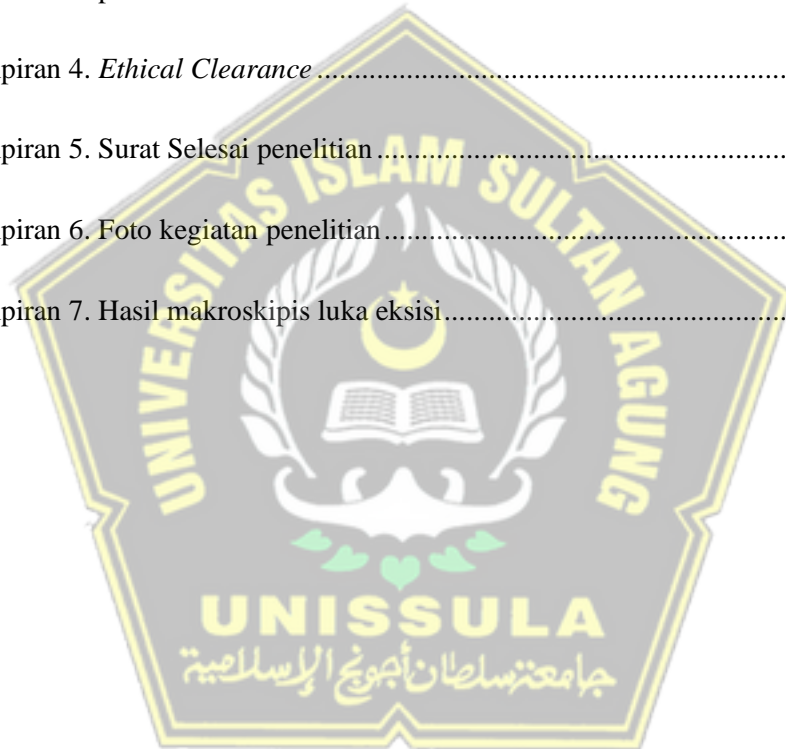
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Aktifitas TGF- β	19
Gambar 2.2 Mekanisme aktivasi IL-6.	23
Gambar 2.3 Kondisi hipoksia.....	26
Gambar 3.1 Skema kerangka teori.....	34
Gambar 3.2 Skema kerangka konsep.....	35
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	36
Gambar 4.2 Skema Alur kerja.....	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan dosis.....	75
Lampiran 2. Data hasil analisa makroskopis luka eksisi antar kelompok perlakuan hari ke 2 dan ke 6.....	76
Lampiran 3. Data hasil analisa statistik ekspresi gen TGF- β dan IL-6 antar kelompok perlakuan	79
Lampiran 4. <i>Ethical Clearance</i>	82
Lampiran 5. Surat Selesai penelitian	83
Lampiran 6. Foto kegiatan penelitian	84
Lampiran 7. Hasil makroskopis luka eksisi.....	86



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka yang terjadi pada kulit mengakibatkan rusaknya jaringan epitel dan struktur kulit.¹ Penyembuhan luka terhambat dan terbentuk jaringan parut.² Kondisi luka akut berkembang menjadi kronis dapat mengurangi estetika kulit, pasien akan menanggung beban biaya terapi yang tidak murah.² Penyembuhan luka yang banyak mendapat perhatian adalah menggunakan *Mesenchymal Stem Cells* (MSC), karena memiliki kemampuan membedakan dan mengeluarkan sitokin dan faktor pertumbuhan, termasuk *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) yang bermanfaat untuk menyembuhkan luka.² Kultur dengan kondisi lingkungan hipoksia meningkatkan kualitas MSC dalam proliferasi, kemampuan bertahan hidup, serta lebih banyak mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan.³ TGF- β yakni salah satu faktor pertumbuhan sentral yang mempunyai peran pada masing-masing tahapan penyembuhan luka khususnya di fase inflamasi dan proliferasi.⁴

TGF- β sebagai sitokin anti inflamasi yang kuat dalam mengatur inflamasi yang tidak terkendali.⁵ Kombinasi TGF- β dan IL-6 dibutuhkan teruntuk diferensiasi Th17 dari sel T CD4⁺ naif, dengan mendorong perkembangan sel T naif CD4⁺, IL-6 berperan penting dalam menjembatani kesenjangan antara respon imun bawaan dan respon imun yang didapat.⁶ Terapi *secretome* sebagai pendekatan yang menjanjikan dalam mengatasi regenerasi jaringan dan organ.⁷ Kultur prakondisi pada lingkungan hipoksia merupakan prosedur untuk meningkatkan kualitas MSC.³ Dalam penyembuhan luka, peran *secretome* hipoksia MSC menggunakan gel

topikal telah terbukti lebih efektif.⁸ Pengaruh pemberian *secretome* hipoksia MSC pada penyembuhan luka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Luka adalah masalah medis yang tersebar luas yang mempengaruhi orang di mana pun di dunia. Di Amerika Serikat, sekitar 11 juta orang menderita, dan setiap tahun, 300.000 orang dirawat di rumah sakit.⁹ Luka akut dan kronis lebih sering terjadi setiap tahun. Jumlah orang yang mengalami cedera meningkat dari 7,5% pada tahun 2012 jadi sebanyak 8,2% di tahun 2013, menurut Riskesdas Indonesia, dengan luka akut merupakan mayoritas kasus.¹⁰ Tahapan penyembuhan luka umumnya terganggu, termasuk luka akut maupun luka kronis, akibat peradangan yang berkepanjangan sehingga menghambat penyembuhan luka dengan mencegahnya berkembang melalui fase proliferasi, yang menyebabkan luka menjadi kronis.¹¹ Luka kronis yang berkepanjangan ini membutuhkan perawatan secara terkhusus dengan dana maupun biaya yang tidaklah sedikit.¹²

Menurut penelitian menggunakan MSC-CM injeksi topikal subkutan, dibandingkan dengan gel topikal MSC-CM bekerja lebih baik pada hari ke-6, ditemukan bahwa kelompok topikal memiliki tingkat PDGF dan kepadatan fibroblas yang lebih tinggi secara signifikan pada hari ke-6 penyembuhan luka.⁸ MSC juga dapat mengurangi peradangan, pembentukan luka bakar, dan telah ditunjukkan dalam uji praklinis untuk mempercepat penyembuhan luka bakar akut.¹³ Penelitian lainnya pada TNF- α konsentrasi 5 dan 10 ng/mL secara signifikan meningkatkan kadar TGF- β dan IL-10. Selain itu, kadar TGF- β dan IL-10 secara signifikan berkorelasi terbalik satu sama lain dengan TNF- α dengan dosis 5 dan 10 ng/mL pada peradangan supresif.⁵ Meskipun fungsi MSC dalam proses reepitelisasi

telah menunjukkan hasil yang menjanjikan termasuk regenerasi epidermal yang terorganisir dengan baik dan kualitas reepitelisasi yang baik, pertanyaan tentang kemanjuran MSC dalam terapi sel masih harus diselesaikan.¹⁴

MSC kondisi hipoksia terbukti lebih efektif dalam mengurangi peradangan dan mempercepat penyembuhan luka.^{15,16} Melepaskan lebih banyak sitokin dan *growth factor*.¹⁷ Faktor pertumbuhan utama adalah factor TGF- β , penting untuk setiap langkah penyembuhan luka pada fase inflamasi dan proliferasi.¹⁸ Melalui isoformnya, TGF- β meningkatkan migrasi dan aktivasi sel inflamasi selama fase inflamasi penyembuhan luka, dan mengontrol reepitelisasi, angiogenesis, dan perkembangan jaringan granulasi selama fase proliferasi.¹⁹ Disisi lain MSC terkondisi hipoksia mengurangi peradangan dengan menghalangi jalur NF- κ B dan mengeluarkan sitokin anti-inflamasi.²⁰

Sitokin proinflamasi seperti halnya aIL-6, IL-1, serta TNF- α dilepaskan sebagai akibat dari respons inflamasi yang dimediasi NF- κ B penyebab peradangan kulit.^{21,22} Sitokin IL-6 berperan penting dalam proses penyembuhan luka.²³ Peradangan yang terkontrol dikaitkan dengan tingkat penyembuhan luka yang lebih cepat.²⁴ Terapi MSC hipoksia memiliki kapasitas untuk diferensiasi, imunoregulasi dan tidak memiliki risiko penolakan pasca injeksi.²⁵ Pengaruh pemberian gel topical *Secretome Hypoxia* MSC terhadap penyembuhan luka tikus *Wistar* dengan model luka eksisi terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6 perlu penjelasan secara mendalam.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Adakah pengaruh pemberian gel topical *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi gen TGF- β pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi?
- 1.2.2 Adakah pengaruh pemberian gel topical *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi gen IL-6 pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikannya pengaruh pemberian gel topikal *secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen TGF- β serta IL-6 terhadap tikus *Wistar* dengan model luka eksisi.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui ekspresi gen TGF- β pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi dengan pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400 μ L/kgBB.
- b. Mengetahui ekspresi gen IL-6 yang ada pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi dengan pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400 μ L/kgBB.

1.4 Originalitas penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil
Kuntardjo N, Dharmana E, Chodidjah C, Nasihun TR, Putra A. ⁸	<i>TNF-α-Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level, Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination.</i>	Eksperimental <i>In Vivo.</i>	Dibandingkan dengan kombinasi injeksi topikal subkutan, gel topikal MSC-CM bekerja lebih baik. Kelompok topikal memiliki tingkat PDGF dan kepadatan fibroblas yang lebih tinggi secara signifikan pada hari ke-6.
Gao W, He R, Ren J, et al. ²⁶	<i>Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells increases angiogenesis via the JNK/HIF-1α pathway.</i>	Eksperimental <i>In Vitro</i> dan <i>In Vivo</i>	HMGB1 eksosom mempromosikan angiogenesis melalui pensinyalan faktor-1 α yang diinduksi oleh JNK / hipoksia. Eksosom BMSC yang hipoksia memiliki potensi untuk pengembangan strategi pengobatan baru untuk penyakit terkait angiogenesis.
Wiet Ramadhanti O, Putri A, Anna Chalimah Sadyah N,	Pengaruh Pemberian <i>Mesenchymal Stem Cell</i> Hipoksia dan Normoksia Terhadap Ekspresi	Eksperimental <i>In Vivo</i>	Dibandingkan dengan N-MSCs, H-MSCs dapat meningkatkan ekspresi serial IL-10, menghasilkan penyembuhan luka pada model tikus dengan luka eksisi.

Hidayah N,	IL-10 pada Tikus		
Prasetyo A. ²⁷	Model Luka Eksisi.		
Putra A,	<i>The role of tnf-α induced MSCs on suppressive inflammation by increasing tgf-β and il-10.</i>	Eksperimental In Vivo	TNF- α konsentrasi 5 dan 10 ng/mL secara signifikan meningkatkan kadar TGF- β dan IL-10. Selain itu, kadar TGF- β dan IL-10 secara signifikan berkorelasi terbalik satu sama lain dengan TNF- α dengan dosis 5 dan 10 ng/mL.
Sunarto H,	<i>The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing.</i>	Eksperimental In Vivo	Fungsi HMSCs-CM dalam mempromosikan pemulihan luka kulit. Pada hari ke-6, kadar VEGF meningkat secara signifikan tergantung pada dosis. Pada hari ke-9, kadar VEGF berangsur-angsur turun. Sintesis kolagen dan kadar VEGF dapat dikontrol oleh HMSCs-CM untuk mempercepat penyembuhan luka.
Trisnadi S,			
Putra A,			
Anna Chalimah Sa N,			
Tjipta A. ²⁸			

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa dibandingkan dengan kombinasi injeksi topikal subkutan, gel topikal MSC-CM bekerja lebih baik. Pada hari ke-6 didapat bahwa kelompok topikal memiliki tingkat PDGF dan kepadatan fibroblas yang lebih tinggi secara signifikan pada hari ke-6.⁸ riset tersebut berbeda dengan riset ini yang mana menggunakan gel topikal *secretome Hypoxia Mesenchymal*

Stem Cell (SH-MSCs) dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6.

Penelitian terdahulu menggunakan *Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells* melaporkan bahwa HMGB1 eksosom mempromosikan angiogenesis melalui pensinyalan faktor-1 α yang diinduksi oleh JNK / hipoksia. Eksosom BMSC yang hipoksia memiliki potensi untuk pengembangan strategi pengobatan baru untuk penyakit terkait angiogenesis.

²⁶ Risetnya itu berbeda pada riset ini yang mana menggunakan gel topikal SH-MSCs dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6.

Penelitian terdahulu melaporkan, dibandingkan dengan N-MSCs, H-MSCs dapat meningkatkan ekspresi serial IL-10, menghasilkan penyembuhan luka pada model tikus dengan luka eksisi. ²⁷ Penelitiannya itu memiliki perbedaan dengan riset ini yang mana menggunakan gel topikal SH-MSCs dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa TNF- α konsentrasi 5 dan 10 ng/mL secara signifikan meningkatkan kadar TGF- β dan IL-10. Selain itu, kadar TGF- β dan IL-10 secara signifikan berkorelasi terbalik satu sama lain dengan TNF- α dengan dosis 5 dan 10 ng/mL. ⁵ Penelitiannya itu memiliki perbedaan dengan riset ini yang mana menggunakan gel topikal SH-MSCs dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa Fungsi HMSCs-CM dalam mempromosikan pemulihan luka kulit. Pada hari ke-6, kadar VEGF meningkat

secara signifikan tergantung pada dosis. Pada hari ke-9, kadar VEGF berangsur-angsur turun. Sintesis kolagen dan kadar VEGF dapat dikontrol oleh HMSCs-CM untuk mempercepat penyembuhan luka.²⁸ Penelitiannya itu memiliki perbedaan dengan riset ini yang mana menggunakan gel topikal SH-MSCs dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6.

1.5 Manfaat Penelitian

a. Manfaat Teoritis

Penelitian ini bertujuan membuktikan teori dari berbagai sumber sebagai tambahan literasi untuk para praktisi kesehatan dalam melakukan tindakan medis dan melahirkan metode baru dalam penanganan kasus khususnya kejadian pada luka eksisi.

b. Manfaat Praktis

1. Penelitian ini memberi informasi di sektor maupun bidang kesehatan sebagai referensi penelitian berikutnya dengan parameter berbeda sehingga memberikan manfaat kepada masyarakat luas.
2. Sebagai pedoman untuk peneliti selanjutnya untuk melakukan uji klinis tentang pengaruh lamanya pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap kadar TGF- β dan *Interleukin 6* (IL-6) pada penyembuhan luka eksisi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka

2.1.1 Pengertian Luka

Luka ialah hilangnya fungsi kontinuitas jaringan tubuh, terganggunya integritas jaringan biologis, meliputi kulit, selaput lendir, dan organ. Luka bisa membuat terjadinya kerusakan pada fungsi perlindungan kulit yang diakibatkan karena hilangnya kontinuitas jaringan epitel dengan maupu tidak adanya kerusakan pada jaringan lainnya, seperti halnya tulang, otot, serta juga saraf.²⁹

Payne-James *et all.*, mengelompokan luka menjadi;

1. Luka memar/kontusio terjadi karena robekan jaringan pembuluh darah akibat benturan yang merusak pembuluh darah. Darah kemudian bermigrasi ke jaringan perivaskular, menyebabkan perubahan warna pada permukaan kulit.
2. Luka lecet atau abrasi yaitu kerusakan yang dangkal dan tidak mempengaruhi lapisan epidermis yang lebih dalam. Gesekan permukaan kulit dengan permukaan yang kasar merupakan penyebab umum abrasi.
3. Luka robek atau laserasi berhubungan dengan kerusakan jaringan yang disebabkan oleh trauma yang kuat sehingga jaringan lunak dan kulit tampak luka terbuka.
4. Luka iris atau insisi sayatan yang dibuat dengan benda tajam seperti

silet atau pisau, yang biasanya dibuat sehubungan dengan operasi bedah. Luka yang cukup panjang dan dalam hingga merusak jaringan dan pembuluh darah. Luka sayatan ditandai dengan kecenderungannya lurus, tepi rata, tidak ada memar, dan tidak ada lecet.

2.1.2 Luka Eksisi

Luka eksisi ialah salah satu daripada jenis luka, terjadi pada permukaan kulit, bagian bawah lapisan yang terpotong dengan kedalaman yang bervariasi dengan pinggirannya luka yang teratur, biasanya mengalami cedera berulang akibat trauma, kecelakaan, paparan tekanan, sengatan panas, sinar matahari, atau bahan kimia.³⁰ Penyembuhan luka kulit sebagai proses fisiologis penting yang melibatkan kolaborasi berbagai strain sel dan produknya. Pemulihan dari lesi yang disebabkan oleh agresi lokal dimulai pada awal tahapan inflamasi. Perbaikan yang terdiri atas penggantian struktur khusus yang disebabkan oleh adanya deposisi maupun regenerasi kolagen, sesuai pada tahap proliferasi serta diferensiasi sel secara posterior melalui jaringan sel punca.³¹ Mekanisme ini tidak saling eksklusif yaitu, setelah lesi kulit, regenerasi dan perbaikan dapat terjadi pada jaringan yang sama, bergantung pada strain sel yang terganggu oleh cedera tersebut.³²

Setelah timbulnya lesi, proses regenerasi serta juga perbaikan jaringan terjadi. Baik itu sebagai akibat trauma maupun kondisi dari patologis secara terkhusus. Seluruh rangsangan yang mengganggu kontinuitas fisik jaringan fungsional bergabung membentuk satu lesi. Rangsangan internal maupun eksternal, serta rangsangan kimia, fisik, termal, ataupun listrik dapat

menyebabkan lesi. Selain daripada demikian, lesi bisa membuat terjadinya kerusakan pada organel tertentu maupun sel dengan cara yang menyeluruh.³³ Perbaikan jaringan ialah sebuah tahapan maupun proses linier langsung yang mana faktor pertumbuhan meningkatkan proliferasi sel, yang menghasilkan integrasi perubahan dinamis yang melibatkan sel darah, mediator terlarut, proliferasi sel parenkim, serta juga produksi matriks ekstraseluler.

2.1.3 Fase penyembuhan luka

Tahap penyembuhan kulit merupakan peristiwa seluler dan biokimia perihal perbaikannya suatu luka yang bisa dibagikan jadi 3 macam tahapan: respon inflamasi, proliferasi sel serta sintesis elemen matriks ekstraseluler, serta juga periode yang selanjutnya, yang dikenal sebagai remodeling.³⁴

2.1.3.1 Tahap inflamasi

Pembuluh darah yang berlesi berkontraksi dan darah yang bocor menggumpal selama respons inflamasi vaskular, berkontribusi pada integritas pembuluh. Koagulasi yang terdiri atas agregasi trombosit serta juga trombosit dalam jaringan fibrin, tergantung dari faktor spesifik dengan melaluinya aktivasi maupun agregasi atas berbagai macam sel ini.³⁵ Membangun ulang homeostasis serta membuat penghalang untuk bisa tahan dari serangannya mikroorganisme, jaringan fibrin melakukan pengaturan terhadap matriks sementara yang dibutuhkan teruntuk migrasi sel, mengembalikannya kegunaan ataupun fungsi dari kulit sebagai pelindung, penghalang, serta juga untuk menjaga integritas dari kulit.³³

Fase inflamasi dimulai setelah trauma pada kulit dan berlanjut hingga lima hari. Fase ini penting untuk hemostasis dan mencegah infeksi bakteri.³⁶ Pelepasan faktor kemotaktik seperti halnya *kallikreins* serta peptida fibrin dari jaringan sekitar maupun plasma darah yang menyebabkan koagulasi selama fase inflamasi. Sel mast mengeluarkan faktor nekrosis tumor, histamin, protease, leukotrien, serta sitokin, menyebabkan sel inflamasi bermigrasi. Sel kekebalan pertama yang bermigrasi ke jaringan yang terluka adalah monosit dan neutrofil.³⁷

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Prostaglandin, interleukin-1 (IL-1), C5a, TGF- β , serta juga produk degradasi bakteri seperti halnya *Lipopolysaccharide* (LPS) bakal merangsang neutrofil teruntuk diapedesis ke dalam jaringan yang terluka serta melakukan pengisian terhadap mengisi rongga luka. Peningkatan permeabilitas kapiler oleh sel endotel vaskular berkontribusi pada diapedesis ini. Pelepasan dari histamin serta serotonin sel mast menyebabkan permeabilitas kapiler. Neutrofil yang melakukan migrasi ke jaringan yang terluka membantu mencegah infeksi dengan memfagositosis jaringan mati dan mikroorganisme patogen. Akibat proses regenerasi jaringan, konsentrasi neutrofil pada jaringan yang cedera akhirnya menurun. Konsentrasi neutrofil yang tinggi pada luka yang bertahan lama menunjukkan konversi dari infeksi.³⁸

Setelah 48-72 jam, monosit yang akan matang jadi makrofag dan bakal mengikutinya neutrofil perihal menuju ke dalam luka serta juga

jadi sel dominan sesudah hari yang ketiga paska trauma kulit. Makrofag membantu memfagositosis puing-puing serta bakteri yang ada di jaringan yang terluka. Makrofag juga memiliki peranan perihal produksi dari bermacam-macam faktor pertumbuhan yang menginduksikan fibroblas untuk menghasilkan matriks ekstraseluler serta juga neovaskularisasi oleh mesenkim jaringan, sehingga berperan penting dalam penyembuhan luka.³⁶

Selain fagositosis dan produksi sitokin inflamasi, neutrofil dan makrofag menghasilkan ROS (Spesies Oksigen Reaktif). ROS memiliki peranan perihal pencegahan infeksi bakteri karena sifat radikal bebas dari molekulnya. Sebaliknya, konsentrasi ROS yang tinggi bisa membuat terjadinya perlambatan atas tahap regenerasi jaringan dengan menginduksi apoptosis yang ada pada sel-sel tubuh dari waktu ke waktu. ROS juga terlibat perihal pemeliharaan maupun aktivasi dari kadar asam arakidonat serta produksi ulang mediator inflamasi seperti halnya leukotrien maupun prostaglandin. Kenaikan serta produksi ulang mediator inflamasi bisa menyebabkan peradangan kronis yang dapat membuat jaringan menjadi rusak.³⁸

Sel mast serta limfosit bisa ditemukannya terhadap luka pascatrauma hari ke 5 sampai dengan hari yang ke 7. Dari kedua jenis sel ini meregulasi sisa peradangan serta melakukan penginduksian terhadap regenerasi jaringan yang mengalaminya trauma. Akan tetapi, para peneliti belum menemukan mekanisme mengatur peradangan sisa

dan mendorong regenerasi jaringan yang mengalaminya sebuah trauma.³⁶ Fase inflamasi bakal diakhiri dengan terbentuknya jaringan granulasi yang berwarna kemerah-merahan yang lunak serta juga granular. Jaringan granulasi yang tercipta ini diperkaya akan neovaskularisasi kapiler dan fibroblas, serta menyediakan lingkungan metabolik yang membantu penyembuhan luka.³⁹

2.1.3.2 Tahap Proliferasi

Fase proliferasi berlangsungnya dari hari yang keempat sampai dengan hari kedua puluh satu. Fase ini dibedakan oleh aktivitas re-epitelisasi sel epitel jaringan. Migrasi keratinosit di tepi luka memulai proses re-epitelialisasi. Dalam 5-7 hari, luka akan tertutup akibat re-epitelisasi. Setelah selesai, membran dasar akan terbentuk antara epidermis dan dermis. Angiogenesis dan fibrogenesis merangsang pembentukan membran dasar yang melakukan penguatan terhadap struktur lapisan dermis yang ada di bawahnya. Di dalam tahap ini, trombosit dan makrofag mendominasi matriks fibrin, yang secara bertahap digantikannya oleh jaringan granulasi yang dibentuk oleh kumpulan dari fibroblas jaringan, matriks ekstraseluler terbentuk pada akhir proses ini.³⁶

Fibroblas memainkan peran penting dalam fase proliferasi. Fibroblas bertanggung jawab untuk produksi kolagen, fibrin, serta juga protein matriks ekstraseluler yang lain. Matriks ekstraseluler melakukan tindakan dalam mengisi rongga jaringan luka serta menyediakannya

lokasi untuk migrasi keratinosit. Faktor pertumbuhan, seperti hanya TGF- β serta PDGF, merangsang aktivitas fibroblas agar berproliferasi serta menghasilkan matriks ekstraseluler.³⁶

Dengan bantuan matrix metalloproteinase, fibroblas bakal mendegradasi fibrin serta juga menggantinya dengan glikosaminoglikan (GAG) maupun kolagen tipe III (MMP). Kemudian di dalam fase maturasi, kolagen tipe III bakal digantikannya dengan kolagen tipe I.⁴⁰ Makrofag menghasilkan faktor proangiogenik seperti faktor pertumbuhan fibroblast-2 (FGF-2), faktor endotel vaskular (VEGF), trombospondin, serta angiopentin-1, yang merangsang angiogenesis sel endotel.³⁶ Ketika regenerasi epitel selesai dan proses remodeling kolagen dimulai, semua aktivitas seluler dalam fase proliferaatif yang dijelaskan di atas akan berhenti. Fibroblas akan hilang sesudah matriks kolagen mengisi rongga luka, serta tahap neovaskularisasi bakal juga diakhiri dengan apoptosis. Ketidakterhasilan teruntuk mengontrol tahapan re-epitelisasi bakal mengakibatkan gangguan fibrotik seperti keropeng serta hipertrofi.³⁶

2.1.3.3 Tahap Maturasi

Fase maturasi dapat berlangsung dari 18-21 hari hingga 1-2 tahun. Setelah rongga luka diisi dengan matriks ekstraseluler serta juga jaringan granulasi, fase maturasi dimulai, serta kolagen tipe I menggantikannya kolagen tipe III. Sel dan matriks ekstraseluler matang selama fase ini.³⁷ Kontraksi luka dan remodeling kolagen menjadi ciri fase maturasi.

Aktivitas myofibroblast meningkatkan kontraksi luka. Myofibroblast adalah sel fibroblast dengan mikrofilamen aktin intraseluler yang memungkinkannya berkontraksi dan menarik jaringan di sekitarnya. Kolagen tipe III fase sebelumnya bakal digantikan dengan cara yang bertahap oleh kolagen tipe I dengan cara melaluinya aktivitas matrix metalloproteinase (MMP) yang diinduksi oleh sel endotel, fibroblas, maupun juga makrofag jaringan.³⁶

Pada fase maturasi, proses sintesis sertadegradasi kolagen terjadinya secara bersamaan tetapi dengan derajat yang bervariasi dari awal hingga akhir fase maturasi. Kelebihan kolagen terdegradasi dan diserap oleh jaringan di sekitarnya oleh enzim kolagenase. Fase ini diakhiri dengan terbentuknya jaringan parut yang tipis, lunak, pucat, serta juga gampang untuk digerakkannya ke arah bawah.⁴¹ Kolagen yang baru disintesis disusun secara tidak teratur, keberadaan *lysyl hydrolase* diperlukan untuk merubah lisin jadi *hidroksilisin*, melakukan penginduksian terhadap ikatan silang antara serat kolagen. Karena adanya ikatan silang antara serat kolagen, membuat terjadinya *tensile-strength* hingga menutupi luka agar tidaklah gampang untuk bisa robek disaat mengalaminya trauma ringan. Kekuatan tarik biasanya akan meningkat pada 6 minggu pertamanya, lalu meningkat secara bertahap selama 1 sampai dengan 2 tahun berikutnya di kebanyakan orang. Kekuatan tarik pada kulit dan fascia jarang mencapai 100% dan biasanya hanya 80% dari normal.⁴⁰

2.1.4 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka.

1. Infeksi adalah agen zat yang mencegah penyembuhan luka. Infeksi menyebabkan area luka membesar, dan produk metabolisme infeksi memiliki kemampuan untuk melemahkan jaringan kulit dan mempengaruhi respons peradangan.
2. Status gizi memiliki fungsi yang krusial dalam penyembuhan luka karena ketersediaan makro dan mikronutrien sangat penting untuk proses fisiologis penyembuhan luka.
3. Glukokortikoid atau steroid memiliki kekuatan untuk menghentikan siklus arakidonat, yang menyebabkan peradangan.
4. Usia mempengaruhi seberapa baik luka sembuh. Bertambah tua dapat berdampak pada respons peradangan, produksi faktor pembekuan, dan kapasitas jaringan untuk beregenerasi.
5. Tipe dan luas jejas jaringan mempengaruhi seberapa baik luka sembuh. Jenis, lokasi, dan tingkat kerusakan jaringan pada lokasi luka mempengaruhi penyembuhan luka. Proses penyembuhan akan semakin lama maka semakin dalam kerusakannya. Tidak dapat kembali ke keadaan sebelumnya.²⁷

2.2 Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)

2.2.1 Pengertian

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) adalah sitokin multifungsi yang memainkan peran penting di beberapa tahap seluler termasuk diferensiasi, proliferasi, apoptosis, serta migrasi teruntuk mempertahankan homeostasis

jaringan.⁴² Disekresikan dari bermacam jenis sel, seperti makrofag, denritik sel, sel B, dan sel T. TGF- β sebagai penekan kekebalan dalam peradangan, autoimunitas, dan kanker.⁴³ Sitokin pluripotent yang merupakan famili TGF- β terdiri atas tiga macam isoform, yakni TGF- β 1, TGF- β 2, serta TGF- β 3, dimana TGF- β 1 berperan penting pada proses penyembuhan luka kulit.⁴⁴ Struktur peptida dari ketiga anggota keluarga TGF- β sangat mirip. 390 asam amino membentuk TGF- β 1, 412 asam amino membentuk TGF- β 2, dan 412 asam amino membentuk TGF- β 3. Peptida N-terminal dari ketiga anggota keluarga TGF- β berkisar antara 20 hingga 30 asam amino.⁴³

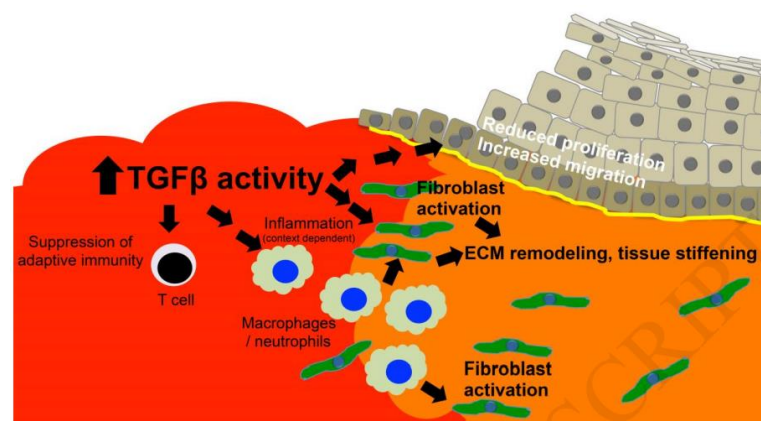
Beberapa sel punca dewasa tidaklah cuma mengekspresikannya reseptor TGF- β di permukaan selnya, dan tidak aktif selama beberapa bulan. Sel punca dapat masuk kembali ke siklus sel dijadikan sebagai respon pada situasi maupun kondisi lingkungan secara tertentu. Perihal demikian berbeda pada kondisi penuaan sel serta juga diferensiasi sel biasanya. Kemampuan yang dimiliki oleh para anggota superfamili TGF- β untuk melakukan penyeimbangan yang ada diantara tahap proliferasi sel yang aktif serta dengan siklus sel yang reversibel penting teruntuk menjaga daya tanggap sel punca dalam merespon perubahan fisiologi jaringan.⁴⁵

2.2.2 Sifat Aktivitas TGF- β

TGF- β adalah faktor yang disekresikan serta juga bergantung kepada tipe sel serta ekspresi ligan serta dosis. TGF- β memiliki dampak pleiotropik maupun terkadang antagonis pada proses seluler seperti kematian sel, migrasi, diferensiasi, dan proliferasi.⁴⁵ Efek TGF- β bergantung kepada berbagai macam

parameter, termasuknya keberadaan dari adanya sitokin yang lain. Dalam berbagai macam kasus yang terkait dengan efek biologis TGF- β dimodulasi oleh sitokin mitogeniknya. Fungsi membalikkan efek penghambatan TGF- β dan memastikan bahwa SCF meningkatkan kelangsungan hidup sel induk hematopoietik serta mencegah efek penghambatan TGF- β yang ada pada berbagai macam sel tersebut.⁴⁶

Sifat pleiotropik TGF- β memiliki implikasi pada proses patologis ketika jalur aktivasinya dideregulasi, dalam hal ini TGF- β juga memiliki peranan perihal regulasi homeostatis.⁴⁷ Jalur pensinyalan TGF- β memainkan peran dominan dalam diferensiasi sel dengan cara melakukan pengaturan terhadap ekspresi gen yang terlibat pada proliferasi sel serta kiha perbaikannya jaringan. Tahapan dari perkembangan sel punca yang mencakup diantaranya pembaharuan diri serta diferensiasi sel yang dipengaruhi oleh adanya faktor internal yang terdiri atas epigenetik serta faktor transkripsi penting, lalu faktor eksternal yang mempengaruhinya terdiri atas inhibitor serta juga jalur sinyal. TGF- β memiliki perananan untuk melakukan pengaktifan dari sinyal proliferasi sel.⁴⁷



Gambar 2.1 Aktifitas TGF- β .⁴⁵

2.2.3 TGF- β dalam mengendalikan Proses Proliferasi Sel

TGF- β mengontrol dua proses dalam sel hati yaitu regulasi apoptosis dan regulasi proliferasi. TGF- β memulai penghentian siklus sel dan apoptosis, yang merupakan langkah pertama. Pada sisi lainnya, TGF- β mempromosikan sinyal proliferasi serta juga anti-apoptosis dengan melaluinya pengaktifan jalur EGFR, yang merupakan proses sekunder. TGF- β membutuhkan aktivitas matriks *metalloproteinase* TACE/ADAM17 untuk mengaktifkan *loop* EGFR di sel hati, disregulasi jalur ini diketahui berinteraksi dengan faktor pertumbuhan lain.

Di dalam sel kanker, hilangnya sinyal aktivasi TGF- β mengurangi kemampuan dari inisiasi *cell cycle arrest*. miRNA akan bertindak sebagai onkogen dalam menghambat perkembangan tumor yang mengatur proliferasi sel. miRNA juga akan menekan pensinyalan TGF- β dengan cara menghambat terjemahan gen TGFBR1 serta KLF11. TGF- β disebutnya sebagai sitokin yang multifungsi yang dapat melakukan pengontrolan pada tahap proliferasi sel dengan cara melakukan pencegahan terkait dengan terjadinya transisi siklus sel dari fase G ke fase S dengan melaluinya aktivasi protein kinase serta juga koaktivator yang mengatur siklus sel. TGFBR2 serta KLF11 bertindak sebagai mediator positif dari jalur pensinyalan TGF- β , hingga represi yang kedua dari protein ini oleh miRNA membuat terjadinya penghambatan atas *cell cycle arrest* yang diinduksikan oleh TGF- β .⁴⁸

2.3 Interleukin 6 (IL-6)

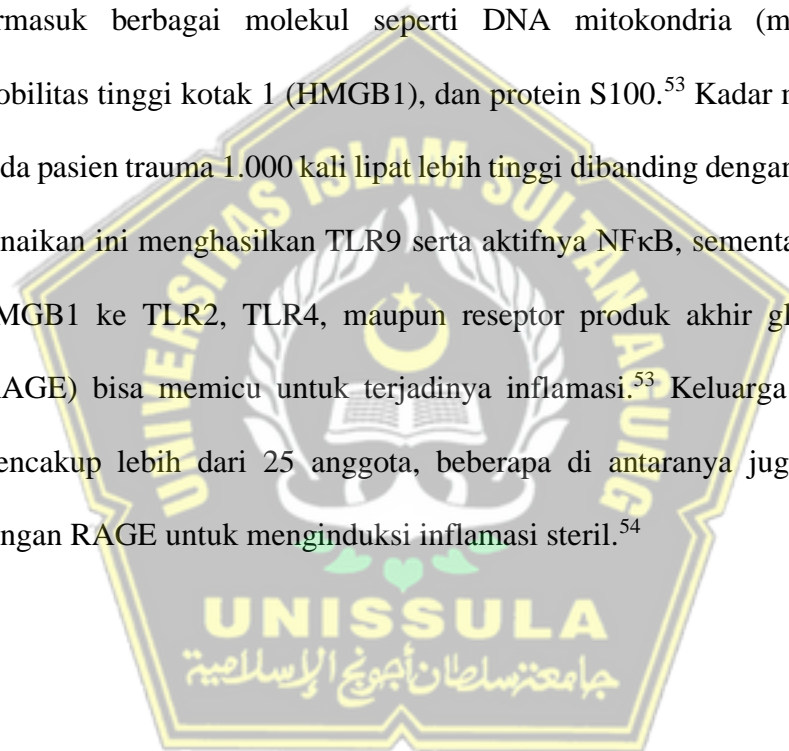
2.3.1 Pengertian

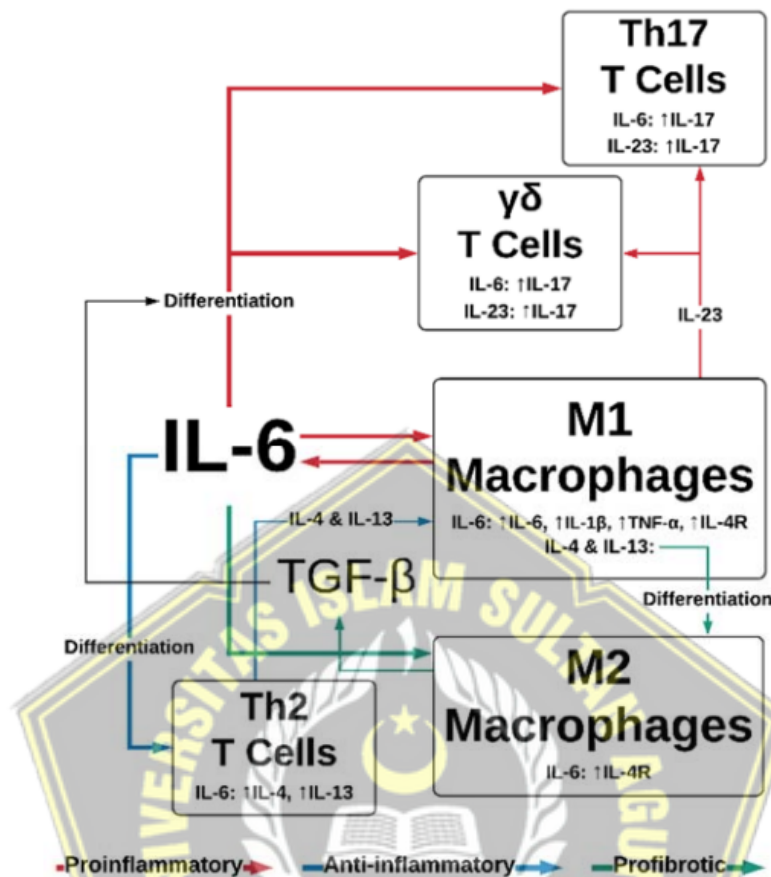
Interleukin 6 (IL-6) ialah sitokin pro inflamasi, bertindak sebagai mediator dalam berbagai situasi darurat, diproduksi pada lesi infeksius, dan mengaktifkan sinyal peringatan ke seluruh tubuh. Tanda khusus patogen eksogen, yang dikenal sebagai pola molekuler, ditemukan pada lesi yang terinfeksi oleh reseptor pengenalan patogen (PRR) sel imun seperti monosit dan makrofag.⁴³ *Toll like receptor* (TLRs), reseptor DNA, reseptor domain oligomerisasi pengikat nukleotida, dan reseptor gen-1 yang diinduksi asam inoat. merangsang beberapa jalur pensinyalan, termasuk NFκB, serta juga meningkatkannya transkripsi mRNA sitokin inflamasi seperti halnya TNF-α, IL-6, serta IL-1β. TNF-α maupun IL-1β kemudian merangsang faktor transkripsi teruntuk dapat menghasilkannya IL-6.⁴⁹

2.3.2 Mekanisme aktivasi IL-6

Produksi *interleukin 6* (IL-6) yang cepat dan spontan, yang terjadi sebagai respons terhadap infeksi dan kerusakan jaringan, membantu pertahanan dengan meningkatkan respons fase akut, hematopoiesis, dan respons imunologi. Ekspresi IL-6 diatur dengan cara yang ketat oleh mekanisme transkripsi serta pasca-transkripsi, produksi IL-6 yang tidaklah teratur mempunyai efek buruk terhadap peradangan kronis serta penyakit autoimun.⁵⁰ Pada awal peradangan, lesi lokal menghasilkan IL-6, yang kemudian diangkut melaluinya aliran darah ke hati, yang mana ia dengan cepat menginduksi beberapa protein fase akut termasuknya serum amiloid A (SAA), protein C-reaktif (CRP), haptoglobin, fibrinogen, sereta juga al-antichymotrypsin.⁵¹

IL-6 juga mengirimkan sinyal peringatan jika terjadi kegagalan jaringan, pada inflamasi non-infeksi, seperti luka bakar atau trauma, *damage-associated molecular pattern* (DAMPs) yang dihasilkan oleh sel yang rusak atau sekarat menyebabkan inflamasi baik secara langsung maupun tidak langsung. Peningkatan kadar IL-6 serum mendahului perubahan suhu tubuh dan kadar protein fase akut serum setelah operasi steril.⁵² DAMPs sel yang terluka termasuk berbagai molekul seperti DNA mitokondria (mt), kelompok mobilitas tinggi kotak 1 (HMGB1), dan protein S100.⁵³ Kadar mtDNA serum pada pasien trauma 1.000 kali lipat lebih tinggi dibanding dengan kontrol, serta kenaikan ini menghasilkan TLR9 serta aktifnya NFκB, sementara pengikatan HMGB1 ke TLR2, TLR4, maupun reseptor produk akhir glikasi lanjutan (RAGE) bisa memicu untuk terjadinya inflamasi.⁵³ Keluarga protein S100 mencakup lebih dari 25 anggota, beberapa di antaranya juga berinteraksi dengan RAGE untuk menginduksi inflamasi steril.⁵⁴





Gambar 2.2 Mekanisme aktivasi IL-6.⁵⁵

2.3.3 Peran IL-6 dalam penyembuhan luka

Peran IL-6 dalam penyembuhan luka kulit tidak dapat diabaikan, respon inflamasi sangat penting dalam proses penutupan luka, gangguan jalur pensinyalan IL-6 dapat menunda penyembuhan luka. Pengekspresi utama IL-6 pada luka adalah makrofag M1, dan peningkatan rasio M1:M2, seperti yang terlihat pada lansia dan obesitas, dapat mengganggu penyembuhan luka, karena pensinyalan inflamasi kronis. Sebaliknya, IL-6 memiliki beberapa kendali atas polarisasi M2 melalui promosi IL-4R pada makrofag dan sekresi IL-4 oleh limfosit Th2, dan makrofag M2 ini adalah sekretor yang menonjol dari sitokin

proliferatif TGF- β dan VEGF. *Loop* umpan balik IL-6/TGF- β terlibat dalam patogenesis beberapa kondisi kulit profibrotik, karena beroperasi dalam *loop* autokrin positif pada fibroblas, didukung oleh IL-17A untuk meningkatkan deposisi kolagen dan diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, yang berkontraksi untuk menarik tepi luka menjadi satu.⁵⁵

Stimulasi oleh IL-6 meningkatkan kelangsungan hidup myofibroblast, dan kontraktur yang berlebihan merupakan ciri dari beberapa fibropati kulit. Ekspresi VEGF oleh jaringan endotel, keratinosit, fibroblas, dan makrofag sebagai respons terhadap IL-6 berkontribusi terhadap penyakit fibrotik, yang bergantung pada peningkatan vaskularisasi.⁵⁵

2.4 Mesenchymal Stem Cell (MSC)

2.4.1 Pengertian

Sel induk atau *Stem Cell* (SC) ialah sel yang belumlah berdiferensiasi, SC memiliki fungsi serta kemampuan dalam memperbaharunya diri dengan pembelahan sel serta juga dapat berdiferensiasi jadi sel yang berbeda. Dapat ditemukan di jaringan ataupun organ manusia.⁵⁶ SC memiliki ciri ciri khas yang membedakannya dengan sel lain, (1) SC adalah sel yang tidak memiliki tugas khusus, tetapi dapat terus membelah untuk membuat sel baru, (2) SC merupakan sel yang dapat diubah menjadi jenis sel atau jaringan lain. Ini berarti SC memiliki kemampuan untuk menyembuhkan luka dengan cepat.⁵⁷ Sel induk harus mampu memperbanyak diri tanpa batas untuk menghasilkan sel keturunan yang persis seperti dirinya. SC adalah sel yang dapat digunakan untuk membuat sel baru. Persyaratan yang paling penting bagi sebuah sel untuk

disebut sel punca adalah bahwa sel tersebut dapat berkembang menjadi jenis sel tertentu. Ini berarti bahwa sel punca mempunyai kemampuan teruntuk berkembang jadi bermacam-macam jenis sel di dalam tubuh.⁵⁷

MSC ialah sel multipoten yang bisa bereplikasi dan berdiferensiasi jadi sel yang memiliki kemampuan untuk melakukan banyak hal berbeda, seperti membuat tulang, sel lemak, dan sel tulang rawan, sehingga dapat dipergunakan teruntuk membantu dalam mengobatinya orang yang sedang sakit atau cedera.⁵⁸

2.4.2 Sumber

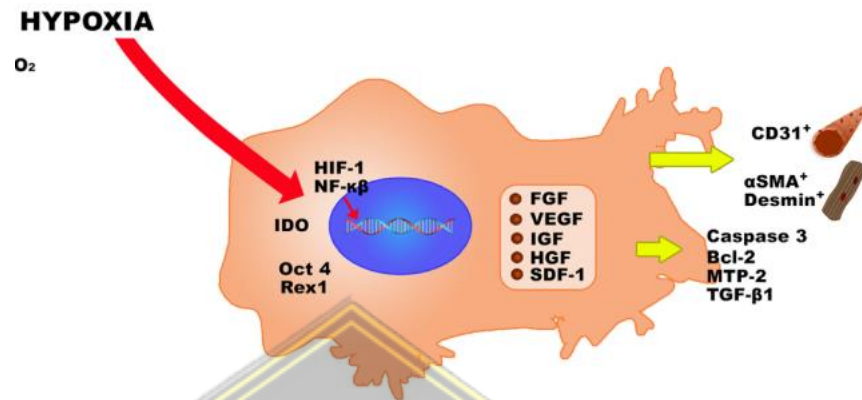
MSC dapat berasal dari dua jenis jaringan yang berbeda yaitu jaringan dewasa dan jaringan neonatal. Sumsum tulang, darah tepi, dan jaringan adiposa semuanya ditemukan di jaringan dewasa. Pada jaringan neonatal bersumber dari plasenta, tali pusat (*umbilical cord*, dan *umbilical cord blood*).⁵⁹

2.4.3 Klasifikasi

MSC dapat berkembang menjadi berbagai sel dewasa, termasuk osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit. Mereka juga memiliki kapasitas untuk memperbaharui diri.²⁷ Bergantung pada rangsangan yang digunakan dalam penelitian in vitro, sel dapat berkembang menjadi berbagai garis keturunan, termasuk tulang, otot, dan lemak, dapat menempel pada plastik dan membentuk koloni seperti fibroblas.⁶⁰

2.4.4 MSC hipoksia

2.4.4.1 Definisi hipoksia



Gambar 2.3 Kondisi hipoksia.⁶¹

Hipoksia adalah suatu kondisi ketika jaringan tidak menerima oksigen yang cukup. Banyak jenis sel menderita hipoksia, yang dalam keadaan hipoksia kronis juga dapat menyebabkan apoptosis sel. Namun, berbagai penelitian telah menemukan bahwa lingkungan hipoksia dapat meningkatkan kapasitas MSC untuk proliferasi, pembaharuan diri, dan adhesi.⁶² Selain itu, dalam keadaan hipoksia, molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF) akan diproduksi, yang membantu MSC menghasilkan lebih banyak sitokin.⁶¹

2.4.4.2 Patogenesis hipoksia

Peranan kompleks oksigen dalam keberlangsungan hidup sel, penurunan kadar oksigen pada jaringan menyebabkan kematian sel. Mengungkapkan adanya faktor transkripsi HIF, yang mengontrol produksi banyak gen yang mengatasi hipoksia. Dua tipe isoform HIF yaitu HIF 1 dan HIF 2, dibuat dari protein alfa dan beta. Keduanya secara

konstan menghasilkan protein konstitutif. Kondisi oksigen mencukupi, HIF 1 alfa dan HIF 2 alfa setelah sintesis akan segera terdegradasi, sedangkan HIF beta terikat sitoplasma, HIF 1 alfa dan 2 alfa tidak hancur dengan adanya kekurangan oksigen melainkan bergabung dengan HIF beta. Kedua zat ini kemudian masuk ke inti sel serta mengaktifkan promotor gen yang terlibat dalam menanggapi keadaan hipoksia. HIF-1 alpha membantu dalam sintesis dan regulasi.⁶³

Setelah berhasil bertahan dari hipoksia berkepanjangan, selanjutnya dilakukan apoptosis. Kumpulan gen yang membantu oksigen mengikat dan melakukan perjalanan dengan lebih mudah. Erythropoietin, VEGF, dan renin semuanya diketahui diatur oleh HIF. Adaptasi metabolik terhadap hipoksia, metabolisme anaerobik akan mendominasi dalam metabolisme.⁶³ Kondisi hipoksia menyebabkan radikal bebas, dihasilkan sebagai akibat kebocoran oksigen ke dalam membran dalam mitokondria selama pengangkutan elektron. Dalam keadaan hipoksia, mitokondria menjadi tidak stabil sehingga menyebabkan peningkatan produksi H₂O₂.

2.4.4.3 Efek kultur MSC hipoksia

Pada kultur MSC terkondisi hipoksia terjadi peningkatan viabilitas sel, potensi proliferasi, peningkatan kadar GSH dan SOD, dan menurunkan ROS. Meningkatnya ekspresi HIF-1 α , berfungsi untuk bertahan pada kondisi hipoksia dan stres oksidatif, berperan pada fungsi transplantasi. MSC kondisi hipoksia memberikan fungsi terapeutik lebih

baik dibanding kondisi normal. Untuk meningkatkan efektivitas terapeutik MSC dari berbagai sumber atau jaringan, kultur MSC hipoksia telah digunakan untuk meniru kondisi lingkungan yang dialami MSC secara *in vivo*. Mengubah metabolisme seluler selama pertumbuhan, meningkatkan resistensi stres oksidatif, dan akibatnya meningkatkan pengikatan, kelangsungan hidup dalam lingkungan mikro iskemik, dan potensi angiogenik dari MSC yang ditransplantasikan.⁶⁴

2.4.4.4 Efek *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* pada penelitian terdahulu

Penelitian menggunakan MSC dalam keadaan hipoksia memberikan hasil yang signifikan, karena meningkatkan kelangsungan hidup sel, meningkatkan aktivitas sinyal parakrin untuk membuat *niche* sel punca yang baik, peningkatan proliferasi sel, dan membuat jalur garis keturunan lebih terarah dan memiliki potensi yang lebih baik.⁶⁵

Kultur BMSC merupakan sumber induksi hipoksia. BMSC telah lama dikenal sebagai sumber utama aplikasi pengobatan regenerasi sel punca dan neoangiogenesis pada miocard.⁶⁶ Hasil penelitian tidak menghasilkan penanda CD31 positif, dengan tidak adanya ekspresi CD31 dan CD34. Kondisi hipoksia merangsang kompleks HIF, berkorelasi dengan ekspresi faktor pertumbuhan (IGF, bFGF, VEGF). Berbeda dengan normoksia, ditemukan bahwa konsentrasi VEGF lebih besar pada BMSC hipoksia. Hal ini menunjukkan bahwa VEGF, yang memiliki potensi yang meningkat dalam proses angiogenesis, dilepaskan

saat hipoksia diinduksi.⁶⁶

Keadaan hipoksia mempercepat pengaturan kemokin oleh HIF-1 seperti aktivitas parakrin SDF-1, IL-8, MCP-1, dan MCP-3, sebagai komponen penting merangsang *neoangiogenesis* dan *neovaskularisasi*. Diperkirakan bahwa HPC-BMSCs berperan dalam angiogenesis, terutama dalam hal migrasi dan *engraftment* sel.^{65,67}

2.5 Hubungan Sekretome Hipoksia MSC terhadap ekspresi TGF- β dan IL-6 pada luka eksisi.

MSC memiliki dua peran dalam tahapan penyembuhan luka. Pertama sebagai imunomodulator yang mengatur proses inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Yang kedua secara langsung membedakan dan mengganti sel yang terluka.⁶⁸ MSC akan melepaskan molekul terlarut yang mencakup lebih banyak mediator antiinflamasi dan faktor pertumbuhan dalam regenerasi kulit seperti VEGF, PDGF, HGF, TNF- α , FGF, mengubah faktor pertumbuhan TGF- β 1, angiopoietin, IL-1, IL-6, serta IFN γ , beberapa faktor pertumbuhan serta mediator yang dikeluarkan MSC pada kondisi hipoksia sebagai pendukung regenerasi kulit.⁶⁹

Ketika kultur sel dengan media oksigen yang rendah, oksigen yang tersedia berdifusi ke mitokondria, menciptakan lingkungan sitosol dengan kadar oksigen rendah. Ini menghambat aktivitas *prolyl hidrosilase*, yang mengontrol aktivasi *Hypoxia-Inducible Factors* (HIF). HIF ialah heterodimer yang terdiri atas subunit HIF-1 α serta juga HIF-2 α yang mengontrol oksigen dan subunit β yang diekspresikan secara kontinu.⁷⁰ HIF-1 α akan tetap

aktif di lingkungan dengan oksigen rendah.⁷¹

Eksresi HIF-1 α meningkat dalam kultur hipoksia untuk menurunkan level ROS dalam mitokondria MSC, keadaan ini akan memicu NF κ B. HIF-1 α mempromosikan produksi protein PrPC. NF κ B dan PrPC menstimulasi protein anti-apoptosis, faktor pertumbuhan, dan sitokin regeneratif dan enzim antioksidan.³⁸ Ketika luka muncul, peningkatan isoform TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 mempercepat proses penyembuhan pada fase inflamasi, proliferasi, dan remodeling.⁷²

Ketika NF- κ β diaktifkan, maka akan menuju nukleus dan memicu transkripsi gen targetnya, termasuk IL-6, IL-1, IL-8, dan TNF- α .⁷³ Jalur STAT3 diaktifkan oleh aktivasi IL-6 yang mengikat reseptor CD126, yang juga menyebabkan NF- κ β diaktifkan untuk kembali mentranskripsi sitokin inflamasi. Dua jalur sel imun utama yang mengontrol produksi sitokin inflamasi dapat diklasifikasikan sebagai NF- κ β dan STAT. NF- κ β dan STAT adalah faktor transkripsi yang menginduksi ekspresi gen pada berbagai macam ligan, gen yang diinduksi keluarga STAT juga dapat menghasilkan produksi sitokin inflamasi setelah aktivasi reseptor membran plasma.⁷⁴ Maka dengan adanya SH-MSCs merupakan kandidat yang mampu mempercepat menyembuhkan luka eksisi.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori

Penelitian ini menggunakan variabel bebas dosis 400 μ L gel topical *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*, Variabel terikat ekspresi gen TGF- β dan ekspresi gen IL-6, kemudian menggunakan variabel prakondisi yaitu tikus *Wistar* dengan luka eksisi.

Perbaikan luka kulit dalam kondisi yang kurang ideal dipengaruhi beberapa faktor, sehingga memperpanjang proses penyembuhan.⁷ Proses penyembuhan kulit merupakan peristiwa seluler dan biokimia pada perbaikan luka yang bisa dibagikannya jadi 3 macam tahapan, yakni: respon inflamasi, proliferasi sel serta sintesis elemen matriks ekstraseluler, serta juga periode selanjutnya, yang dikenal sebagai remodeling.³⁴ Sel kekebalan pertama yang bermigrasi ke jaringan yang terluka adalah monosit dan neutrofil.³⁷ *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *Prostaglandin*, *Interleukin-1* (IL-1), TGF- β , C5a, serta juga produk degradasi bakteri seperti halnya *Lipopolysaccharide* (LPS) bakal merangsang neutrofil untuk diapedesis ke dalam jaringan yang terluka serta juga mengisi rongga luka.³⁸

Fase proliferasi berlangsung selama empat hari, dari hari keempat hingga hari kedua puluh satu. Fase ini dibedakan oleh aktivitas re-epitelisasi sel epitel jaringan. Migrasi keratinosit di tepi luka memulai proses reepitelialisasi. Dalam 5-7 hari, luka akan tertutup akibat reepitelisasi. Setelah selesai, membran dasar akan terbentuk antara epidermis dan dermis. Faktor pertumbuhan seperti halnya PDGF

serta TGF- β , merangsang aktivitas fibroblas dengan menyebabkannya berproliferasi dan menghasilkan matriks ekstraseluler.³⁶ Fase maturasi dapat berlangsung dari 18-21 hari hingga 1-2 tahun. Setelah rongga luka diisi dengan matriks ekstraseluler serta jaringan granulasi, fase maturasi dimulai, serta kolagen tipe I menggantikan kolagen tipe III. Sel dan matriks ekstraseluler matang selama fase ini.³⁷

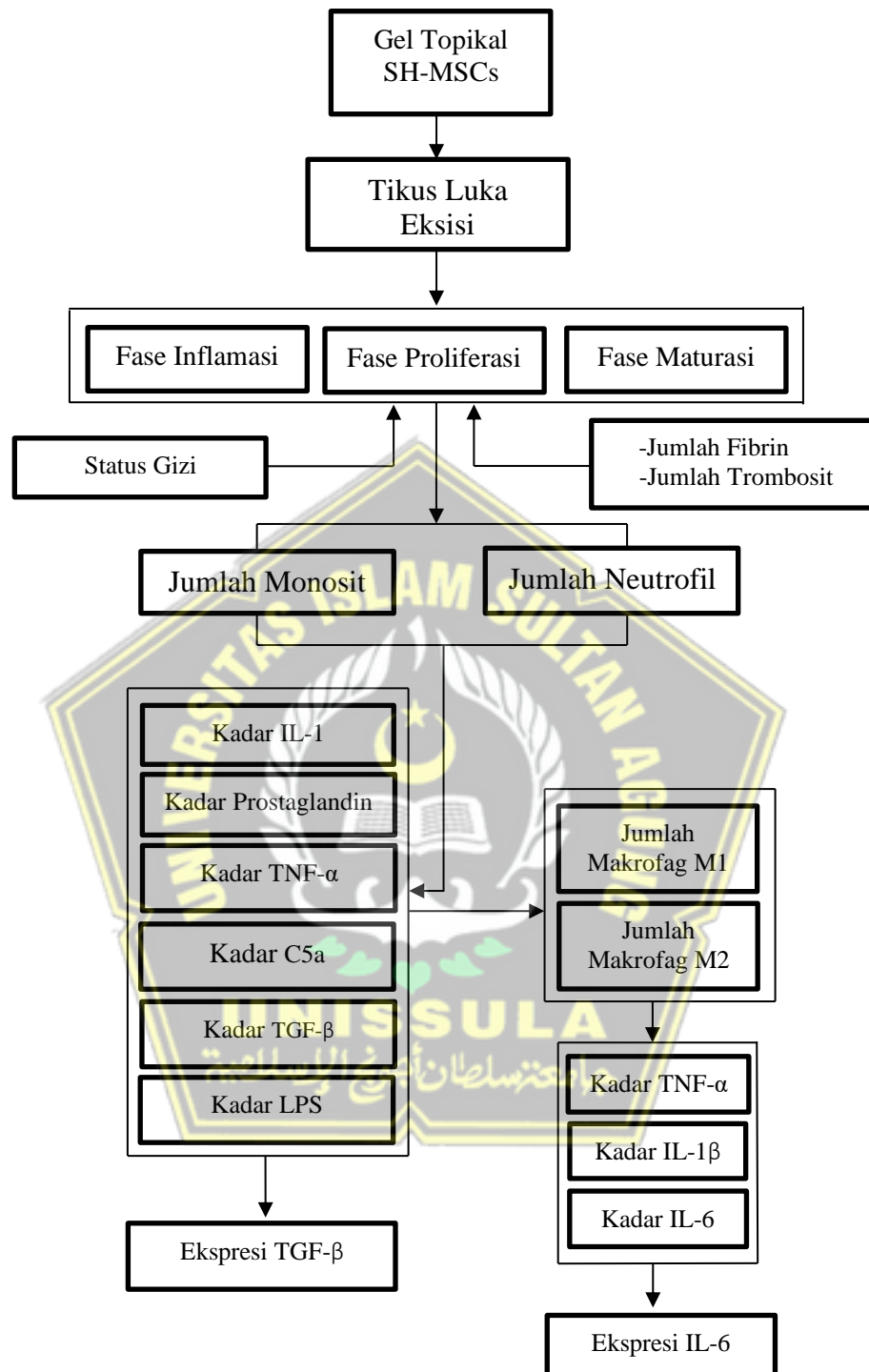
MSC mampu membedakan dan melepaskan sitokin dan faktor pertumbuhan.² Secara aktif terlibat dalam komunikasi dan interaksi dengan sel imun bawaan dan adaptif untuk mengobati penyakit imunologi.⁷⁵ Kemampuan MSC untuk menekan sistem kekebalan terkait dengan produksi sitokin seperti TGF- β , IDO, NO, PGE2, IL-10, dan TSG-6. TGF- β 1 bekerja sebagai sitokin anti inflamasi yang kuat dalam mengatur respon inflamasi yang tidak terkendali. memperbaiki gangguan kekebalan dengan menghasilkan CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺, dan Treg.⁵

Telah ditunjukkan kombinasi TGF- β dan IL-6 sangatlah dibutuhkan teruntuk diferensiasi Th17 dari sel T CD4⁺ naif, dengan mendorong perkembangan sel T naif CD4⁺, IL-6 memainkan peran penting dalam menjembatani kesenjangan antara respon imun bawaan dan respon imunologi yang didapat. Tetapi IL-6 itu juga menghambat diferensiasi Treg yang diinduksi TGF- β .⁶ Peningkatan keseimbangan Th17/Treg diyakini sebagai penyebab berkurangnya toleransi imun, dan secara patologis terlibat pada perkembangan autoimun maupun penyakit radang kronis.⁷⁶ Salah satu faktor pertumbuhan utama, factor TGF- β penting untuk setiap langkah penyembuhan luka pada fase inflamasi dan proliferasi.¹⁸ Melalui isoformnya, TGF- β meningkatkan migrasi dan aktivasi sel inflamasi selama fase inflamasi

penyembuhan luka, dan mengontrol reepitelisasi, angiogenesis, dan perkembangan jaringan granulasi selama fase proliferasi.¹⁹ Selain itu sitokin yang memiliki peranan penting pada tahap penyembuhan luka diantaranya ialah IL-6.²³ IL-6 bertindak sebagai mediator dalam berbagai situasi darurat, diproduksi pada lesi infeksius, dan mengaktifkan sinyal peringatan ke seluruh tubuh.⁴³

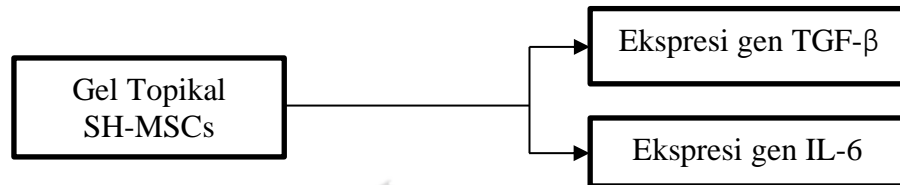
Antigen pengontrol peradangan yang disekresikan dan distimulasi dalam sintesis oleh sel punca mesenkimal. Peradangan yang terkontrol dikaitkan dengan tingkat penyembuhan luka yang lebih cepat.²⁴ Terapi secretome hipoksia MSC memiliki kapasitas untuk diferensiasi dan imunoregulasi dan tidak memiliki risiko penolakan pasca injeksi, terapi ini dianggap efektif dalam meningkatkan penyembuhan luka kulit.²⁵ MSC memiliki dampak yang signifikan pada pengobatan luka kronis yang tidak sembuh atau bekas luka hipertrofik yang terkait dengan gangguan reepitelisasi.⁷⁷ Penelitian ini mengamati pemberian MSC pada tikus Wistar dengan luka eksisi diharapkan dapat meningkatkan kadar TGF- β dan menurunkan kadar IL-6.

Didasarkan dari tinjauan pustaka yang ada di atas, maka daripada itu bisa dibuat kerangka teori seperti berikut:



Gambar 3.1 Skema kerangka teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Skema kerangka konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

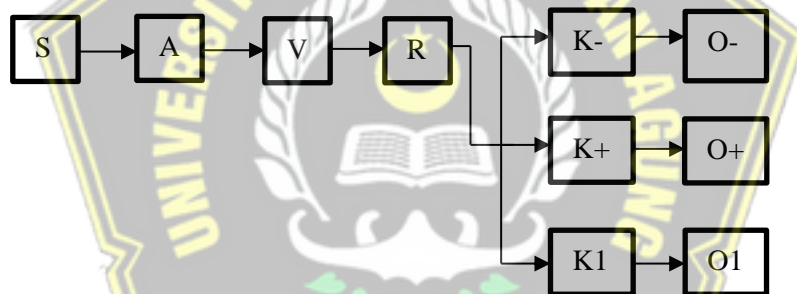
- a. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ terhadap ekspresi gen TGF- β pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi.
- b. Terdapat pengaruh pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ terhadap ekspresi gen IL-6 pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah penelitian laboratorium eksperimental dengan hewan coba menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Only Control Group Design*”. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok yaitu: kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan 1



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat
A : Adaptasi
V : Validasi
R : Randomisasi
K- : Kontrol negatif (Tikus luka eksisi dengan perlakuan basic gel placebo)
K+ : Kontrol positif (Tikus dengan luka eksisi dengan perlakuan diberi *Clobetasol* dosis 0,25g/kgBB).⁷⁸
P1 : Tikus dengan luka eksisi di olesi gel topikal SH-MSCs dosis

400 μ L/kgBB.

O : Observasi

4.2 Populasi dan sampel penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian menggunakan tikus Wistar dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR)

4.2.2 Sampel penelitian

4.2.2.1 Kriteria inklusi

1. Tikus *Wistar* jantan sehat tanpa bekas luka
2. Berat badan 200-250 gram
3. Tikus berumur 2-3 bulan
4. Tikus luka eksisi yang divalidasi dengan dibuatkan luka diameter 6 mm dengan kedalaman 2 mm.

4.2.2.2 Kriteria eksklusi

1. Tikus *Wistar* jantan yang mati selama perlakuan
2. Kondisi tikus tidak sehat, tidak lincah dan terdapat bekas luka.
3. Memiliki kelainan anatomi.
4. Sudah pernah digunakan pada penelitian sebelumnya.

4.2.2.3 Kriteria Droup Out

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.2.2.4 Besaran sampel

Sampel jumlah minimal mengikuti kriteria WHO sebanyak 5 ekor per kelompok. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari

ke-6 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus wistar. Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini menggunakan rumus sampel eksperimental dari Federer 107, dengan rumus:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6 \rightarrow \text{Pembulatan menjadi 6.}$$

keterangan :

t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan

4.3 Variabel dan definisi operasional

4.3.1 Variabel penelitian

4.3.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah gel topikal SH-MSCs dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$.

4.3.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Ekspresi gen TGF- β dan ekspresi gen IL-6.

4.3.2 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Pengertian	Skala Data
1	Gel Topikal SH-MSCs	Gel topikal SH-MSCs diperoleh dari Lab SCCR, yang dioles pada luka eksisi setiap 1x/hari pada punggung tikus dengan dosis 400 μ L/kgBB selama 5 hari	Nominal
2.	Ekspresi gen TGF- β dan ekspresi gen IL-6	Ekspresi gen TGF- β dan ekspresi gen IL-6 pada tikus Wistar yang diambil dari jaringan kulit diperiksa pada hari ke 6 menggunakan RT-qPCR.	Rasio
3.	Perlakuan luka eksisi sebagai variabel pra kondisi	Tikus <i>Wistar</i> dibius, rambut pada punggung tikus dicukur dengan diameter 2cm lalu dilukai dengan biopsi <i>punch</i> diameter 6mm dengan kedalaman 2 mm menggunakan cutter (pisau bedah) dan diisolasi sesuai kelompok.	-

4.4 Bahan/materi penelitian

Bahan terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, *dinitrophenyl-bovine* serum albumin (DNP-BSA), gel aluminium hidroksida (Al(OH)), 2,4-*Dinitrochlorobenzene* 1,5% (DNCB), aseton-minyak zaitun NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alkohol 70 %, PBS, ketamin, dan xylasine.

4.5 Peralatan

Penelitian menggunakan perlengkapan kultur sel yaitu: *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, *dissecting kit*, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. *Oxygen* meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen, penelitian ini

dilakukan secara steril swab untuk mengoleskan gel topikal SH-MSCs.

4.6 Cara penelitian

4.6.1 Etik Penelitian

Etik penelitian/*Ethical clearance* diajukan ke komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.6.2 Perlakuan pada luka hewan coba

Penelitian menggunakan sampel 18 ekor tikus *Wistar* yang sesuai kriteria, diaklimasi selama 1 minggu, kemudian dibagi menjadi 3 kelompok:

- Kelompok Negatif (I): Tikus *Wistar* dengan luka eksisi diolesi basic gel placebo selama 5 hari, kemudian diamati ekspresi TGF- β dan IL-6 pada hari ke 6.
- Kelompok Positif (II): Tikus *Wistar* dengan luka eksisi diolesi selama 5 hari *Clobetasol* dosis 0,25g/kg.⁷⁸ Kemudian jaringan kulit diambil pada hari ke 6 untuk diamati ekspresi TGF- β dan IL-6.
- Kelompok (III): Tikus *Wistar* dengan luka eksisi yang diolesi gel topikal SH-MSCs dosis 400 μ L/kgBB selama 5 hari, lalu jaringan kulit diambil pada hari ke 6 untuk diamati ekspresi TGF- β dan IL-6.

4.6.3 Teknik Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%

2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke *petri dish*, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

4.6.4 Proses Hipoksia

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam *chamber*.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan disaring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SH-MSC yang selanjutnya dicampurkan dengan gel sesuai dengan dosis 400 µL.

4.6.5 Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan cara mencampurkan basis gel hydrogel (*Katecho*) sebanyak 400 mg dengan sekretom pada K3.
2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.6.6 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek

Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian punggung tikus di potong hingga bersih dengan diameter 2cm.
3. Permukaan kulit yang telah bersih menggunakan bovidon iodin untuk menghindari infeksi selama pembuatan luka. Pembuatan luka dilakukan dengan menggunakan eksisi *punch biopsy* melingkar dengan ketebalan penuh 6 mm.
4. Selanjutnya dengan pemberian gel topikal setiap hari selama 6 hari yang mengandung SH-MSK dosis 400 μ L/kgBB. Tikus kontrol negatif diberikan perlakuan base gel, Tikus kontrol positif diberikan perlakuan *Clobetasol*.
5. Sampel kulit pada semua kelompok diambil untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).
6. Sampel kulit tikus pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%
7. Sampel kulit dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif.

8. Sampel kulit dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk proses dehidrasi.
9. Sampel kulit dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam.
10. Infiltrasi ke dalam parafin dilakukan di dalam oven pada suhu 56-60°C dengan cara memasukkan sampel kulit ke dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Sampel kulit dimasukkan ke dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing perlakuan selama 30 menit.
11. *Embedding*, sampel kulit dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras.
12. Sampel kulit dalam blok paraffin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 μm menggunakan mikrotom.
13. Irisan sampel jaringan ditempelkan pada gelas benda dengan cara mengoleskan Mayer's albumin dan ditetesi sedikit akuades lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga irisan menempel dengan sempurna.
14. Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam.

15. *Staining* (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna hematoksilin-eosin. Kandungan xylol diserap dengan kertas saring, kemudian berturut-turut dimasukkan ke alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, dan akuades masing-masing dilakukan selama 1-2 menit. Preparat dimasukkan ke dalam pewarna Hematoksilin selama 5-10 detik, lalu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit. Proses selanjutnya preparat dicelupkan ke dalam alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70% masing-masing selama 3-5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam eosin selama 5-10 menit, kemudian dicelupkan ke alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing selama 3-5 menit, lalu dikeringkan dengan kertas saring. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 15 menit, kemudian sediaan histologis ditetesi canada balsam.

16. Preparat ditutup kaca penutup, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan.

4.6.7 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sample darah yang diambil dan diproses dengan sentrifugasi bertingkat menggunakan *Ficoll Paque* untuk mendapatkan PBMCs.
2. Sampel kulit yang sudah difiksasi dengan formalin 10% selanjutnya dibuat menjadi blok paraffin.

3. Sampel kulit sebanyak 50 mg dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan dimasukkan kedalam tube yang telah berisi 50 mL RNA TRIZOL (larutan Phenol).
4. PBMCs sebanyak 10^7 sel masing-masing dipindahkan ke mikro tube dan diberi 50 mL RNA TRIZOL (larutan Phenol).
5. Potongan sampel kulit ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi RNA TRIZOL (larutan Phenol) sebanyak 1 ml dan disimpan pada suhu ruang selama 5 menit.
6. Tambahkan 0,2 mL *chloroform* dan divortex hingga larutan berubah warna menjadi putih susu.
7. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 xg selama 15 menit pada suhu 4°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
8. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur dan ditambahkan isopropanol dengan volume 0,2 ml yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
9. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 12.000 xg selama 10

menit pada suhu 4⁰C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.

10. Setelah kering ditambahkan 1 ml etanol 70% dalam larutan *nuclease free water* (NFW) lalu bolak-balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali dengan kecepatan 7.500 xg selama 5 menit pada suhu 4⁰C.
11. Supernatan dibuang dan ditambahkan NFW sebanyak 100 µL. Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C. RNA dikuantifikasi dengan µDrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 260 ng.
12. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 µL OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 µL, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70⁰C.
13. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 µL, DEPC-Treated H₂O 5 µL, ReverTraAce 1 µL. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65⁰C selama 5 menit, 37⁰C selama 5 menit dan 37⁰C selama 15 menit, 50⁰C selama 5 menit, 95⁰C selama 5 menit.

4.6.8 Pembacaan Ekpresi gen TGF-β dan IL-6 metode RTq-PCR

1. Dengan terukur campuran 3 µL cDNA sampel, *Taq master mix* (dNTPs, *Taq DNA polymerase*, *reaction buffer*, dan MgCl₂)

sebanyak 12,5 μ L, tambahkan primer spesifik pada setiap gen target sebanyak 0,6 μ L untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μ L *Nuclease Free Water*.

2. Lakukan analisa menggunakan illumine RT-PCR. Menggunakan Sekuens primer GADPH sebagai berikut:

F: 5'-GCG ACA GTC AAG GCT GAG AATG -3' dan

R: 5'-TCT CGC TCC TGG AAG ATG GTGA -3'.

3. Menggunakan Sekuens primer TGF- β :

F: 5'-TAC CAT GCC AAC TTC TGT CTG GGA-3' dan

R: 5'-ATG TTG GAC AAC TGC TCC ACC TTG-3'.

4. Menggunakan Sekuens primer IL-6:

F: 5'-TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC-3' dan

R: 5'-TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC-3'.

5. Hasil ekspresi gen dianalisis pada ratio terhadap *house keeping* gen dengan menggunakan *software EcoStudy*.

4.7 Teknik pengumpulan dan Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan dilakukan uji homogenitas dengan *Leveine test* ($p > 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok digunakan uji ANOVA one way ($p < 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji *Post hoc/LSD* untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok ($p < 0,05$). Pengolahan Analisa data pada penelitian ini menggunakan aplikasi desktop SPSS 26.0 *for windows*.

4.8 Jadwal pelaksanaan penelitian

4.8.1 Tempat pelaksanaan

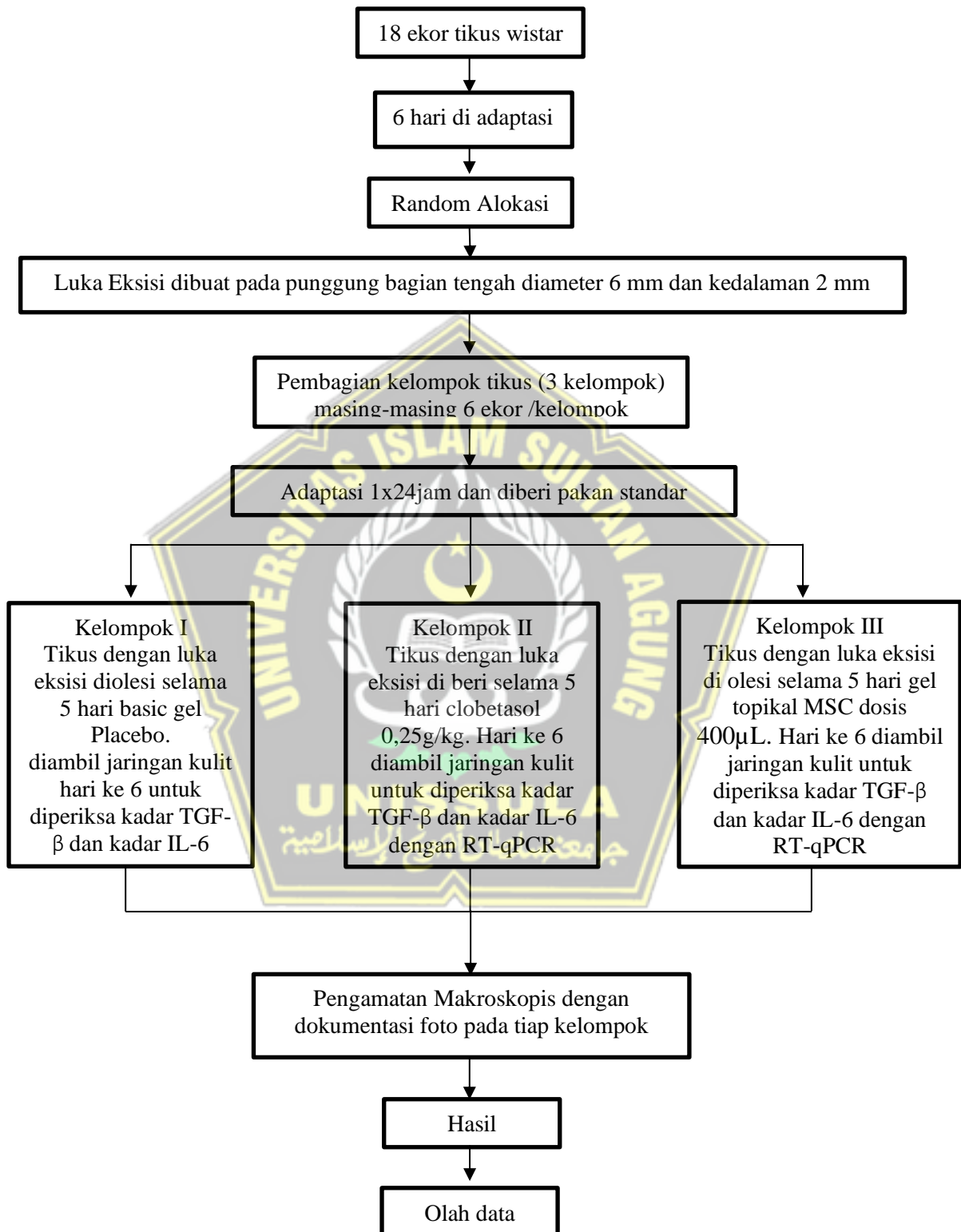
Di laboratorium hewan coba Universitas Islam Sultan Agung dan pemeriksaan dilaksanakan di laboaratorium SCCR.

4.8.2 Waktu penelitian

Jadwal pelaksanaan penelitian dimulai dari persiapan hewan coba sampai dengan proses pengambilan data pada bulan Juli-Agustus 2023.



4.8.3 Alur kerja penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur kerja

BAB V

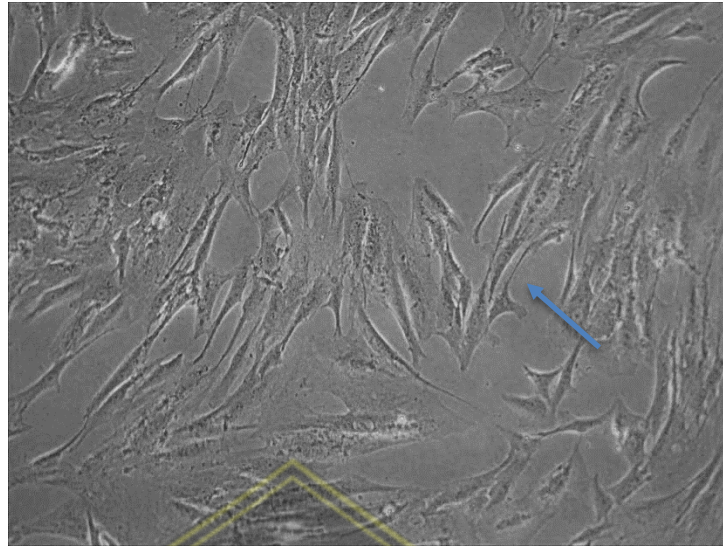
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL-6 pada tikus *Wistar* dengan model luka eksisi. Studi eksperimental *In Vivo* dilakukan selama bulan Juli-Agustus 2023 di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang. Studi menggunakan subjek tikus *Wistar* jantan berjumlah 18 ekor. Pembuatan model luka eksisi dengan kriteria tikus *Wistar* sehat, berusia 2-3 bulan, dan bobot rata-rata 242,05 gram, diberikan anestesi umum dengan ketamin HCl. Bagian dorsal rambut yang dicukur dibuat luka dengan biopsi *punch* diameter 6 mm dengan kedalaman 2 mm. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok secara acak, kelompok I diberikan basic gel placebo, kelompok II diberikan *Clobetasol* dosis 0,25g/kg, dan kelompok III diberikan gel topikal SH-MSC dosis 400 μ l/kgBB. Ekspresi TGF- β dan IL-6 dibandingkan antar kelompok.

5.1 Hasil Penelitian

Gel topikal SH-MSCs yang digunakan diambil dari *Umbilical Cord* tikus bunting yang berumur 21 hari. Validasi MSC dengan analisis fenotipik sel dengan *flowcytometry* dan menguji kapasitas diferensiasi osteogenik. Sel-sel yang diverifikasi kemudian dikultur dalam lingkungan hipoksia.

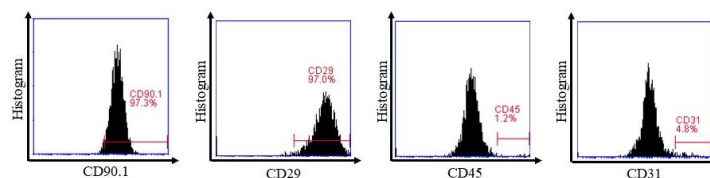
Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada *flask* plastik menggunakan *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM). Sel-sel yang terlihat secara mikroskopis dalam kultur MSC setelah bagian kelima memiliki morfologi yang mirip dengan spindle dan melekat pada bagian bawah flask plastik.



Gambar 5.1 Isolasi MSC sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.

MSC yang telah melewati proses validasi menggunakan CD90, CD29, CD45, dan CD31. Prosedur hipoksia dengan cara MSC diinkubasi ke dalam *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Tahapan akhir yaitu melakukan pemeliharaan sel hingga MSC mencapai konfulensi 80% untuk mendapatkan hipoksia MSC.

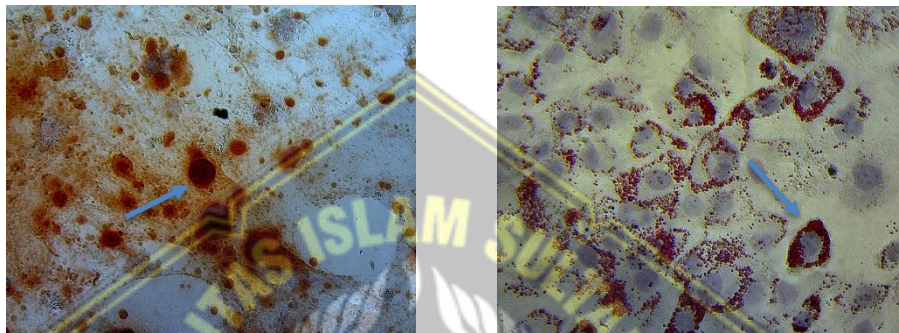
Penelitian ini menunjukkan bahwa MSC mampu mengekspresikan CD90 (97,3%), CD29 (97,0%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,2%) dan CD31 (4,8%).



Gambar 5. 2 Analisa *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

MSC dalam proses hipoksia dipertahankan selnya agar menghasilkan Sekretom hipoksia MSC, Studi ini juga menguji kapasitas MSC untuk

berkembang menjadi berbagai jenis sel dewasa. MSC dibedakan menjadi osteofit dan adiposity. Pada penelitian ini MSC dapat berkembang menjadi osteofit dan adiposit, seperti yang terlihat oleh endapan kalsium dan lemak yang tampak merah ketika pewarna *Alizarin Red* dan *oil Red* digunakan masing-masing dalam kultur osteogenik dan adipogenik.

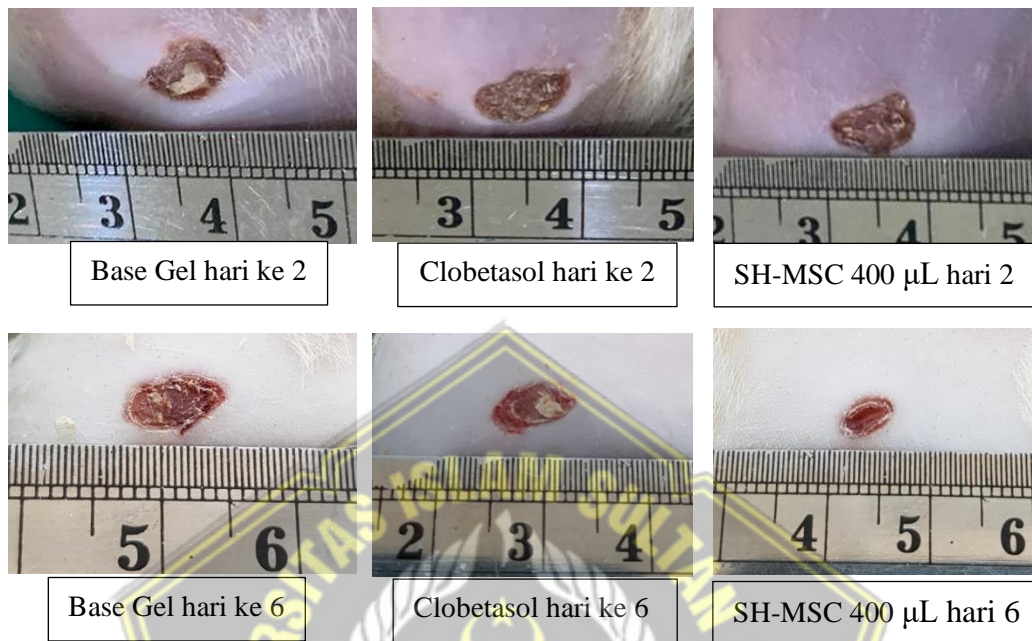


Gambar 5.3 (kiri) MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (kanan) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 400x

Media kultur MSC yang mengandung sekretom dikumpulkan dan disaring menggunakan metode *Tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan pada spesifik pemutusan berat molekul untuk mendapatkan molekul berukuran 10–50 kDa yang mengandung sitokin IL-10 dan TGF- β .^{79,80} MSC memiliki kemampuan untuk melepaskan IL-10, molekul antiinflamasi monomer dengan ukuran sekitar 18 kDa yang terutama terlibat dalam proses immunosupresif pada kondisi hipoksia. TGF- β merupakan molekul *growth factor* dimer berukuran 25kDa yang membantu mempersingkat durasi respons inflamasi.⁸¹

Hasil gambaran makroskopik jaringan kulit pada luka eksisi menggambarkan perbaikan yang tidak berbeda signifikan secara makroskopis, terlihat pada foto luka masing-masing kelompok Base gel, Clobetasol, dan SH-MSc 400 μ L perlakuan hari

ke 2 dibandingkan dengan kelompok Base gel, Clobetasol, dan SH-MSC 400 μL hari ke 6 sebagai berikut:



Gambar 5. 4 Gambaran hasil Makroskopik jaringan kulit pada luka eksisi pada hari ke 2 dan hari 6

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1 dibawah, rerata ukuran makroskopik luka eksisi antar ketiga kelompok pada hari ke 2 berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data makroskopik luka eksisi normal dan homogen.

Tabel 5.1 Uji normalitas dan homogenitas makroskopik luka eksisi antar kelompok perlakuan hari ke 2

Kelompok	Base gel (K-)	Clobetasol (K+)	SH-MSK 400 μ L (P1)	<i>p</i> <i>value</i>
Tikus 1	0.8	0.7	0.7	
Tikus 2	0.8	0.9	0.9	
Tikus 3	0.9	0.8	0.8	
Tikus 4	1.0	0.9	0.9	
Tikus 5	1.0	0.8	0.8	
Tikus 6	0.9	1	1	
Mean	0,90	0,85	0,87	
SD	0,89	0,10	0,82	
<i>Shapiro wilk</i>	0,167*	0,820*	0,091*	
<i>Levene test</i>				0,782**

Keterangan :

**Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

** *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)

Rerata ukuran makroskopik luka eksisi antar ketiga kelompok pada hari ke 6 berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data makroskopik luka eksisi normal dan homogen.

Tabel 5.2 Uji normalitas dan homogenitas makroskopik luka eksisi antar kelompok perlakuan hari ke 6

Kelompok	Base gel (K-)	Clobetasol (K+)	SH-MSc 400 μ L (P1)	<i>p</i> <i>value</i>
Tikus 1	0.8	0.9	0.6	
Tikus 2	0.6	0.7	0.6	
Tikus 3	0.5	0.6	0.5	
Tikus 4	0.6	0.8	0.5	
Tikus 5	0.7	0.5	0.8	
Tikus 6	0.6	0.7	0.7	
Mean	0,62	0,95	0,38	
SD	0,19	0,33	0,20	
<i>Shapiro</i> <i>wilk</i>	0,47*	0,96*	0,421*	
<i>Levene</i> <i>test</i>				0,86**

Analisa statistik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p=0,472$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan tidak terdapat perbedaan signifikan secara makroskopik.

5.1.1 Pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 400 μ L terhadap ekspresi gen TGF- β .

Hasil analisis ekspresi gen TGF- β pada hari ke 6, menggunakan metode *RealTime Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* menggunakan alat *Eco Real-Time PCR Illumina* didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.3 Uji normalitas dan homogenitas ekspresi gen TGF- β antar kelompok perlakuan

Kelompok	Base gel (K-)	Clobetasol (K+)	SH-MSC 400 μ L (P1)	<i>p</i> value
Tikus 1	0,62	1,41	1,11	
Tikus 2	0,71	0,69	1,31	
Tikus 3	0,39	0,65	1,25	
Tikus 4	0,48	1,10	1,43	
Tikus 5	0,92	0,65	1,68	
Tikus 6	0,61	1,23	1,53	
Mean	0,62	0,95	1,38	
SD	0,19	0,33	0,20	
<i>Shapiro wilk</i>	0,94*	0,15*	0,99*	
<i>Levene test</i>				0,056**

Keterangan :

**Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

** *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1 Rerata ekspresi gen TGF- β di kelompok P1 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen TGF- β kelompok K+. Selanjutnya rerata ekspresi gen TGF- β kelompok K-. Data ekspresi gen TGF- β ketiga kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,056$ ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen TGF- β normal dan homogen.

Analisa statistik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen TGF- β yang bermakna diantara ketiga kelompok. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk melihat kelompok

mana yang paling berpengaruh.

Tabel 5.4 Uji *Post Hoc* LSD ekspresi gen TGF- β pada masing-masing kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K-	K+	0,038*	-0.6357	-0.0199
	P1	0,000*	-1.0703	-0.4545
K+	K-	0,038*	0.0199	0.6357
	P1	0,009*	-0.7425	-0.1267
P1	K-	0,000*	0.4545	1.0703
	K+	0,009*	0.1267	0.7425

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Berdasarkan data diatas didapatkan rerata K- dengan K+ (0,038) dan K- dengan P1 (0,000) terdapat perbedaan yang bermakna, K+ dengan K- (0,038) dan K+ dengan P1 (0,009) terdapat perbedaan yang bermakna sama halnya pada kelompok P1 dengan K- (0,00) dan P1 dengan K+ diperoleh nilai (0,009) ($p < 0,05$) sehingga berbeda bermakna antar kelompok tersebut. Hasil uji *Post Hoc* LSD pada data ekspresi gen TGF- β menunjukkan bahwa pemberian gel topikal SH-MSCs 400 μ l/kgBB dapat meningkatkan ekspresi gen TGF- β pada tikus jantan galur wistar model luka eksisi.

5.1.2 Pengaruh pemberian gel topikal SH-MSCs dosis 400 μ L terhadap ekspresi gen IL-6.

Hasil analisis ekspresi gen IL-6 pada hari ke 6, menggunakan metode *RealTime Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* menggunakan alat *Eco Real-Time PCR Illumina* didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.5 Uji normalitas dan homogenitas ekspresi gen IL-6 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Base gel (K-)	Clobetasol (K+)	SH-MSC 400 μ L (P1)	<i>p value</i>
Tikus 1	2,39	1,31	0,85	
Tikus 2	1,72	1,34	0,30	
Tikus 3	1,86	1,92	0,73	
Tikus 4	2,00	1,46	0,93	
Tikus 5	2,61	1,55	0,93	
Tikus 6	2,00	1,76	0,61	
Mean	2,10	1,56	0,72	
SD	0,34	0,24	0,24	
<i>Shapiro wilk</i>	0,49*	0,51*	0,24*	
<i>Levene test</i>				0,47*

Keterangan :

**Uji Saphiro Wilk* ($p > 0,05$ = normal)

***Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.4 diatas, rerata ekspresi gen IL-6 di kelompok K- memiliki nilai tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen IL-6 kelompok K+. Selanjutnya rerata ekspresi gen IL-6 terendah pada kelompok P1. Data ekspresi gen IL-6 ketiga kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,47$ ($p > 0,05$).

Distribusi dan varian data ekspresi gen IL-6 normal dan homogen.

Analisa statistik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen IL-6 yang bermakna diantara ketiga kelompok. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.

Tabel 5.6 Uji *Post Hoc LSD* ekspresi gen IL-6 pada masing-masing kelompok.

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K-	K+	0,004*	0.1999	0.8911
	P1	0,000*	1.0300	1.7212
K+	K-	0,004*	-0.8911	-0.1999
	P1	0,000*	0.4845	1.1757
P1	K-	0,000*	-1.7212	-1.0300
	K+	0,000*	-1.1757	-0.4845

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda bermakna.

Berdasarkan data diatas didapatkan rerata K- dengan K+ (0,004) terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan K- dengan P1 (0,000) dan K+ dengan K- (0,004) tidak terdapat perbedaan yang bermakna, K+ dengan P1(0,000), P1 dengan K- (0,000), dan P1 dan K+ (0,000), terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hasil uji *Post Hoc LSD* pada ekspresi gen IL-6 menunjukkan bahwa pemberian gel topikal SH-MSCs 400 μ l/kgBB dapat menurunkan ekspresi gen IL-6 pada tikus jantan galur wistar model luka eksisi.

5.2 Pembahasan

Luka eksisi adalah salah satu jenis luka yang terjadi pada permukaan kulit dimana bagian bawah lapisan kulit tersebut terpotong dengan kedalaman yang bervariasi dengan pinggiran luka yang teratur.³⁰ Penyembuhan luka kulit sebagai proses fisiologis penting yang melibatkan kolaborasi berbagai strain sel dan produknya. Pemulihan dari lesi yang disebabkan oleh agresi lokal dimulai pada awal tahap inflamasi. Perbaikan yang terdiri dari penggantian struktur khusus disebabkan oleh deposisi dan regenerasi kolagen, sesuai dengan proses proliferasi dan diferensiasi sel secara posterior melalui jaringan sel punca.³¹

Fase inflamasi dimulai setelah trauma pada kulit dan berlanjut hingga lima hari. Fase ini penting untuk hemostasis dan mencegah kolonisasi atau infeksi bakteri.³⁶ Fase awal saat terjadinya luka yaitu fase homeostasis yang melibatkan drainase sistem limfatik dan darah untuk menghentikan kehilangan darah. Kaskade penyembuhan luka yang sangat terintegrasi kemudian dimulai dengan perekrutan sitokin proinflamasi yang memicu inflamasi dan memulai fase inflamasi.⁸²

Fase penting penyembuhan luka adalah perubahan dari fase inflamasi ke fase proliferasi. Fase peradangan sangat penting untuk memicu hemostasis dan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh bawaan, melindungi tubuh dari infeksi invasif dan membantu pengangkatan jaringan mati. Peradangan yang berkepanjangan terkait dengan jaringan parut yang parah dan mungkin menghambat tahap penyembuhan luka secara teratur.⁸³

Fase terpenting dari proses penyembuhan luka adalah perubahan dari fase inflamasi ke fase proliferaatif.⁸⁴ Penelitian melaporkan menggunakan hipoksia *Mesenchymal stem cell* yang diinjeksi pada sekitar area luka dapat mempercepat penyembuhan luka dengan mempersingkat masa peralihan dari fase inflamasi menuju ke fase proliferasi. *Mesenchymal stem cell* akan melakukan migrasi ke area luka.⁶⁹ Pada penelitian ini menunjukkan bahwa kadar TGF- β pada kelompok P1 dengan pemberian gel topikal SH-MSc 400 μ l mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok K-.

Sejalan dengan beberapa penelitian yang dilaporkan oleh (Chen et al, 2014), (Widowati, et al 2017), (Peruzzaro et al, 2019) dan (Putra et al., 2019). Dibandingkan dengan MSC kondisi normoksia, MSC hipoksia memiliki kemampuan lebih baik untuk bertahan hidup di daerah luka. Hal ini disebabkan oleh lingkungan mikro cedera dan lingkungan hipoksia, faktor yang diinduksi hipoksia 1 (HIF-1) dapat meningkat pada tingkat oksigen antara 2-9%, menurunkan tingkat spesies oksigen reaktif (ROS) di mitokondria dan mengaktifkan faktor nuklir kappa B (NFkB). Selain itu, HIF-1 mempromosikan produksi Normal Cellular Prion Protein (PrPC). NF-kB dan PrPC mendorong pengembangan enzim antioksidan, memperbaiki faktor pertumbuhan, dan protein anti-apoptosis.^{65,82}

Keberadaan lebih banyak IL10 dan TGF- β yang disekresikan oleh MSC sebagai hasil inkubasi dalam keadaan hipoksia dapat menjelaskan peningkatan kapasitas MSC untuk memulai polarisasi. Diketahui bahwa MSC melepaskan lebih banyak sitokin dalam keadaan hipoksia, seperti IL10 dan TGF- β .⁸⁵

Penelitian ini sejalan dengan penelitian lainnya yang menggunakan gel sekretom hipoksia MSC dosis 400 μ l dimana terdapat penurunan inflamasi pada adhesi peritoneal.⁸⁶

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa kadar IL-6 pada kelompok P1 dengan pemberian gel topikal SH-MSC 400 μ l mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok K-, sejalan dengan penelitian lainnya menunjukkan bahwa terjadi penurunan inflamasi melalui aktivasi jalur IL-10 STAT3 *pathways*. IL-10 akan berikatan dengan IL-10R menghasilkan aktivasi dari JAK 1 yang menginduksi fosforilasi STAT3. Protein STAT3 akan masuk ke nucleus dan mengaktifasi sekuens mRNA SOCS3 yang kemudian akan diekspresikan secara intraseluler dan dapat menekan jalur pensinyalan proinflamasi, yaitu NF- κ B. Penekanan pada jalur NF- κ B akan menyebabkan penurunan sekresi sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-6.⁸¹

Penelitian lainnya dengan menggunakan UC- MSCs menunjukkan bahwa, kadar serum IL-6 dan TNF- α dapat digunakan sebagai prediktor untuk mengevaluasi perkembangan dan progresi diabetes. Kadar serum IL-6 dan TNF- α berkurang secara signifikan setelah pengobatan UC-MSCs di tikus DM dan menyarankan pengobatan dapat memperbaiki resistensi insulin.⁸⁷

5.3 Keterbatasan

5.3.1 Belum dilakukan penelitian tentang gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 pada fase proliferasi dan remodelling tikus model luka eksisi.

5.3.2 Belum dilakukan penelitian lebih lanjut tentang gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen HGF, VEGF pada tikus model luka eksisi.



BAB VI

KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap ekspresi gen TGF- β dan IL6 pada tikus model luka eksisi.
2. Pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400 μ L/kgBB terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen TGF- β pada tikus model luka eksisi.
3. Pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400 μ L/kgBB terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen IL-6 pada tikus model luka eksisi.

Keterbatasan:

1. Belum dilakukan penelitian tentang gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 pada fase proliferasi dan remodelling tikus model luka eksisi.
2. Belum dilakukan penelitian lebih lanjut tentang gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen HGF, VEGF pada tikus model luka eksisi.

6.2 Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 pada fase proliferasi dan remodelling tikus model luka eksisi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang gel topikal *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen HGF, VEGF pada tikus model luka eksisi.



DAFTAR PUSTAKA

1. Prastika DD, Setiawan B, Saputro AL, Yudaniayanti IS, Wibawati PA, Fikri F. Pengaruh Kitosan Udang Secara Topikal Terhadap Kepadatan Kolagen dalam Penyembuhan Luka Eksisi pada Tikus Putih. *Jurnal Medik Veteriner*. 2020;3(1):101. doi:10.20473/jmv.vol3.iss1.2020.101-107
2. Aydemir I, Öztürk Ş, Kılıçaslan Sönmez P, Tuğlu Mİ. Mesenchymal stem cells in skin wound healing. *Anatomy*. 2016;10(3):228-234. doi:10.2399/ana.16.043
3. Wiredu Ocansey DK, Pei B, Yan Y, et al. Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: An update. *J Transl Med*. 2020;18(1). doi:10.1186/s12967-020-02234-x
4. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(7):812-820. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x
5. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783. doi:10.3889/oamjms.2018.404
6. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710
7. Daneshmandi L, Shah S, Jafari T, et al. Emergence of the Stem Cell Secretome in Regenerative Engineering. *Trends Biotechnol*. 2020;38(12):1373-1384. doi:10.1016/j.tibtech.2020.04.013
8. Kuntardjo N, Dharmana E, Chodidjah C, Nasihun TR, Putra A. TNF- α -Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level, Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination. *Majalah Kedokteran Bandung*. 2019;51(1):1-6. doi:10.15395/mkb.v51n1.1479
9. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: Normal and chronic wounds: Biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(7):304-314. doi:10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0
10. Pakaya D. Peranan Vitamin C pada kulit. *Medika Tadulako: Jurnal Ilmiah Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan*. Published online 2014.

11. Desai S, Jagtap J, Sainani S, Bhonde R. Guiding stem cells for cutaneous repair. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2023;4. doi:10.1016/j.crphar.2022.100145
12. Murphy PS, Evans GRD. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plast Surg Int*. 2012;2012:1-8. doi:10.1155/2012/190436
13. Rangatchew F, Vester-Glowinski P, Rasmussen BS, et al. Mesenchymal stem cell therapy of acute thermal burns: A systematic review of the effect on inflammation and wound healing. *Burns*. 2021;47(2):270-294. doi:10.1016/j.burns.2020.04.012
14. Chen D, Hao H, Fu X, Han W. Insight into reepithelialization: How do mesenchymal stem cells perform? *Stem Cells Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/6120173
15. Jeschke MG, Rehou S, McCann MR, Shahrokhi S. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of severe burn injury. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1465-9
16. Lotfinia M, Lak S, Ghahhari NM, et al. FULL LENGTH Iranian Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomed J*. 2017;21(1):24-31. doi:10.6091/21.1.24
17. Trisnadi S, Muhar AM, Putra A, Kustiyah AR. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β inhibition. *Universa Medicina*. 2020;39(2):97-104. doi:10.18051/univmed.2020.v39.97-104
18. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(7):812-820. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x
19. Gilbert RWD, Vickaryous MK, Vilorio-Petit AM. Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration. *J Dev Biol*. 2016;4(2). doi:10.3390/jdb4020021
20. Su VYF, Lin CS, Hung SC, Yang KY. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ B pathway in endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092208
21. Su CM, Wang L, Yoo D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-92941-2
22. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes

- through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(4):994-1001. doi:10.1038/jid.2008.332
23. Ayu K, Erika A, Mas A, Batari UA, Watampone T. *Pengaruh Pemberian Krim Topikal Ekstrak Buah Naga Merah (Hylocereus Polyrhizus) Pada Luka Akut Terhadap Kadar Interleukin-6 Fase Inflamasi Pada Wistar.*; 2018. <https://www.researchgate.net/publication/323545270>
 24. Xiao S, Huang G, Wei Z, et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/9158016
 25. Jeschke MG, Rehou S, McCann MR, Shahrokhi S. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of severe burn injury. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1465-9
 26. Gao W, He R, Ren J, et al. Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells increases angiogenesis via the JNK/HIF-1 α pathway. *FEBS Open Bio*. 2021;11(5):1364-1373. doi:10.1002/2211-5463.13142
 27. Wiet Ramadhanti O, Putra A, Anna Chalimah Sadyah N, Hidayah N, Prasetyo A. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cell Hipoksia dan Normoksia Terhadap Ekspresi IL-10 pada Tikus Model Luka Eksisi. *J Midwifery Health Sci Sultan Agung*. 2021;(1):23-31.
 28. Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Anna Chalimah Sa N, Tjipta A. *The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing*. Vol 11.; 2020.
 29. Nourian Dehkordi A, Mirahmadi Babaheydari F, Chehelgerdi M, Raeisi Dehkordi S. Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1212-2
 30. Priyandari Y, Arfina Titi Maulidah Umatjina S. *Getah Pohon Jarak (Jatropha Curcas) Topikal Mempercepat Lama Penyembuhan Luka Eksisi Mencit (Effect of Jarak Tree Topical Increase Wound Healing Excision Period of Mice)*.
 31. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(3):514-525. doi:10.1038/sj.jid.5700701
 32. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-620. doi:10.1590/abd1806-4841.20164741

33. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(18):3209-3213. doi:10.1242/jcs.031187
34. Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2009;6(3):351-356. doi:10.1093/ecam/nem127
35. Martin P. *Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration.* <http://science.sciencemag.org/>
36. Gurtner G, Wong VW. Wound healing: normal and abnormal. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 2007;6:15-22.
37. Tiwari VK. Burn wound: How it differs from other wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery.* 2012;45(2):364-373. doi:10.4103/0970-0358.101319
38. Lima A, Silva J, Oliveira LS, et al. *Ascorbic Acid for the Healing of Skin Wounds in Rats.* Vol 69.; 2009.
39. Anderson J. The cellular cascades of wound healing. *Bone Engineering.* Published online 2000:81-94.
40. Bennett MNT, Schultz PGS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *The American journal of surgery.* Published online 1993:74-81.
41. Murphy PS, Evans GRD. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plast Surg Int.* 2012;2012:1-8. doi:10.1155/2012/190436
42. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, et al. TGF- β signalling and liver disease. *FEBS Journal.* Published online June 1, 2016:2219-2232. doi:10.1111/febs.13665
43. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011;30(1):16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
44. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014;3(7):482-491. doi:10.1089/wound.2013.0466
45. Oshimori N, Fuchs E. The harmonies played by TGF- β in stem cell biology. *Cell Stem Cell.* 2012;11(6):751-764. doi:10.1016/j.stem.2012.11.001
46. Salm S, Burger PE, Wilson EL. TGF- β and stem cell factor regulate cell proliferation in the proximal stem cell niche. *Prostate.* 2012;72(9):998-1005. doi:10.1002/pros.21505
47. Aisyah R, Jatmiko SW. Jalur Sinyal TGF- β Berperan Dalam Self Renewal, Diferensiasi, Dan Proliferasi Stem Cell. *Saintika Medika.*

- 2019;15(1):50. doi:10.22219/sm.vol15.smumm1.8002
48. Jung CJ, Iyengar S, Blahnik KR, et al. Human ESC self-renewal promoting microRNAs induce epithelial - Mesenchymal transition in hepatocytes by controlling the PTEN and TGF β tumor suppressor signaling pathways. *Molecular Cancer Research*. 2012;10(7):979-991. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0421
 49. Nishimoto N, Yoshizaki K, Tagoh H, et al. *Elevation of Serum Interleukin 6 Prior to Acute Phase Proteins on the Inflammation by Surgical Operation*. Vol 50.; 1989.
 50. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295
 51. Heinrich PC, Castell J V, Andust T. *And the Acute Phase Response*. Vol 265.; 1990.
 52. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-388. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132603
 53. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
 54. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-388. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132603
 55. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. 2020;8(5). doi:10.3390/BIOMEDICINES8050101
 56. Pavlović M, Radotić K. Stemness and Stem Cell Markers. In: *Animal and Plant Stem Cells*. Springer International Publishing; 2017:27-32. doi:10.1007/978-3-319-47763-3_5
 57. Vasanthan J, Gurusamy N, Rajasingh S, et al. Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy. *Cells*. 2021;10(1):1-14. doi:10.3390/cells10010054
 58. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1165-5
 59. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011;9. doi:10.1186/1478-811X-9-12
 60. Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances

- survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells*. 2015;33(6):1818-1828. doi:10.1002/stem.1976
61. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*. 2014;12(1). doi:10.1186/s12967-014-0260-8
 62. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, et al. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049
 63. Meng X, Grötsch B, Luo Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-017-02683-x
 64. Noronha Nc NDC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1224-y
 65. Widowati W, Rihibiha DD, Khiong K, Widodo MA, Sumitro SB, Bachtiar I. Hypoxia in Mesenchymal Stem Cell. In: *Hypoxia and Human Diseases*. InTech; 2017. doi:10.5772/65510
 66. Riis S, Newman R, Ipek H, et al. Hypoxia enhances the wound-healing potential of adipose-derived stem cells in a novel human primarykeratinocyte-based scratch assay. *Int J Mol Med*. 2017;39(3):587-594. doi:10.3892/ijmm.2017.2886
 67. Xu W, Xu R, Li Z, Wang Y, Hu R. Hypoxia changes chemotaxis behaviour of mesenchymal stem cells via HIF-1 α signalling. *J Cell Mol Med*. 2019;23(3):1899-1907. doi:10.1111/jcmm.14091
 68. Isakson M, De Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJP. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/831095
 69. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina*. 2019;38(3):164-171. doi:10.18051/univmed.2019.v38.164-171
 70. Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, et al. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5). doi:10.3390/ijms20051195
 71. Hawkins KE, Sharp T V., McKay TR. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regenerative Med*. 2013;8(6):771-782.

doi:10.2217/rme.13.71

72. Gilbert RWD, Vickaryous MK, Vilorio-Petit AM. Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration. *J Dev Biol.* 2016;4(2). doi:10.3390/jdb4020021
73. Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pereira Lima GP. Antioxidant activity of Y-oryzanol: A complex network of interactions. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8). doi:10.3390/ijms17081107
74. Rolfe AJ, Bosco DB, Wang J, Nowakowski RS, Fan J, Ren Y. Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell Biosci.* 2016;6(1). doi:10.1186/s13578-016-0110-x
75. Oe Z, Iana D, Raelos D. Dermatologic Therapy Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatology Consulting Services.* 2007;20:308-313.
76. Kimura A, Naka T, Nakahama T, et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *Journal of Experimental Medicine.* 2009;206(9):2027-2035. doi:10.1084/jem.20090560
77. Chen D, Hao H, Fu X, Han W. Insight into reepithelialization: How do mesenchymal stem cells perform? *Stem Cells Int.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/6120173
78. de Carvalho M de FP, Pereira CSB, Fregnani JH, Ribeiro F de AQ. Comparative histological study on wound healing on rat's skin treated with Mitomycin C or Clobetasol propionate. *Acta Cir Bras.* 2015;30(9):593-597. doi:10.1590/S0102-865020150090000002
79. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Res.* 2021;10:228. doi:10.12688/f1000research.51191.1
80. Bar-Or D, Thomas GW, Rael LT, Gersch ED, Rubinstein P, Brody E. Low Molecular Weight Fraction of Commercial Human Serum Albumin Induces Morphologic and Transcriptional Changes of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(8):945-955. doi:10.5966/sctm.2014-0293
81. Widyaningsih W. *Pengaruh Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Kadar C-Peptide, IL-6, Dan Polarisasi Makrofag Tipe-2 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Obesitas Diabetes Melitus Tipe 2) (Doctoral Dissertation, Universitas Islam Sultan Agung (Indonesia)).*; 2022.
82. Putra A, Alif I, Hamra N, et al. *MSC-Released TGF- β Regulate α -SMA*

Expression of Myofibroblast during Wound Healing. Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine.; 2020.

83. Gushiken LFS, Beserra FP, Bastos JK, Jackson CJ, Pellizzon CH. Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. *Life*. 2021;11(7). doi:10.3390/life11070665
84. Xiao S, Huang G, Wei Z, et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/9158016
85. Singampalli KL, Balaji S, Wang X, et al. The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00636
86. Muhar AM, Putra A, Warli SM, Munir D. Hypoxia-mesenchymal stem cells inhibit intra-peritoneal adhesions formation by upregulation of the il-10 expression. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(23):3937-3943. doi:10.3889/oamjms.2019.713
87. Pan XH, Huang X, Ruan GP, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells are able to undergo differentiation into functional islet-like cells in type 2 diabetic tree shrews. *Mol Cell Probes*. 2017;34:1-12. doi:10.1016/j.mcp.2017.04.002

