

**PENGARUH *SECRETOME HIPOXIA MESENCHYIMAL STEM*
CELL (SH-MSC) TERHADAP EKSPRESI
GEN PDGF DAN IF-GAMA**

(Study Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus *Wistar* Model Luka Eksisi)

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Dessy Tri Natalia

MBK.22.19.010277

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

2023

TESIS

**PENGARUH GEL TOPIKAL *SECRETOME HYPOXIA*
MESENCHYIMAL STEM CELL (SH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI
GEN PDGF DAN IF-GAMA**

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

disusun oleh

Dessy Tri Natalia

MBK.22.19.010277

Telah disetujui oleh:

Menyetujui.

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K)
NIDN: 8951110021

Dr. dr. Adi Muradi Muhar, Sp. BKBD
NIDN: 0007126711

Mengetahui,

Ketua program studi megister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

Assoc. Prof. Dr. dr. 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, 8 Agustus 2023



Dessy Tri Natalia

RIWAYAT HIDUP

Identitas

Nama : Dessy Tri Natalia
Tempat/Tanggal Lahir : Palembang 26 Desember 1989
Agama : Islam
Jenis kelamin : Perempuan

Riwayat Pendidikan

SDN 77 Palembang : Lulus tahun 1998
SMP N 33 Palembang : Lulus tahun 2000
SMP MUH 3 Yogyakarta : Lulus tahun 2003
SMA MUH 5 Yogyakarta : Lulus tahun 2006
S1 Dokter Umum FK Univ Malahayati : Lulus tahun 2014
S2 Biomedik FK Unissula : 2022-sekarang

Riwayat Pekerjaan

Tahun 2014-2016 : Klinik Attiya Beauty Di Jakarta Selatan
Tahun 2016 -2017 : Klinik Kecantikan Dazzling Aesthetic Clinic
Tahun 2017-2023 : Klinik Dr. D'beaute Clinic Jakarta Selatan

Riwayat Keluarga

Ayah : H Abdul Maaz Kailani
Ibu : Hj Pertiwi
Suami : Kemal Hidayat S.E
Anak : 1. Carissa Izzaty Diandra
2. Ceisya Nameera Diandra

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat, nikmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat mengajukan Tesis yang berjudul “Pengaruh pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem cell* Terhadap Ekspresi Gen PDGF Dan IF-Gama (Study Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus *Wistar* Model Luka Eksisi”). Proposal 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, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang,
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp. F selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan selaku penguji yang telah memberikan semangat dalam penyusunan tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp. KK (K) selaku Pembimbing I yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta dorongan semangat selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Adi Muradi Muhar, Sp. BKBD selaku Pembimbing II yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, serta saran selama penyusunan tesis ini.

6. Dr. dr. Pasid Harlisa, Sp. KK selaku penguji yang memberikan wawasan, masukan serta saran dalam perbaikan tesis.
7. Dr. dr. Hj Chodidjah, M.Kes selaku penguji yang juga memberikan wawasan, masukan serta saran dalam perbaikan tesis.
8. Para Dosen Pengajar dan Rekan-Rekan Staf Prodi Magister Biomedik yang telah memberikan masukan ide, semangat, dan membantu segala hal terkait dalam penyelesaian tesis ini.
9. Kedua Orang Tua, suami dan anak-anak tercinta yang telah memberikan doa, semangat, dukungan sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.

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

Semarang, Agustus 2023



Dessy Tri Natalia
MBK.22.19.010277

ABSTRAK

Latar Belakang: Luka adalah rusaknya struktur dan fungsi anatomis normal akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksternal dan mengenai organ tertentu. Terapi menggunakan *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dinilai efektif dalam meningkatkan penyembuhan luka kulit karena memiliki potensi diferensiasi dan imunoregulasi serta tidak adanya potensi penolakan pasca pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh *secretome hipoksia mesenchymal stem cell* (SH-MSC) terhadap ekspresi gen PDGF dan IFN- γ tikus Wistar dengan model luka eksisi.

Metode: Penelitian eksperimental in vivo dengan desain penelitian *Post test Only Control Group Design*. Jumlah sampel 18 ekor tikus Wistar jantan dengan model luka eksisi, dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok Negatif (-) gel placebo, kelompok (+) Clobetasol dosis 0,25g/kg, dan kelompok P1 gel SH-MSC dosis 400 μ l/kgBB, diberikan perlakuan selama 5 hari. Hari ke 6 jaringan kulit diperiksa dengan metode RT-PCR untuk melihat ekspresi gen PDGF dan IFN- γ diuji menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD*.

Hasil: Rata-rata ekspresi gen PDGF di kelompok P1 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen PDGF kelompok K+. Selanjutnya rerata ekspresi gen PDGF kelompok K- dengan nilai terendah. Rata-rata ekspresi gen IFN- γ di kelompok K- yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen IFN- γ kelompok K+. Selanjutnya rerata ekspresi gen IFN- γ kelompok P1 dengan nilai terendah.

Kesimpulan: Pemberian gel topikal SH-MSCs 400 μ l/kgBB dapat meningkatkan ekspresi PDGF dan menurunkan kadar IFN- γ pada tikus jantan galur wistar model luka eksisi.

Kata Kunci: SH-MSCs, Hipoksia, Ekspresi gen PDGF, Ekspresi gen IFN- γ , Luka eksisi

ABSTRACT

Background: Wounds are damage to normal anatomical structure and function due to pathological processes originating internally or externally and affecting certain organs. Therapy using Mesenchymal Stem Cells (MSC) is considered effective in improving skin wound healing because it has differentiation and immunoregulatory potential and there is no potential for post-treatment rejection. This study aims to prove the effect of hypoxic mesenchymal stem cell (SH-MSC) secretome on PDGF and IFN- γ gene expression in Wistar rats using an excision wound model.

Method: In vivo experimental research with a Post test Only Control Group Design research design. The total sample was 18 male Wistar rats with excision wound models, divided into three groups. The Negative (-) placebo gel group, the (+) Clobetasol group at a dose of 0.25g/kg, and the P1 group at the SH-MSC gel at a dose of 400 μ l/kgBW, were treated for 5 days. On day 6, skin tissue was examined using the RT-PCR method to see the expression of the PDGF and IFN- γ genes, tested using the One Way Anova test followed by the Post Hoc LSD test.

Results: The average PDGF gene expression in the P1 group was the highest, followed by the average PDGF gene expression in the K+ group. Furthermore, the average PDGF gene expression in the K- group had the lowest value. The average IFN- γ gene expression in the K- group was the highest, followed by the average IFN- γ gene expression in the K+ group. Furthermore, the average expression of the IFN- γ gene in the P1 group had the lowest value.

Conclusion: Topical administration of 400 μ l/kgBB SH-MSCs gel can increase PDGF expression and reduce IFN- γ levels in male Wistar mice in the excision wound model.

Keywords: SH-MSCs, Hypoxia, PDGF gene expression, IFN- γ gene expression, Excision wounds

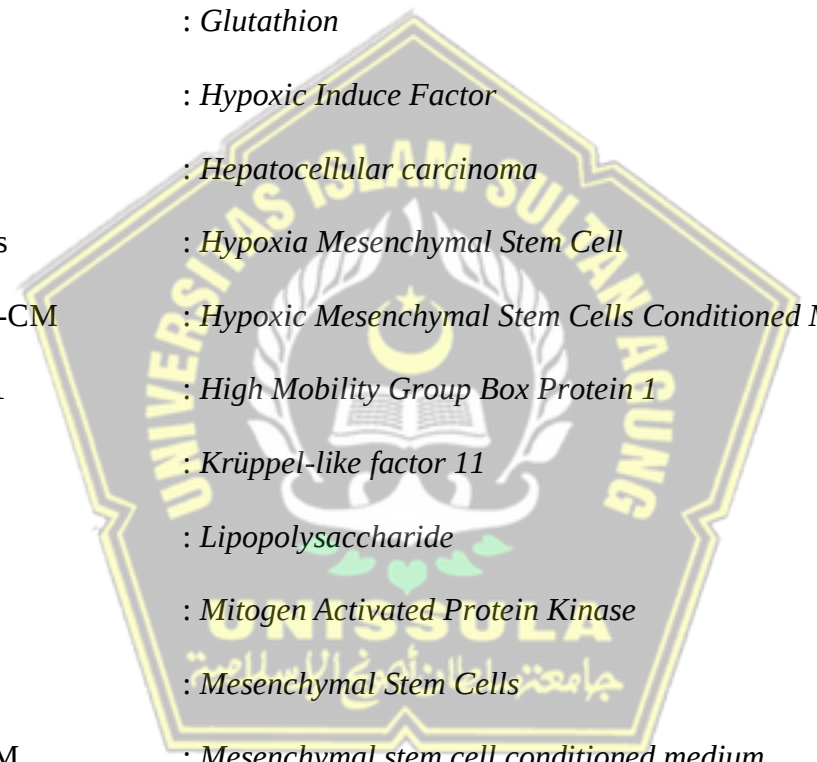
DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS	ii
PERNYATAAN.....	iii
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 Perumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Originalitas Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	8
1.5.1 Manfaat Teoritis	8
1.5.2 Manfaat Praktis.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tinjauan Umum Tentang Luka	9
2.2.1 Definisi	9
2.2.2 Klasifikasi Luka.....	9
2.2.3 Mekanisme molekuler pada Luka	11
2.2.4 Urutan proses penyembuhan luka	13
2.2 Tinjauan Umum Tentang Hipoksia	15
2.3 Tinjauan Umum Tentang Mesenchymal Stem Cell (MSC).....	16

2.4 Ekspresi gen <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (PDGF)	17
2.4.1 Definisi PDGF	17
2.4.2 Fungsi Ekspresi PDGF	18
2.5 Ekspresi gen Interferon gamma (IFN- γ).....	20
2.5.1 Definisi IFN- γ	20
2.5.2 Transduksi Pensinyalan IFN- γ	21
2.5.3 Peran IFN- γ pada luka	23
2.6 Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>).....	24
2.7 Pengaruh SH-MSCs terhadap ekspresi gen PDGF dan IFN- γ tikus wistar dengan model luka eksisi.....	25
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	27
3.1 Kerangka Teori.....	27
3.2 Kerangka Konsep	31
3.3 Hipotesis	31
BAB IV METODE PENELITIAN	32
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	32
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	32
4.2.1 Populasi	32
4.2.2 Sampel.....	33
4.3 Variabel Dan Definisi Operasional	34
4.3.1 Variabel Penelitian	34
4.3.2 Definisi Operasional.....	34
4.4 Alat Dan Bahan Penelitian	35
4.4.1 Alat	35
4.4.2 Bahan.....	35
4.5 Cara Penelitian.....	36
4.5.1 Ethical Clearance.....	36
4.5.2 Teknik Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord.....	36
4.5.3 Proses Hipoksia	37
4.5.4 Pembuatan Sediaan Gel.....	37

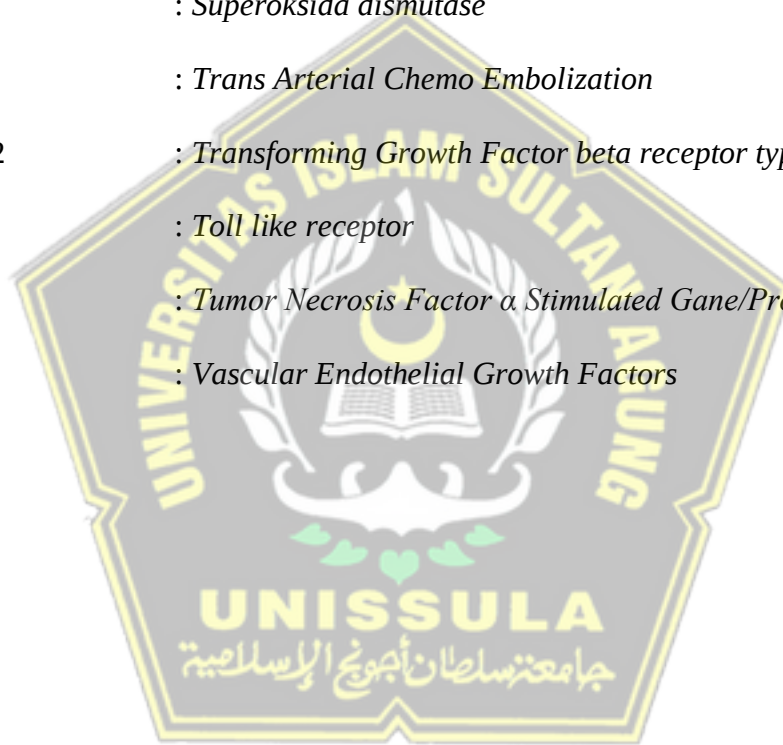
4.5.5 Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan..	38
4.5.6 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA.....	40
4.6 Analisis Data	42
4.7 Jadwal Pelaksanaanya Penelitian	42
4.8 Alur Penelitian.....	43
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	44
5.1 Hasil Penelitian.....	44
5.1.1 Pengaruh pemberian SH-MSC dosis 400 μ L terhadap ekspresi gen PDGF dan IFN- γ	48
5.1.2 Analisis perbedaan rata-rata ekspresi PDGF dan IFN- γ	51
5.2 Pembahasan	53
BAB VI KESIMPULAN.....	56
6.1 Kesimpulan.....	56
6.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN.....	62
Lampiran 1. Ethical Clearance	62
Lampiran 2. Surat keterangan selesai penelitian	63
Lampiran 3. Data hasil penelitian.....	64
Lampiran 4. Dokumentasi kegiatan penelitian.....	67
Lampiran 5. Gambaran makroskopis luka eksisi	69

DAFTAR SINGKATAN



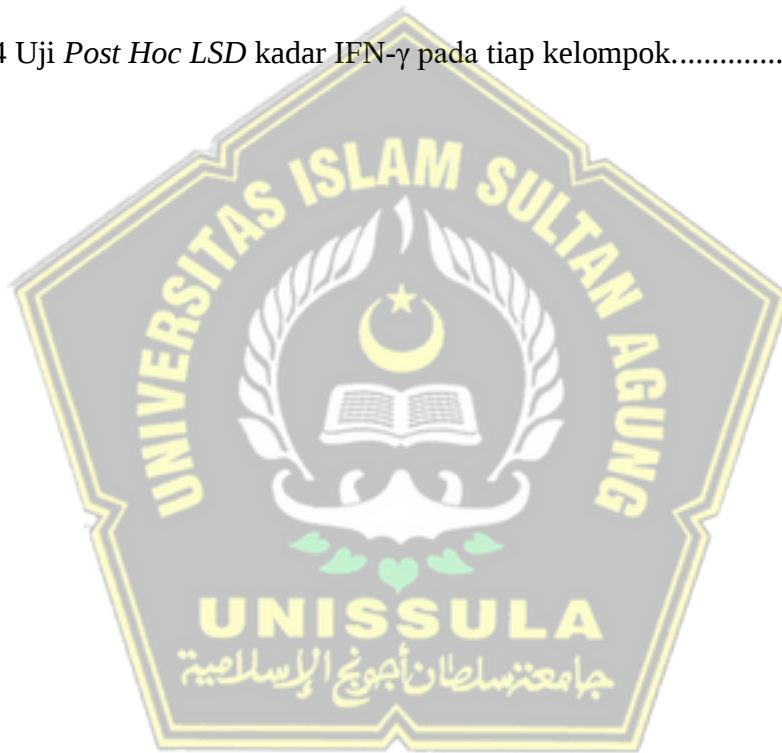
ADAM17	: A Disintegrin and Metalloprotease 17
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular pattern</i>
EGFR	: <i>Estimation Glomerular Filtration Rate</i>
GAG	: <i>Glikosaminoglikan</i>
GSH	: <i>Glutathion</i>
HIF	: <i>Hypoxic Induce Factor</i>
HCC	: <i>Hepatocellular carcinoma</i>
H-MSCs	: <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
HMSCs-CM	: <i>Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium</i>
HMGB1	: <i>High Mobility Group Box Protein 1</i>
KLF11	: <i>Krüppel-like factor 11</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i> جامعة
MSC CM	: <i>Mesenchymal stem cell conditioned medium</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
N-MSCs	: <i>Normoksia Mesenchymal Stem Cell</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>

PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
PKA	: <i>Protein kinase A</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
RAGE	: <i>Receptor for advanced glycation end products</i>
SH MSC	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
SOD	: <i>Superoksida dismutase</i>
TACE	: <i>Trans Arterial Chemo Embolization</i>
TGFBR2	: <i>Transforming Growth Factor beta receptor type 2</i>
TLRs	: <i>Toll like receptor</i>
TSG	: <i>Tumor Necrosis Factor α Stimulated Gane/Protein 6</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>



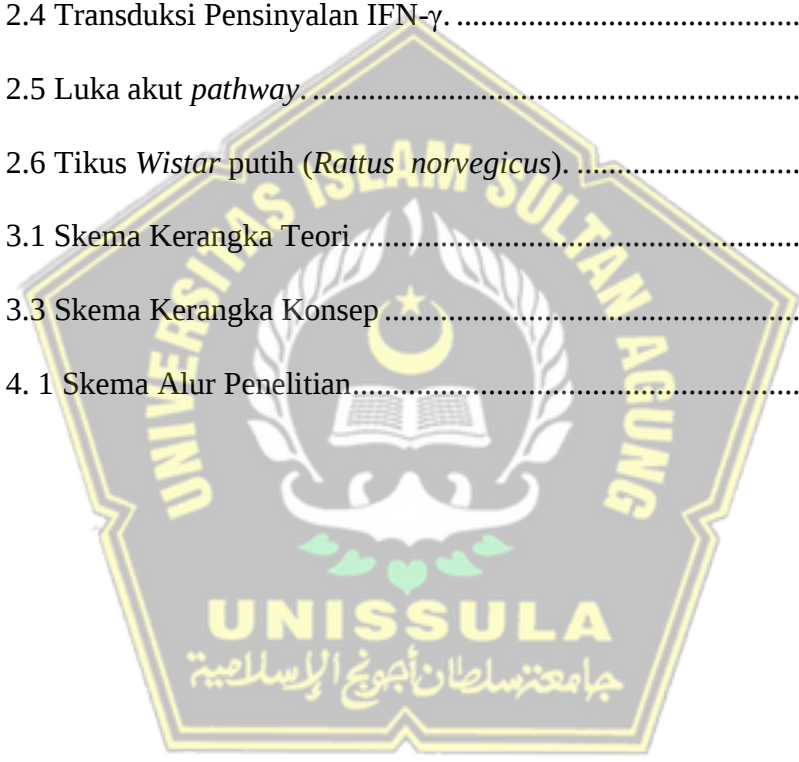
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 5.1 Data Hasil Penelitian ekspresi gen PDGF.....	48
Tabel 5.2 Data Hasil Penelitian ekspresi gen IFN- γ	49
Tabel 5.3 Uji <i>Post Hoc</i> LSD kadar PDGF pada Masing-masing Kelompok	51
Tabel 5.4 Uji <i>Post Hoc</i> LSD kadar IFN- γ pada tiap kelompok.....	52



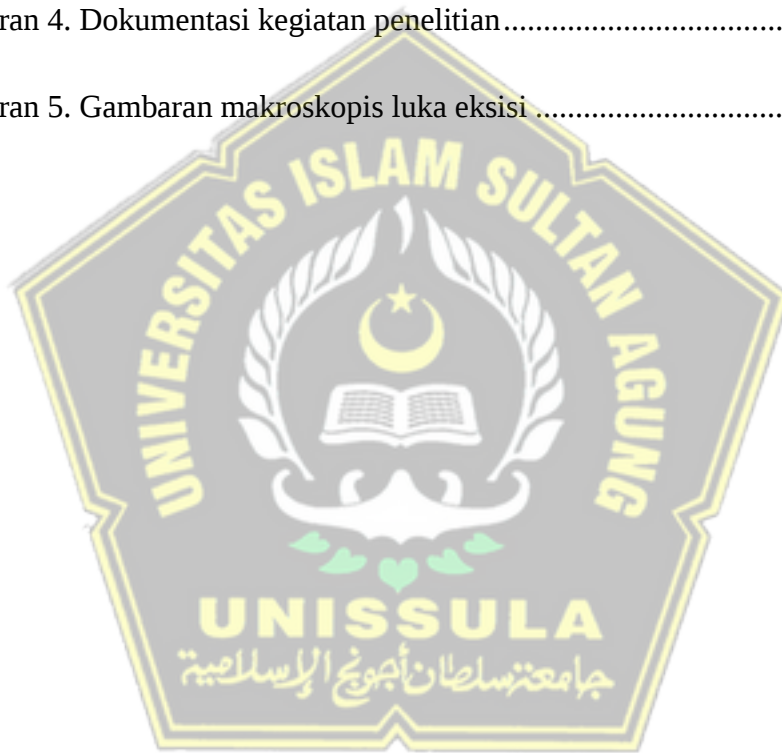
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Plastisitas makrofag dalam penyembuhan luka.	12
Gambar 2.2 Urutan Proses penyembuhan luka.	13
Gambar 2.3 Koordinasi spatiotemporal penyembuhan luka.	19
Gambar 2.4 Transduksi Pensinyalan IFN- γ	22
Gambar 2.5 Luka akut <i>pathway</i>	23
Gambar 2.6 Tikus Wistar putih (<i>Rattus norvegicus</i>).	24
Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori.	30
Gambar 3.3 Skema Kerangka Konsep.	31
Gambar 4. 1 Skema Alur Penelitian.	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Ethical Clearance	62
Lampiran 2. Surat keterangan selesai penelitian	63
Lampiran 3. Data hasil penelitian.....	64
Lampiran 4. Dokumentasi kegiatan penelitian.....	67
Lampiran 5. Gambaran makroskopis luka eksisi	69



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka adalah rusaknya struktur dan fungsi anatomis normal akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksternal dan mengenai organ tertentu.¹ Diperkirakan 1,5-2 juta orang di Eropa menderita luka akut atau kronis. Luka-luka ini mendapatkan perawatan di rumah sakit maupun klinik. Pasien yang menderita luka melaporkan konsekuensi fisik, mental dan sosial, sehingga tuntutan waktu perawatan yang meningkat dengan biaya yang tidak sedikit, populasi yang menua dan meningkatnya tingkat morbiditas yang terkait dengan luka.² Proses penyembuhan luka terdiri dari empat fase yang sangat terintegrasi dan tumpang tindih yaitu fase *hemostasis*, *inflamasi*, *proliferasi*, dan *remodeling* atau resolusi jaringan.³ Fase dan fungsi biofisiologisnya harus terjadi dalam urutan yang tepat, pada waktu tertentu, dan berlanjut selama durasi tertentu pada intensitas optimal. Perbaikan luka kulit adalah rangkaian respons seluler yang sangat terkoordinasi terhadap cedera yang berfungsi memulihkan integritas epidermis.⁴ Terapi menggunakan *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dinilai efektif dalam meningkatkan penyembuhan luka kulit karena memiliki potensi diferensiasi dan imunoregulasi serta tidak adanya potensi penolakan pasca penyuntikan.⁵

Sel punca merupakan sel prekursor yang mampu berdiferensiasi menjadi sel-sel lain serta kemampuannya dalam membentuk koloni, kemampuan ini yang

menyebabkan sel punca mampu memperbaiki fungsi jaringan yang mengalami kerusakan sel.⁶ Sel punca mensekresikan sejumlah protein (*secretome*), Sekretom sel punca adalah molekul kaya dan kompleks yang disekresi oleh sel hidup atau diambil dari permukaan sel. Sekretom sel punca memiliki fungsi untuk mencegah kerusakan jaringan akut.⁷ Sekretom penting dalam berbagai fungsi biologis seperti pertumbuhan sel, replikasi, diferensiasi, transduksi sinyal, apoptosis, adhesi, dan angiogenesis. Sekretom mengandung banyak protein, *growth factor*, faktor angiogenesis, hormone, sitokin, protein matriks ekstraselular, protease matriks ekstraselular, hormone, mediator lemak, dan materi genetik.⁸

Teknik kultur kondisi lingkungan hipoksia mampu meningkatkan kualitas MSC dari segi proliferasi, kemampuan bertahan hidup, serta lebih banyak mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan seperti *Platelet-derived growth factor* (PDGF).⁹ PDGF diregulasi oleh rangsangan eksternal, seperti hipoksia, trombin hiperglikemia dan sitokin lainnya.¹⁰ PDGF mempercepat infiltrasi sel inflamasi dan fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler dan pembentukan kolagen menghasilkan proses penyembuhan yang cepat.¹¹ PDGF mempunyai beberapa isoform, yaitu PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, dan PDGF-D. Akan tetapi, PDGF-B merupakan isoform utama yang ditemukan di dalam platelet.¹² Reepitelisasi dan pembentukan *growth factor* seperti PDGF berperan penting dalam penyembuhan luka.¹³ PDGF meningkatkan sintesis kolagen dengan merangsang *transforming growth factor- β* (TGF- β).^{14,15} TGF- β sebagai sitokin anti inflamasi yang kuat dalam mengatur respon inflamasi yang tidak terkendali.¹⁶

Saat terjadinya Luka, kadar oksigen yang rendah mengaktivasi *adenosine monophosphate* (AMP) yang diketahui mengaktifkan *hypoxia inducible factor 1 alpha* (HIF1a) kemudian melalui IL-17 dan IL-22 yang diproduksi oleh sel T residen di lokasi cedera.¹⁷ IL-1 mengaktivasi *toll like reseptors* (TLR), dan interferon (IFN), serta TNF- α yang mendorong diferensiasi makrofag M1. Peralihan dari makrofag M1 ke makrofag M2 serta fungsi AMP yang berbeda merupakan pengatur penting fase reparatif. Reepitelisasi luka membutuhkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur, yang dipandu sebagian melalui produksi faktor pertumbuhan dan AMP.¹⁷

Efek imunomodulator IFN- γ diproduksi oleh sel imun mempengaruhi perilaku sel imun yang berbeda, IFN- γ memainkan peran utama dalam mengaktifkan kekebalan antikanker, dengan mempromosikan aktivitas sel T helper tipe 1 CD4, limfosit T sitotoksik CD8 (CTL), natural killer sel (NK), sel dendritik (DC), dan makrofag, mempromosikan presentasi antigen. Selain itu, IFN- γ mengaktifkan makrofag menuju fenotipe yang lebih pro-inflamasi dan tumoricidal (mirip M1). Atau, IFN- γ menghambat sel T (Treg) pengatur, diferensiasi dan fungsi Th2 dan Th17.¹⁸

Sel punca mensekresikan sejumlah protein (*secretome*) termasuk *growth factor*, kemokin, sitokin, metabolit dan lipid bioaktif yang mengatur secara autokrin atau parakrin sambil merekayasa interaksi dengan lingkungan mikro sekitarnya.¹⁹ Beberapa stimulan dapat ditambahkan pada medium kultur, yaitu prekondisi hipoksia, inflamasi, dan penumbuhan sel kultur dalam bidang 3 dimensi akan merangsang sekresi dari berbagai faktor terapeutik potensial.²⁰ Sel punca mesenkimal dewasa merupakan sel multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel mesenkimal khusus

tahap akhir seperti osteoblas, kondrosit, adiposit, tenosit, dan lain-lain.²¹ *Mesenchymal stem/stromal cells* (MSCs) mengontrol respons peradangan yang berlebihan dengan modulasi berbagai sel kekebalan termasuk monosit /makrofag.²²

Penelitian Kuntardjo *et al.* (2018) melaporkan efektivitas gel topikal *Mesenchymal stem cells condition conditioned* (MSC-CM) teraktivasi TNF- α dibandingkan dengan kombinasi injeksi topikal-subkutan terhadap percepatan penyembuhan luka dengan dosis gel 100 μ L dan 200 μ L, terdapat peningkatan yang signifikan pada PDGF dan kepadatan fibroblas pada hari ke 6 pada kelompok topikal bila dibandingkan dengan kelompok kombinasi, pemberian MSC-CM secara topikal lebih efektif dibandingkan dengan kombinasi topikal-injeksi subkutan.²³ Penelitian Oh *et al.* (2014) menunjukkan bahwa sel punca mesenkimal manusia mengurangi aktivasi inflammasome NLRP3 pada makrofag manusia atau makrofag tikus yang distimulasi dengan LPS dan ATP.²²

Terapi *Hypoxic Mesenchymal Stem Cell* (H-MSC) dapat mempercepat proses penyembuhan luka melalui mekanisme parakrin dengan meningkatkan ekspresi mengubah faktor pertumbuhan- β (TGF- β).²⁴ Hipoksia merupakan salah satu faktor yang dapat memicu pelepasan inflamasi dan vaskulogenik sitokin selama regenerasi jaringan²⁵. Penelitian yang dilakukan oleh Jun *et al* pada tahun 2014, menunjukkan bahwa MSC yang berasal dari cairan ketuban manusia pada kondisi hipoksia dapat mempercepat penyembuhan luka dengan meningkatkan faktor parakrin melalui aktivasi *Mothers against decapentaplegic homolog 2* (SMAD2) dan jalur *fosfatidil-inositol-3-kinase/protein kinase B* (PI3K)/AKT10.²⁶ Namun, penelitian *secretome*

hipoxia mesenchymal stem cell terhadap ekspresi PDGF dan IF-Gamma belum dilakukan. Berdasarkan hal tersebut, peneliti melakukan penelitian pengaruh *secretome hipoxia mesenchymal stem cell* terhadap ekspresi PDGF dan IF-Gamma tikus Wistar dengan model luka eksisi.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka disimpulkan rumusan masalah pada penelitian ini “pengaruh pemberian *secretome hipoxia mesenchymal stemcell* terhadap ekspresi gen PDGF dan IF-Gamma tikus wistar dengan model luka eksisi”?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh *secretome hipoksia mesenchymal stem cell* (SH-MSc) terhadap ekspresi gen PDGF dan IF-Gamma tikus Wistar dengan model luka eksisi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian gel *secretom hypoxia mesencymal stem cell* (SH-MSCs) pada dosis 400 μ l/kgBB dalam peningkatan ekspresi gen PDGF antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.
2. Membuktikan pengaruh pemberian gel *secretom hypoxia mesencymal stem cell* (SH-MSCs) pada dosis 400 μ l/kgBB dalam penurunan ekspresi gen IF-Gamma antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Shiddiqi, T.,	<i>Pengaruh</i>	Eksperimental	<i>Secretome</i> sel punca
Arifin Adnan, Z.,	<i>Secretome sel punca mesenkimal</i>	<i>In Vivo</i>	mesenkimal menurunkan ekspresi IL-1 β dan Caspase-1
Nurudhin. ²⁷	<i>terhadap ekspresi IL-1β dan capcase-1</i>		pada mencit model lupus dengan induksi pristan ²⁷
Wiet	<i>Pengaruh</i>	Eksperimental	Penelitian ini menunjukkan
Ramadhanti, O., Putra, A., Anna	<i>Pemberian Mesenchymal Stem Cell</i>	<i>In Vivo</i>	bahwa terjadi peningkatan IL-10 yang signifikan pada hari ke-3 dan 6 setelah
Chalimah	<i>Hipoksia dan</i>		perlakuan H-MSCs dan
Sadyah, N.,	<i>Normoksia</i>		menurun pada hari ke-9
Hidayah, N.	<i>Terhadap Ekspresi</i>		dibandingkan dengan
& Prasetyo, A. ²⁸	<i>IL-10 pada Tikus Model Luka Eksisi</i>		perlakuan N-MSCs.
Jeschke, M.	<i>Allogeneic</i>	Eksperimental	Responden saat diobati
G., Rehou, S.,	<i>mesenchymal stem</i>	<i>In Vivo</i>	dengan MSC alogenik,

McCann, M.	<i>cells for treatment</i>		penyembuhan luka menjadi
R. &	<i>of severe burn</i>		lebih cepat.
Shahrokhi,	<i>injury.</i>		
S. ²⁹			
Jun, E. K. et	<i>Hypoxic</i>	<i>Eksperimental</i>	<i>AF-MSC-hypoCM</i>
al. ³⁰	<i>conditioned</i>	<i>In Vivo</i>	<i>meningkatkan penyembuhan</i>
	<i>medium from</i>		<i>luka melalui peningkatan</i>
	<i>human amniotic</i>		<i>yang diinduksi hipoksia</i>
	<i>fluid-derived</i>		<i>faktor parakrin melalui</i>
	<i>mesenchymal stem</i>		<i>aktivasi jalur TGF-β/SMAD2</i>
	<i>cells accelerates</i>		<i>dan PI3K/AKT.³⁰</i>
	<i>skin wound</i>		
	<i>healing through</i>		
	<i>TGF-β/SMAD2.</i>		
Kuntardjo, N.,	<i>TNF-α-Activated</i>	<i>Eksperimental</i>	Peningkatan kadar PDGF
Dharmana, E.,	<i>MSC-CM Topical</i>	<i>In Vivo</i>	dan jumlah fibroblas yang
Chodidjah, C.,	<i>Gel Effective in</i>		signifikan pada hari ke-6
Nasihun, T. R.	<i>Increasing PDGF</i>		pada MSC-CM gel topikal
& Putra, A. ²³	<i>Level, Fibroblast</i>		dibandingkan dengan
	<i>Density, and</i>		kombinasi topikal-injeksi
	<i>Wound Healing</i>		subkutan.

<i>Process</i>	pemberian MSC-CM secara
<i>Compared to</i>	topikal lebih efektif
<i>Subcutaneous</i>	dibandingkan dengan
<i>Injection</i>	kombinasi topikal-injeksi
<i>Combination.</i>	subkutan.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini secara teori adalah untuk memberikan pengetahuan tentang pengaruh secretome hipoksia mesenchymal stemcell terhadap ekspresi PDGF dan IF-Gamma tikus wistar dengan model luka eksisi.

1.5.2 Manfaat Praktis

Manfaat secara praktis dari penelitian ini antara lain adalah:

1. Memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh secretome hipoksia mesenchymal stemcell terhadap ekspresi PDGF dan IF-Gamma tikus wistar dengan model luka eksisi.
2. Hasil penelitian dapat menjadi landasan teori bagi penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tentang Luka

2.2.1 Definisi

Luka adalah terganggunya integritas jaringan biologis, meliputi kulit, selaput lendir, dan organ. Hilangnya fungsi dan kerusakan struktur dari berbagai jenis trauma dapat menyebabkan luka.³¹

2.2.2 Klasifikasi Luka

Luka dapat diklasifikasikan menurut anatomi, sifat, proses penyembuhan dan waktu penyembuhannya. Secara anatomi, luka dibedakan menjadi tiga bagian yaitu luka superfisial, luka dengan ketebalan lokal, luka dengan ketebalan penuh. Luka superfisial adalah luka yang menutupi bagian luar kulit, epidermis, dan terkadang dapat mencapai lapisan atas dermis. Luka dengan ketebalan lokal adalah luka yang melibatkan epidermis dan dermis. Sedangkan, luka dengan ketebalan penuh adalah luka yang menutupi seluruh lapisan kulit dari epidermis, dermis, lapisan lemak dan fascia hingga kulit.³²

Luka berdasarkan sifatnya dibagi menjadi luka abrasi, kontusio, insisi, laserasi, tembak, puncture, dan lain-lain. Luka abrasi/lecet adalah luka yang terjadi akibat gesekan luka dengan benda lain (biasanya disebabkan oleh benda tumpul) yang kedalamannya tidak mencapai jaringan subkutis. Luka kontusio atau memar adalah luka yang biasanya disebabkan oleh benturan benda tumpul yang

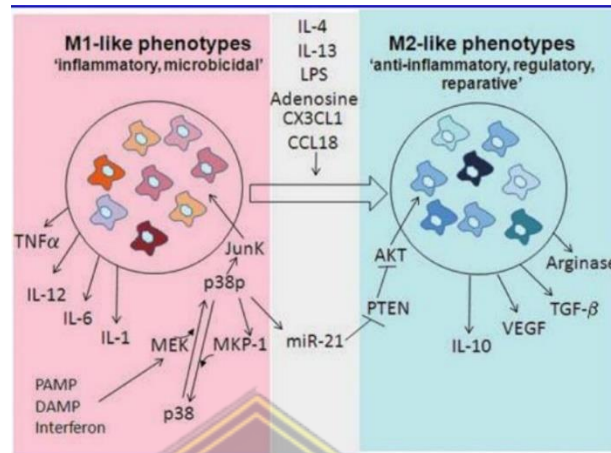
menyebabkan kerusakan kapiler. Luka insisi merupakan luka yang terjadi akibat potongan instrumen tajam. Luka laserasi merupakan luka yang memiliki tepi yang tidak rata. Luka tembak merupakan luka yang terjadi akibat benda seperti peluru, dan memiliki luka masuk dan luka keluar. Sedangkan luka *puncture* adalah luka yang terjadi akibat luka kecil dengan dasar yang sulit dilihat. Luka *puncture* disebabkan oleh tusukan paku atau benda yang runcing, ukuran luka kecil, dengan dasar yang sulit dilihat.

Ditinjau dari proses penyembuhannya, luka dikategorikan menjadi luka dengan penyembuhan primer, penyembuhan sekunder, dan penyembuhan tersier. Luka dengan penyembuhan primer (*healing by primary intention*) merupakan penyembuhan pada luka dengan kondisi yang bersih dan berlangsung dari internal ke eksternal. Luka penyembuhan primer biasanya terjadi pada penyembuhan luka insisi sehingga tepi luka dapat menyatu kembali, tampak bersih, serta tidak ada jaringan yang hilang. Luka dengan penyembuhan primer cenderung memerlukan waktu yang singkat untuk sembuh dan menutup lebih cepat dengan bantuan penjahitan. Pada penyembuhan luka sekunder (*healing by secondary intention*), sebagian jaringan luka hilang, luka kotor dan lama untuk sembuh, fase penyembuhan akan dibiarkan secara alamiah sehingga proses penyembuhan luka akan mulai setelah terbentuknya jaringan granulasi di dasar luka dan sekitarnya. Sedangkan pada penyembuhan luka tersier (*delayed primary healing*), penyembuhan luka berlangsung lambat karena tidak dapat dilakukan penjahitan luka secara langsung akibat terdapat infeksi atau kontaminasi, luka dibiarkan

terlebih dahulu selama 4-7 hari dan dilanjut penjahitan.²³ Dilihat dari lama penyembuhannya, Luka dapat dibagi menjadi 2 yaitu luka akut dan kronik. Pada proses penyembuhan luka akut akan mengikuti proses penyembuhan luka secara fisiologis, sehingga waktu penyembuhan dapat diprediksi. Luka akan menutup dengan *minimal scar* sekitar 2-3 minggu. Penyembuhan luka akut menggunakan tipe penyembuhan primer, tetapi juga dapat melalui proses penyembuhan sekunder pada luka yang tepiannya tidak dapat disatukan. Pada proses luka kronik tidak tampak tanda-tanda sembuh dalam jangka lebih dari 4-6 minggu. Yang termasuk dari luka kronik meliputi keganasan, ulkus tungkai, ulkus dekubitus, dan ulkus yang diakibatkan dari gangguan metabolisme seperti diabetes melitus.

2.2.3 Mekanisme molekuler pada Luka

Salah satu jalur pensinyalan intra seluler melibatkan p38 dan miR-21. miR-21 mempengaruhi beberapa aktor seluler dalam penyembuhan luka dengan berbagai cara. Promotornya mengandung 3 situs *activator protein 1* (AP1), sebuah PU situs, dan situs faktor nuklir kappa B (NF- κ B). Di dalam makrofag miR-21 memainkan peran kunci dalam transisi dari peradangan menjadi anti-inflamasi fenotip. Jalur stres p38/Jun diaktifkan oleh PAMPs dan DAMPs, yang menyebabkan sekresi sitokin inflamasi seperti IL-1, TNF, dan IL-6.¹⁷



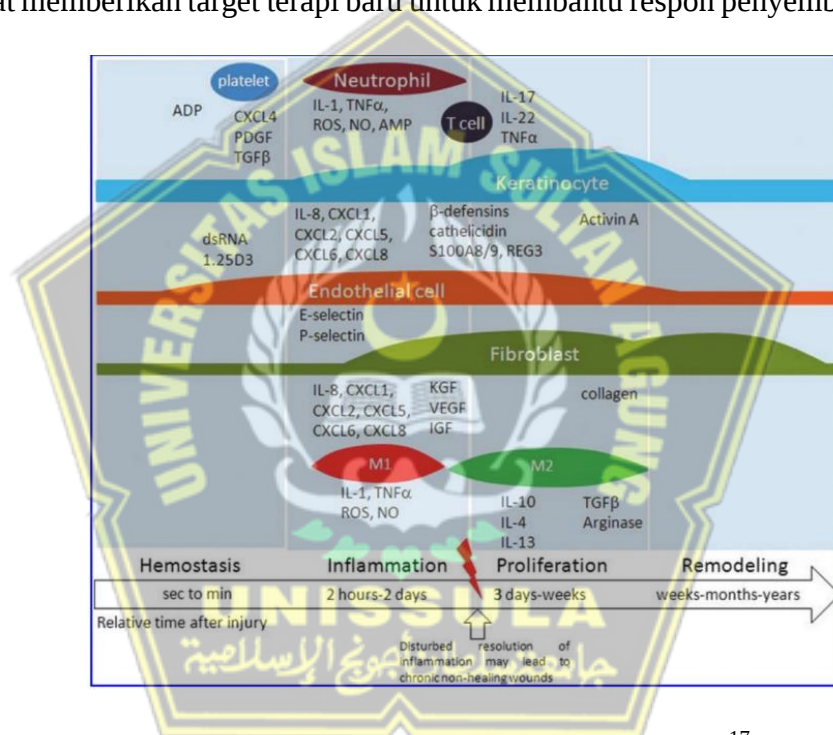
Gambar 2.1 Plastisitas makrofag dalam penyembuhan luka.¹⁷

Makrofag bermain berbagai peran dalam penyembuhan luka. Pada tahap awal penyembuhan luka, makrofag melepaskan sitokin inflamasi yang meningkatkan respons inflamasi dengan merekrut dan mengaktifkan leukosit tambahan. Makrofag juga penting untuk dekontaminasi luka dari mikroba dan membersihkan sel-sel apoptosis, sehingga membuka jalan untuk resolusi peradangan dan awal fase proliferasi penyembuhan luka. Saat lingkungan mikro berubah di dalam dasar luka, makrofag mengalami peralihan fenotipik ke keadaan antiinflamasi, pengatur, dan reparatif, yang merangsang keratinosit, fibroblas, dan endotel sel untuk meningkatkan regenerasi jaringan. Dengan cara ini, makrofag mempromosikan transisi ke fase proliferasi penyembuhan. Beberapa jalur adalah penting dalam peralihan makrofag ini dari M1 ke M2 dan termasuk IL-4, IL-13, Stimulasi TLR, pensinyalan adenosin, CXCL1, dan CCL18. Lebih-lebih lagi, miRNA-21 menargetkan fosfatase dengan motif tensin (PTEN) dan selanjutnya pengurangan PTEN memperpanjang aktivasi protein kinase B (AKT), yang

mematikan keadaan peradangan dan mempromosikan keadaan anti-inflamasi.¹⁷

2.2.4 Urutan proses penyembuhan luka

Identifikasi faktor seluler dan molekuler yang mengganggu penyembuhan luka, seperti sitokin proinflamasi terbuka, disregulasi makrofag, dan ketidakseimbangan molekul imunoregulasi seperti adenosin dan *nitric oxide* (NO), dapat memberikan target terapi baru untuk membantu respon penyembuhan luka.¹⁷



Gambar 2.2 Urutan Proses penyembuhan luka.¹⁷

Agregasi platelet dan pelepasan ADP, PDGF, TGF-β, dan CXCL4 mengaktifkan sel lokal (fibroblas dan keratinosit) dan kaskade imun untuk memulai inflamasi. Keratinosit, sebagai jenis sel utama epidermis, melepaskan sitokin proinflamasi dan peptida dan protein antimikroba (AMP). Bersama-sama, respon imun ini bertujuan untuk mendekontaminasi dasar luka dengan merekrut

neutrofil dan makrofag ke dalam dasar luka. Neutrofil serta makrofag adalah sel pembunuh mikroba profesional yang memunculkan spesies oksigen reaktif (ROS), oksida nitrat (NO), dan AMP. Sementara itu, sel endotel di venula dermal mengekspresikan E dan P-selektin, yang memandu penggulungan dan penarikan leukosit ekstrasvasi ke dasar luka. Sel T residen kulit di satu sisi dan sel T infiltrasi di sisi lain berpartisipasi dalam tahap inflamasi melalui produksi IL-17, IL-22, dan TNF- α yang semakin memperkuat respons pertahanan inang. Selain itu, sel T residen kulit juga dapat menghasilkan faktor pertumbuhan yang merangsang proliferasi keratinosit. Aktivasi makrofag, neutrofil, dan keratinosit menyebabkan sterilisasi luka dan kemudian resolusi peradangan. Pada saat ini, proliferasi keratinosit dan fibroblas merangsang penutupan luka. Langkah ini diarahkan melalui regulasi yang halus dari proses inflamasi ke proses reparatif dan peralihan dalam lingkungan mikro sitokin luka. Makrofag yang aktif dalam fase inflamasi, disebut makrofag M1, mengalami peralihan fenotipik menjadi fenotipe M2 anti-inflamasi dan reparatif. Peralihan ini diatur secara ketat oleh sitokin dan molekul lain. Makrofag M2 mengaktifkan fibroblas untuk menghasilkan faktor pertumbuhan yang merangsang proliferasi dan migrasi keratinosit.¹⁷

2.2 Tinjauan Umum Tentang Hipoksia

2.2.1 Definisi

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, self renewal, dan pelekatan MSCs. Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs.

2.2.2 Mekanisme Fisiologi Seluler

Ketergantungan kuat pada oksigen untuk homeostasis metabolik dan kelangsungan hidup menyebabkan evolusi awal mekanisme molekuler yang memungkinkan sel, jaringan, dan organisme untuk beradaptasi dengan hipoksia. Respon adaptif ini terutama diatur oleh keluarga faktor transkripsi yang disebut *hypoxia-inducible factors* (HIFs).

HIF adalah heterodimer yang terdiri dari subunit protein HIF α , yang hanya diekspresikan selama hipoksia, dan subunit protein HIF1 β yang diekspresikan secara konstitutif. Selama normoksia, subunit HIF α dihambat oleh kompleks VHL dan ditargetkan untuk degradasi proteasomal.

Interaksi yang bergantung pada normoksia antara subunit HIF α dan kompleks VHL membutuhkan hidroksilasi dari dua residu prolin dalam domain *oxygen-*

dependent degradation (ODD) dari HIF α . Reaksi hidroksilasi ini, yang dikatalisis oleh *HIF- regulating prolyl-4-hydroxylases*, digabungkan dengan dekarboksilasi oksidatif-ketoglutarat menjadi suksinat dan karbondioksida.

Hipoksia terjadi apabila adanya subunit HIF- α lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerisasi dengan HIF-1 β dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi peralihan dari metabolisme bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik. HIF-1 α diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 α dan HIF-3 α diekspresikan pada jaringan yang lebih terbatas dan pada tahap perkembangan, seperti paru-paru janin atau endotel vaskular yang berkembang. Dalam merefleksikan pola ekspresi jaringan spesifik mereka, HIF-1 α memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respon terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 α dan HIF-3 α memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen.

2.3 Tinjauan Umum Tentang Mesenchymal Stem Cell (MSC)

MSC merupakan sel multipoten yang mampu bereplikasi menjadi sel yang memiliki daya berdiferensiasi menjadi sel lain. MSC memiliki potensi untuk berdiferensiasi menjadi banyak prekursor jaringan mesenkim seperti osteosit, adiposit, dan kondrosit. Benih dari indukan tersebut dapat digunakan dalam terapi sel.³³

Dari hasil penelitian dengan menggunakan *flow-cytometry* oleh Ghaneialvar *et al*, pada 2018 ekspresi CD marker pada permukaan antigen. Hasilnya, sel punca

mesenkim manusia dan tikus positif mengekspresikan CD44, CD166, CD105 dan CD90 sedangkan, ekspresi CD34 dan CD45 negatif.³⁴ Kesimpulannya, meskipun semua sel induk mesenkim menunjukkan splastisitas dan diferensiasi tri-garis keturunan, tidak semua mengekspresikan panel antigen permukaan yang sama seperti yang dijelaskan untuk sel punca mesenkim manusia. Panel penanda CD tambahandiperlukan untuk mengkarakterisasi potensi regeneratif dan kemungkinan penerapan sel induk ini dalam pengobatan regeneratif dan implantologi.

Sel induk mesenkim dapat diisolasi dari spesies dan jaringan yang berbeda. Sel tersebut diambil dari jaringan ikat seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, hati janin dan lainnya, dan dapat berhasil diperluas secara *in vitro*.³⁵

2.4 Ekspresi gen *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)

2.4.1 Definisi PDGF

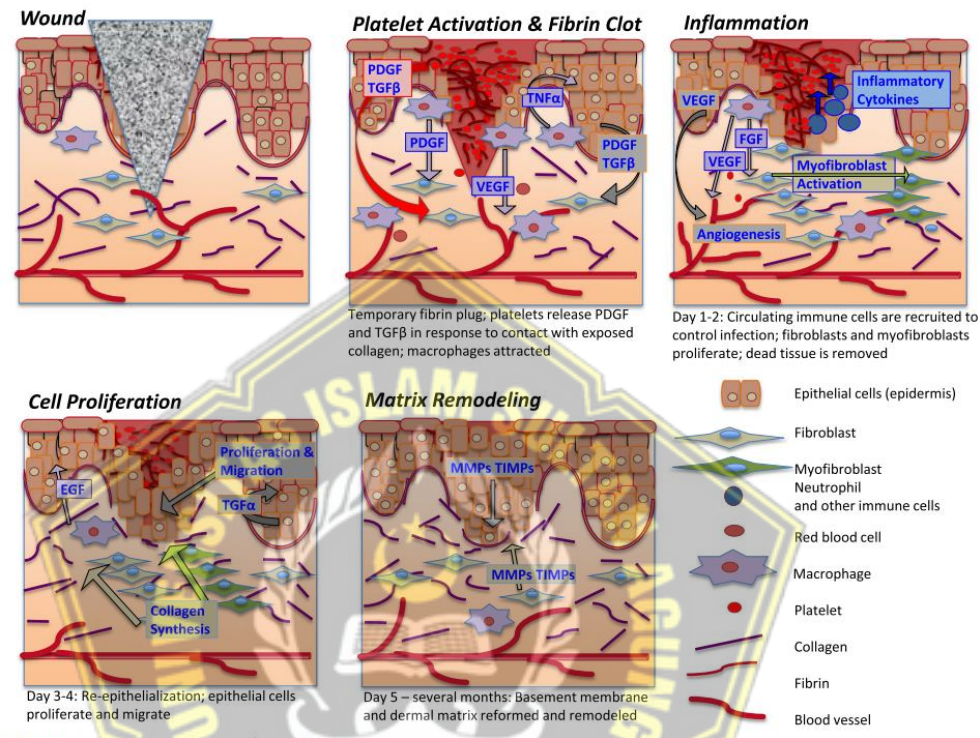
Platelet-derived growth factors (PDGFs) terdiri dari PDGF-A (211 amino acids, 24 kDa), PDGF-B (241 amino acids, 27 kDa), PDGF-C (345 amino acids, 39 kDa), dan PDGF-D (370 amino acids, 43 kDa) yang memiliki kemampuan dalam mengendalikan proliferasi sel fibroblast.^{36,37} Faktor pertumbuhan PDGF mampu merangsang pertumbuhan sel targetnya dan dapat mempengaruhi kemotaksis dan reorganisasi sistem filamen aktin.³⁸ Faktor pertumbuhan PDGF juga dapat mempengaruhi diferensiasi jenis sel tertentu seperti sel fibroblast menjadi myofibroblas yang aktif memproduksi kolagen.^{39,40}

2.4.2 Fungsi Ekspresi PDGF

Ekspresi gen PDGF berperan dalam proses penyembuhan luka. PDGF dilepaskan dari degranulasi trombosit pada cedera sehingga akan menstimulasi mitogenesis dan kemotaksis neutrofil, makrofag, fibroblas, dan sel otot polos menuju lokasi luka untuk membantu inisiasi respons inflamasi. Studi *in vivo* menunjukkan bahwa PDGF penting dalam merekrut pericytes dan sel otot polos ke kapiler sehingga meningkatkan integritas struktural kapiler. Selama fase epitelisasi penyembuhan luka, PDGF meningkatkan produksi *insulin growth factor 1* (IGF-1) dan trombospodin-1. Selain itu, IGF-1 telah terbukti meningkatkan motilitas keratinosit dan trombospodin-1, yang melindungi degradasi proteolitik dari PDGF dan meningkatkan pertumbuhan fibroblas *in vitro*. PDGF juga meningkatkan proliferasi fibroblast untuk membangun matriks kolagen.⁴¹

Growth factors mengikat reseptor yang sesuai pada permukaan sel dan akan mengaktifkan molekul pensinyalan yang relevan untuk dapat mengaktifkan protein sitoplasma atau menginduksi transkripsi protein baru. Kondisi-kondisi seperti tipe seldan lingkungan mikro, *growth factor* dan reseptor yang sama dapat mengaktifkan jalur transduksi sinyal yang berbeda dan menunjukkan respons seluler yang berbeda. *Growth factor* berperan dalam memodulasi respon peradangan yang dapat meningkatkan pembentukan jaringan granulasi, dan menginduksi angiogenesis yang penting dalam pembentukan matriks selama proses penyembuhan luka. Defisiensi faktor pertumbuhan,

termasuk penurunan kadar *Fibroblast Growth Factor* (FGF), PDGF, *Epidermal Growth Factor* (EGF), dan TGF- β .⁴²



Gambar 2.3 Koordinasi spatiotemporal penyembuhan luka.⁴³

Penyembuhan luka terjadi dalam urutan fase yang sangat terorganisir: peradangan, proliferasi sel, dan remodeling matrik. Selama fase inflamasi luka ditutup oleh fibrin, yang bertindak sebagai matriks sementara. Sel-sel kekebalan yang bersirkulasi menyerang matriks baru, membuang jaringan mati, dan mengendalikan infeksi. Fibroblas yang berkembang biak direkrut dan mengeluarkan kolagen untuk membentuk jaringan granulasi dan angiogenesis MMP, penghambat jaringan TIMPS dari MMP. Myofibroblast yang berasal dari fibroblas lokal mengekspresikan α -smooth muscle actin dan mengontraksi area

luka. Re-epitelisasi terjadi saat populasi SC lokal dimobilisasi untuk berproliferasi dan bermigrasi dari tepi luka.⁴³

2.4.3 Reseptor PDGF

PDGF terdiri dari lima isoform yaitu empat homodimer (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD) dan satu heterodimer (PDGF-AB). Kelima isoform PDGF tersebut mampu berikatan pada reseptor PDGF (PDGF-R). Dari kelima isoform PDGF, PDGF-BB adalah isoform yang paling kuat untuk merangsang proliferasi fibroblast. Ketika PDGF-BB berikatan dengan reseptornya (PDGF-R) maka akan terjadi penarikan molekul sinyal ke daerah luka seperti *fosfolipase-C* dan *fosfatidilinositol-3 kinase*. Aktivasi molekul sinyal tersebut menyebabkan aktivasi protein tirosin kinase. Aktivasi protein tirosin kinase ini akan menyebabkan aktivasi MAPK (*mitogen activated protein kinase*) sehingga memicu migrasi sel fibroblast. Sel fibroblast sendiri berkembang dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi atau dari sel fibrosit. Sel fibrosit merupakan sel yang terdapat dalam jaringan ikat dan dalam keadaan tidak aktif, apabila sel fibrosit tersebut aktif, maka disebut dengan sel fibroblast.⁴⁴

2.5 Ekspresi gen Interferon gamma (IFN- γ)

2.5.1 Definisi IFN- γ

IFN- γ adalah sitokin pengatur sistem pertahanan inang dengan memediasi respon imun bawaan dan adaptif. Pensinyalan IFN- γ terkait peradangan dan respons imun yang dimediasi oleh sel. Pensinyalan IFN- γ berfungsi mengatur

fungsi seluler yang berbeda termasuk imunomodulasi, apoptosis, anti-mikroba, dan peran anti dan pro-tumorigenik, bentuk aktif biologis IFN- γ adalah homodimer yang dibentuk oleh *interlocking anti-paralel monomer* IFN- γ . Setiap monomer IFN- γ terdiri dari inti enam heliks alfa dan wilayah terminal C yang diperluas.⁴⁵

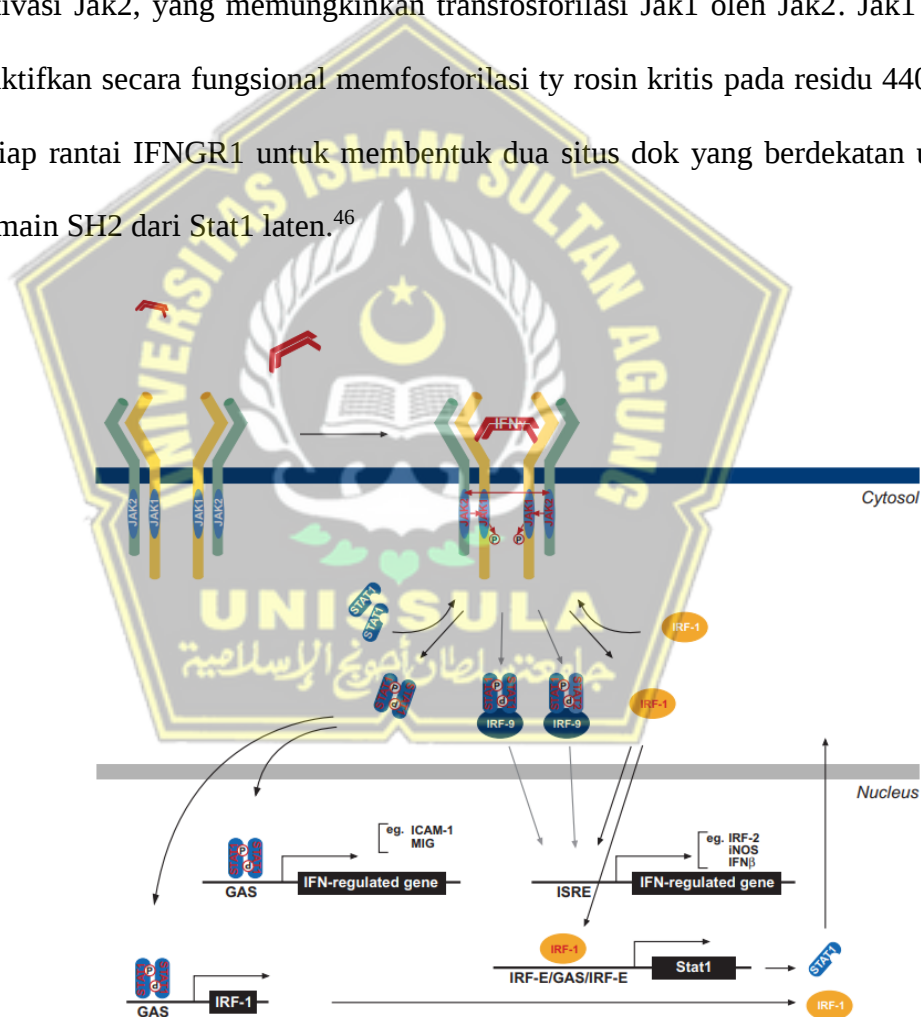
Gen pengkode protein IFN- γ terletak pada kromosom 12q15 pada manusia dan pada genom tikus ditemukan pada kromosom 10D2, gen manusia untuk IFN- γ terdiri dari empat ekson dan tiga wilayah *intervening*, meliputi 5,4 kb. IFN- γ diproduksi oleh sel T helper tipe 1 (Th1) limfosit, limfosit CD8, sel B, sel NKT, dan sel penyaji antigen (monosit, makrofag, dan sel dendritik). Sitokin IL 12 dan IL-18 menginduksi produksi IFN- γ , sedangkan IL-4, IL-10, *transforming growth factor-beta* dan *glukokortikoid* adalah regulator negatif dari produksi IFN- γ .⁴⁵

2.5.2 Transduksi Pensinyalan IFN- γ

IFN- γ memberi sinyal melalui jalur Jak-Stat, jalur yang digunakan oleh lebih dari 50 sitokin, faktor pertumbuhan, dan hormon untuk memengaruhi regulasi gen. Pensinyalan Jak-Stat melibatkan perekrutan reseptor berurutan dan aktivasi anggota keluarga Janus kinase (Jaks: Jaks 1–3 dan Tyk2) dan Stats (Stats 1–6, termasuk Stat5a dan Stat5b) untuk mengontrol transkripsi gen target melalui elemen respon tertentu. Pensinyalan Jak-Stat yang diinduksi IFN telah muncul sebagai paradigma global untuk transduksi sinyal reseptor sitokin kelas II.⁴⁶

Subunit IFNGR1 dan IFNGR2 dari reseptor IFN- dianggap tidak berasosiasi kuat satu sama lain tanpa adanya ligan, setelah pengikatan ligan,

domain intraseluler dari rantai reseptor terbuka untuk memungkinkan asosiasi komponen pensinyalan hilir. IFN- γ yang aktif secara biologis adalah homodimer nonkovalen yang dibentuk oleh *self-association* dari dua polipeptida dewasa dalam orientasi antiparalel dan dengan demikian mengikat IFNGR1 dalam stoikiometri pengikatan 2:2. *Ligand binding* menginduksi *autofosforilasi* dan aktivasi Jak2, yang memungkinkan transfosforilasi Jak1 oleh Jak2. Jak1 yang diaktifkan secara fungsional memfosforilasi tyrosin kritis pada residu 440 dari setiap rantai IFNGR1 untuk membentuk dua situs dok yang berdekatan untuk domain SH2 dari Stat1 laten.⁴⁶

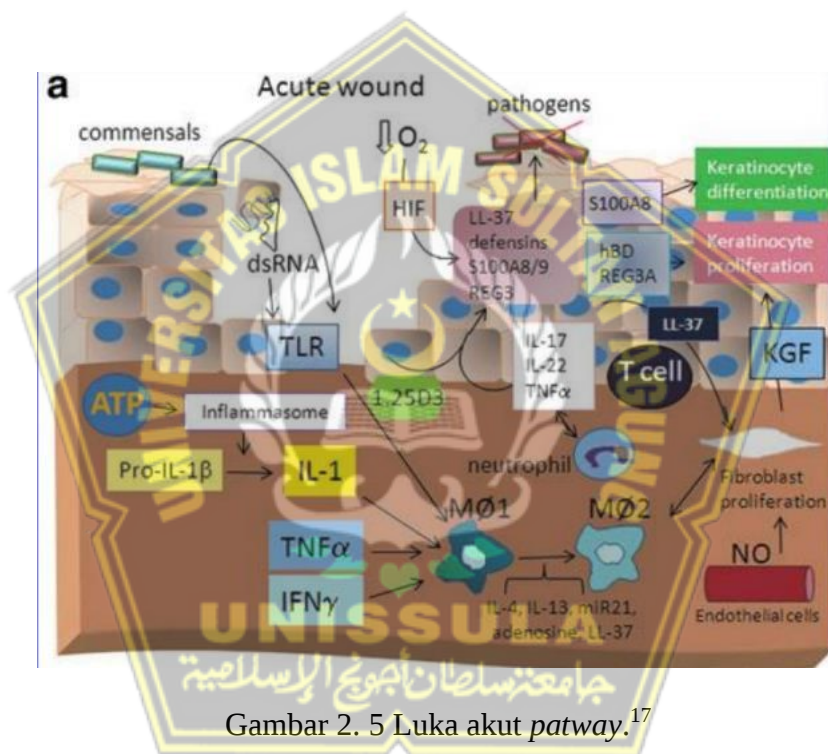


Gambar 2.4 Transduksi Pensinyalan IFN- γ .⁴⁷

Pasangan Stat1 yang direkrut reseptor difosforilasi di dekat terminal C di

Y701, oleh Jak2, fosforilasi menginduksi disosiasi homodimer Stat1 (juga dikenal sebagai faktor aktivasi γ -IFN) dari reseptor. Empat tirosin kritis (dikandung oleh Jak1, Jak2, IFNGR1, dan Stat1) difosforilasi dalam 1 menit pengobatan IFN- γ .⁴⁷

2.5.3 Peran IFN- γ pada luka



Gambar 2. 5 Luka akut *patway*.¹⁷

Respons AMP ditingkatkan dengan kadar O₂ yang rendah pada luka, yang diketahui mengaktifkan HIF1a dan melalui IL-17 dan IL-22 yang diproduksi oleh sel T residen di lokasi cedera. IL-1, aktivasi TLR, dan interferon (IFN) γ , serta TNF α mendorong diferensiasi makrofag M1. Setelah dekontaminasi luka berhasil, fase inflamasi menghilang dan tahap reparatif, yang ditandai dengan proliferasi keratinosit dan fibroblas, dimulai. Peralihan dari makrofag M1 ke

makrofag mirip M2 serta fungsi AMP yang berbeda merupakan pengatur penting fase reparatif. Reepitelisasi luka membutuhkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi keratinosit yang diatur, yang dipandu, setidaknya sebagian, melalui produksi faktor pertumbuhan dan AMP. Namun, dalam kondisi patogenik, seperti ulkus diabetik.¹⁷

2.6 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah, yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewanlain. Dalam kode etik penelitian kesehatan dicantumkan bahwa salah satu prinsip dasar riset biomedis, dimana manusia sebagai subjek harus memenuhi prinsip ilmiah yang telah diakui dan harus didasarkan atas eksperimen laboratorium dan hewan percobaan yang memadai, serta berdasarkan pengetahuan yang lengkap dari literatur ilmiah. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) termasuk hewan nokturnal dan sosial. Salah satu faktor yang mendukung kelangsungan hidup tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan baik ditinjau dari segi lingkungan adalah temperatur dan kelembaban. Temperatur yang baik untuk tikus putih (*Rattus norvegicus*), yaitu 19°C–23°C, sedangkan kelembaban 40-70%.⁴⁸



Gambar 2.6 Tikus Wistar putih (*Rattus norvegicus*).

Kelebihan dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai binatang percobaan antara lain bersifat omnivora (pemakan segala), mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia, dan gizi yang dibutuhkan juga hampir sama dengan manusia. Selain itu dari segi ekonomi memiliki harga yang murah, ukuran yang kecil, dan berkembang dengan cepat. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) percobaan galur Wistar yang dikembangkan secara luas sangat mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan. Makanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) juga mempunyai variasi susunan, meliputi: protein 20- 25 %, karbohidrat 45-50%, serat 5%. Setiap hari seekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa membutuhkan makanan antara 12-20 gr, air minumannya 20-45 ml, mineral berupa besi sebesar 35 mg/kg.⁴⁸

2.7 Pengaruh SH-MSCs terhadap ekspresi gen PDGF dan IFN- γ tikus wistar dengan model luka eksisi

Penggunaan *secretome* dari MSC sebagai terapi alternatif yang efektif untuk terapi berbasis sel punca karena mengandung berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin.⁴⁹ Dengan kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis jaringan, MSC berkontribusi dalam mempercepat regenerasi jaringan yang rusak. Penelitian terbaru telah melaporkan bahwa MSC yang dikondisikan hipoksia meningkatkan kapasitas parakrinnya.⁵⁰

Sitokin IL-1 β , TNF α dan IFN γ yang disekresikan oleh makrofag dan sel T memiliki peran besar dalam proses kerusakan sel. *Sekretome* mengandung berbagai faktor anti-inflamasi diantaranya yaitu IL-10, TGF β , TGF α , bFGF,

EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, IGF-1, dan HGF. IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang disekresi oleh sekretom yang dapat menurunkan sitokin pro-inflamasi (IL-6, TNF α , dan IL-1 β).⁵¹ Reepitelisasi dan pembentukan growth factor seperti PDGF berperan penting dalam penyembuhan luka.⁵²

Hipoksia prakondisi meningkatkan fungsi sitoprotektif MSC, memungkinkan MSC mempertahankan multipotensinya sehingga meningkatkan laju proliferasi dan mengidentifikasi lokasi cedera.⁵³ Kemampuan sekresi MSC untuk berdiferensiasi untuk memperbaiki jaringan yang terluka, Peran sekresi MSC dalam menginduksi respon inflamasi menghasilkan komponen inflamasi berjalan langsung ke tempat penyembuhan luka, mempercepat respon inflamasi dan meningkatkan proliferasi sel, sintesis matriks ekstraseluler, faktor pertumbuhan rilis, dan neovaskularisasi, di antara aspek lain dari kondisi kekebalan tubuh.⁵⁴

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Agregasi platelet dan pelepasan ADP, PDFG, TGF- β , dan CXCL4 mengaktifkan sel lokal (fibroblas dan keratinosit) dan kaskade imun untuk memulai inflamasi. Keratinosit, sebagai jenis sel utama epidermis, melepaskan sitokin proinflamasi, peptida dan AMP. Neutrofil serta makrofag mengkatifikasi ROS, oksida nitrat (NO) dan AMP. Sementara itu, sel endotel di venula dermal mengekspresikan E dan P-selektin, yang memandu penggulungan dan penarikan leukosit ekstrasvasasi ke dasar luka. Sel T residen kulit di satu sisi dan sel T infiltrasi di sisi lain berpartisipasi dalam tahap inflamasi melalui produksi interleukin (IL) -17, IL-22, dan TNF α yang semakin memperkuat respons pertahanan inang. Aktivasi makrofag, neutrofil, dan keratinosit menyebabkan sterilisasi luka dan kemudian resolusi peradangan.¹⁷

Makrofag yang aktif dalam fase inflamasi, disebut makrofag M1 mengalami peralihan fenotipik menjadi fenotipe M2 anti-inflamasi dan reparatif. Peralihan ini diatur secara ketat oleh sitokin dan molekul lain. Makrofag M2 mengaktifkan fibroblas untuk menghasilkan faktor pertumbuhan yang merangsang proliferasi dan migrasi keratinosit.¹⁷

Pensinyalan intra seluler melibatkan p38 dan miR-21. miR-21 mempengaruhi beberapa aktor seluler dalam penyembuhan luka dengan *activator*

protein 1 (AP1), dan NF- κ B. Di dalam makrofag, miR-21 memainkan peran kunci dalam transisi dari peradangan menjadi anti-inflamasi fenotip. Jalur stres p38/Jun diaktifkan oleh PAMPs dan DAMPs, yang menyebabkan sekresi sitokin inflamasi, seperti IL-1, TNF, dan IL-6.¹⁷ Beberapa jalur penting dalam peralihan makrofag ini dari M1 ke M2 dan termasuk IL-4, IL-13, Stimulasi TLR, pensinyalan adenosin, CXCL1, dan CCL18. Aktivasi miRNA-21 menargetkan PTEN dan selanjutnya pengurangan PTEN memperpanjang aktivasi protein kinase B (AKT), yang mematikan keadaan peradangan dan mempromosikan keadaan anti-inflamasi.¹⁷

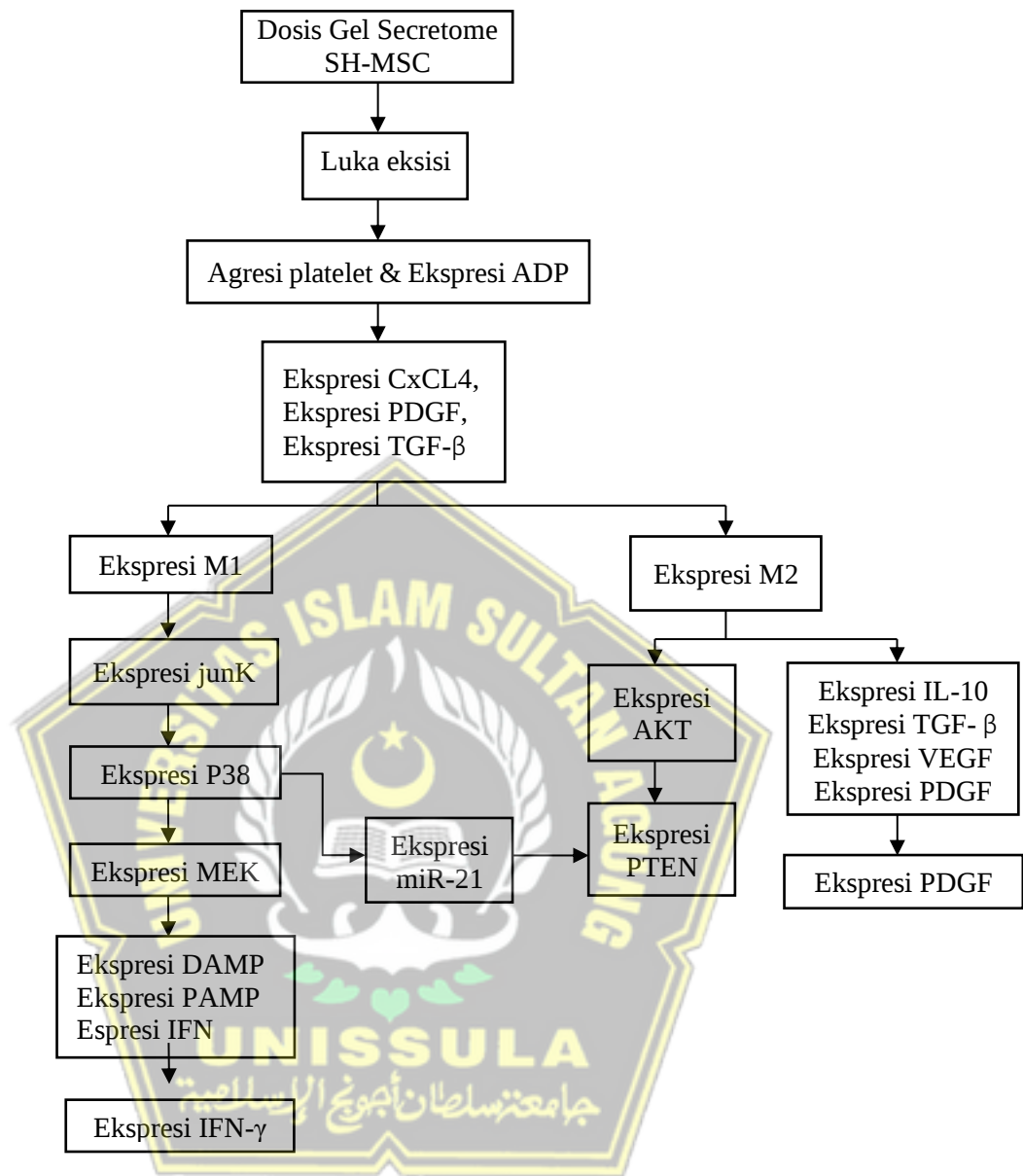
PDGF-BB adalah isoform yang paling kuat untuk merangsang proliferasi fibroblast. Ketika PDGF-BB berikatan dengan reseptornya (PDGF-R) maka akan terjadi penarikan molekul sinyal ke daerah luka seperti *fosfolipase-C* dan *fosfatidilinositol-3 kinase*. Aktivasi molekul sinyal tersebut menyebabkan aktivasi protein tirosin kinase. Aktivasi protein tirosin kinase ini akan menyebabkan aktivasi MAPK (*mitogen activated protein kinase*) sehingga memicu migrasi sel fibroblast. Sel fibroblast sendiri berkembang dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi atau dari sel fibrosit. Sel fibrosit merupakan sel yang terdapat dalam jaringan ikat dan dalam keadaan tidak aktif, apabila sel fibrosit tersebut aktif, maka disebut dengan sel fibroblast.⁴⁴

Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada

kondisi normal.⁵⁵ Berbagai sitokin dan mediator yang muncul sebagai respon MSC terhadap adanya hipoksia, salah satunya adalah IL-10.⁵⁶ Berbagai sitokin tersebut yang diekspresikan pada medium, difiltrasi menggunakan TFF yang selanjutnya disebut sebagai SH-MSCs.

IL-10 yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur STAT3 melalui translokasi JAK-1 dari membrane intraseluler menuju sitoplasma. Hal ini berdampak pada fosforilasi STAT3 yang berujung pada translokasinya menuju nukleus. Translokasi STAT3 menuju nukleus dapat mengaktivasi gen SOCS3 untuk selanjutnya disintesis menjadi protein yang dilepaskan menuju sitoplasma. Ekspresi SOCS3 pada sitoplasma menghambat jalur pensinyalan intraseluler NF- κ B sehingga mencegah translokasi NF- κ B ke nukleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen pro-inflamasi. Melalui sintesis SOCS3 dan penghambatan NF- κ B, IL-10 dapat menekan ekspresi berbagai molekul pro-inflamasi, termasuk sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ .⁵⁷

Sel punca mesenkim mampu mengekspresikan dan memproduksi bermacam-macam *growth factor* dan sitokin yang aktif. Adapun beberapa *secretome* yang dimaksud adalah fibroblast *growth factor*, seperti IL-1, IL-6, TGF- β , dan VEGF. Reepitelisasi dan pembentukan *growth factor* seperti PDGF berperan penting dalam penyembuhan luka.⁵² Adapun kerangka teori dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep

Adapun kerangka konsep penelitian berdasarkan kategori variabel yang diteliti pada tabel kerangka teori, yang digambarkan sebagai berikut:



Gambar 3. 2 Skema Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

1. Ada pengaruh pemberian gel *Secretom Hypoxia Mesencymal Stem cell* (SH-MSCs) pada dosis 400 μ l/kgBB terhadap peningkatan ekspresi gen PDGF tikus *Wistar* dengan model luka eksisi.
2. Ada pengaruh pemberian gel *Secretom Hypoxia Mesencymal Stem cell* (SH-MSCs) pada dosis 400 μ l/kgBB terhadap penurunan ekspresi gen IF-Gamma tikus *Wistar* dengan model luka eksisi.
3. Ada pengaruh *secretome hipoxia mesenchymal stem cell* (SH-MSCs) terhadap perbedaan ekspresi gen PDGF dan IF-Gamma antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian 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: 1 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol positif) dan 1 kelompok tikus sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.

Tahap dalam rancangan penelitian dengan memilih subjek penelitian (Tikus) Sehat, berikutnya melakukan adaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar, subjek dilakukan validasi untuk memastikan semua subjek masuk dalam kriteria inklusi penelitian setelah itu dilakukan randomisasi untuk membagi kelompok menjadi 3. Kelompok 1 merupakan kontrol negatif (Tikus luka eksisi dengan perlakuan basic gel placebo), kelompok perlakuan 2 merupakan kontrol positif (Tikus dengan luka eksisi dengan perlakuan diberi *clobetasol* dosis 0,25g/kg).⁵⁸ dan Perlakuan 3 merupakan tikus dengan luka eksisi di olesi gel topikal SH-MSCs dosis 400µL/kgBB.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian menggunakan tikus Wistar dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Fakultas Kedokteran UNISSULA.

4.2.2 Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus Wistar 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 6mm dengan kedalaman 2 mm.

4.2.2.2 Kriteria Ekslusi

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 Drop Out

Tikus *Wistar* jantan yang 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:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18 \quad n \geq 6 \rightarrow \text{Pembulatan menjadi 6.}$$

Keterangan : t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya sampel setiap perlakuan.

4.3 Variabel Dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

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

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen PDGF dan IF-Gamma.

4.3.2 Definisi Operasional

1. Variabel : Gel Topikal SH-MSCs

Pengertian : Gel MSCs diperoleh dari Lab SCCR, yang dioles pada luka eksisi setiap 1x/hari pada punggung tikus dengan dosis 400 $\mu\text{L/kgBB}$ selama 5 hari tiap kelompok.

Skala : Ordinal

2. Variabel : Ekspresi PDGF dan IF-Gama

Pengertian : Ekspresi PDGF dan IF-Gama pada tikus Wistar yang diambil dari jaringan kulit diperiksa pada hari ke-6

menggunakan RT-qPCR.

Skala : Rasio

3. Variabel : Perlakuan luka eksisi sebagai variabel pra kondisi

Pengertian : Tikus Wistar dibiuis, rambut pada punggung tikus dicukur lalu dilukai dengan diameter 6mm dengan kedalaman 2mm menggunakan cater dan diisolasi sesuai kelompok.

4.4 Alat Dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *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 di dalam *hypoxic chamber*. Selain itu, penelitian ini juga steril swab untuk mengoleskan gel SH-MSC. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi PDGF dan IF-Gama.

4.4.2 Bahan

Bahan dari penelitian ini 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 krim berbasis air, alkohol 70%, PBS, *Ketamin*, dan *Xylasine*.

4.5 Cara Penelitian

4.5.1 Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2 Teknik Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

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 konfluensi 80%.

4.5.3 Proses Hipoksia

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit 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 dicampur dosis 400 μ L.

4.5.4 Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel SH-MSC 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.

4.5.5 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 potong hingga bersih.
3. Permukaan kulit yang telah bersih menggunakan *bovidon iodin* untuk menghindari infeksi selama pembuatan luka. Pembuatan luka dilakukan dengan menggunakan biopsi punch ukuran 6 mm dengan kedalaman 2mm.
4. Selanjutnya dengan pemberian gel topikal setiap hari selama 5 hari yang mengandung SH-MSC dosis 400 μ L/kgBB. Tikus kontrol negatif diberikan perlakuan base gel, Tikus kontrol positif diberikan perlakuan *Clobetasol* 0,25g/kg.⁵⁸
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 μ m 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.

4.5.6 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel darah diambil dan dilakukan proses sentrifugasi bertingkat menggunakan Ficoll Paque sehingga didapatkan PBMCs.
2. Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10% dan dibuat menjadi blok paraffin.
3. Sampel kulit sebanyak 50 mg kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA *Iso Plus*.

4. Sisi lain, PBMCs sebanyak 10^7 sel masing-masing ditransfer ke mikro tube dan diberi 50 mL RNA Iso Plus.
5. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi larutan phenol (Trizol)sebanyak 1 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
6. Ditambahkan 0,2 mL *chloroform* dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
7. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, serta disentrifugasi pada 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 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 4°C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
10. Setelah kering ditambahkan 1 ml etanol 70% dalam larutan NFW (Nuclease free water) lalu bolak-balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 7500 xg selama 5 menit pada suhu 4°C.

11. Supernatan dibuang dan ditambahkan NFW sebanyak 100 μ m. Campuran diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 260 nanometri.
12. Sintesis cDNA dengan membuat campuran dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, ditambah enzim 1 μ L Revarttrace dengan suhu 37⁰C selama 15 menit, 50⁰C selama 15 menit dan 95⁰C selama 5 menit.

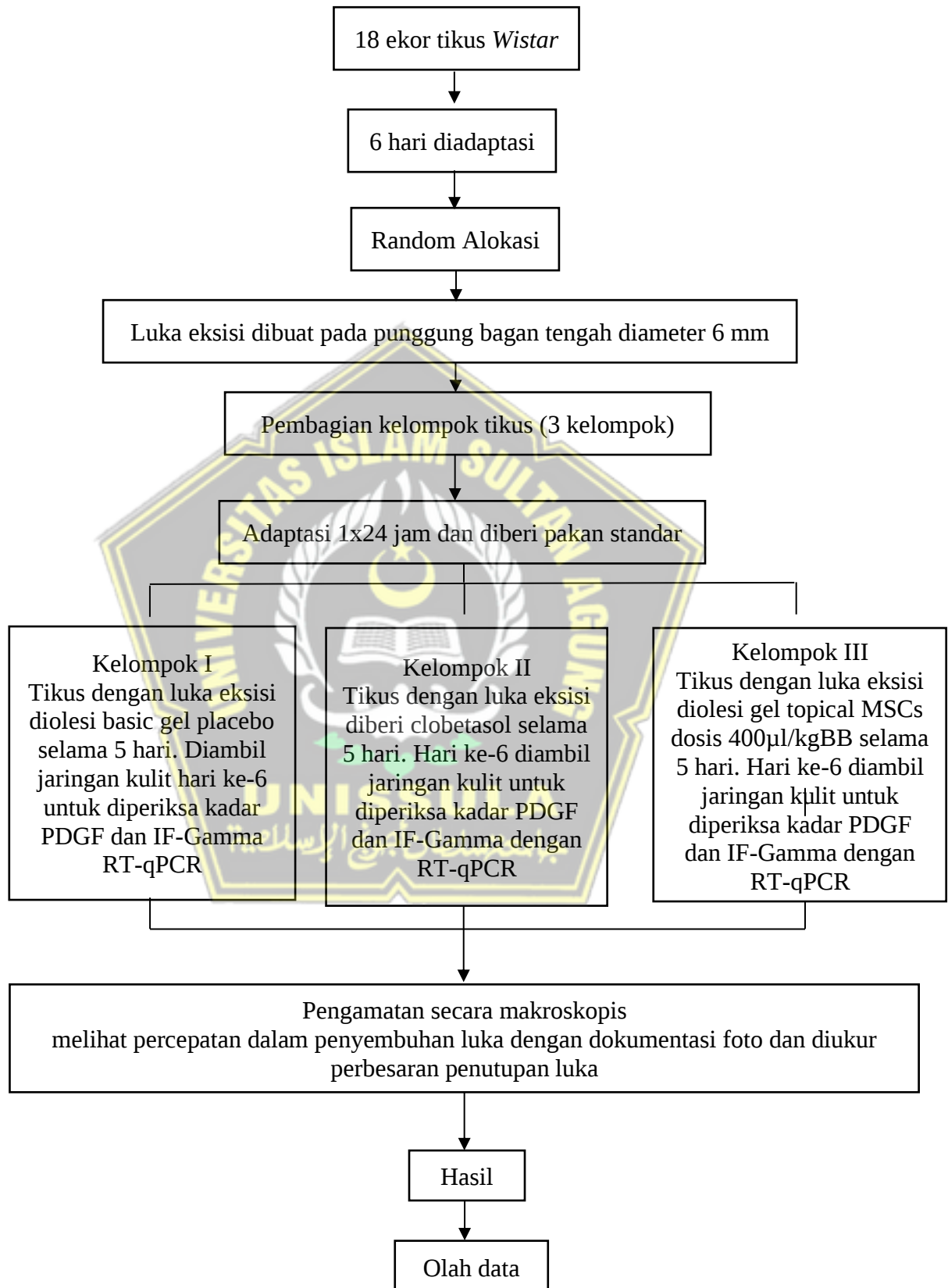
4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian diproses, disunting, dan ditabulasi, untuk dilakukan uji deskriptif yang dilanjutkan dengan normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*. Data yang dihasilkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0.

4.7 Jadwal Pelaksanaanya Penelitian

Penelitian direncanakan di lakukan di laboratorium SCCR Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, pada bulan Juli 2023.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Skema Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian gel *secretom hypoxia mesencymal stem cell* (SH-MSC) terhadap ekspresi gen PDGF dan IFN- γ 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) Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

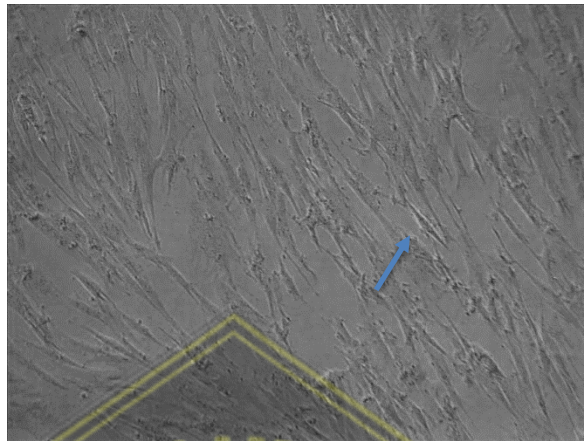
Penelitian dengan subjek tikus jantan sebanyak 18 ekor dengan model luka eksisi dengan kriteria tikus sehat, Usia berkisar 2-3 bulan, dan berat badan 200-250 gram. tikus jantan yang sesuai kriteria lalu dianestesi dan pada bagian punggung bulu dicukur untuk dibuat luka menggunakan biopsi *punch* dengan diameter 6 mm dan kedalaman 2 mm. Tikus yang telah diberi luka kemudian randomisasi dan dibagi 3 kelompok, yaitu kelompok I (basic gel placebo), kelompok II (*Clobetasol* dosis 0,25g/kg) dan kelompok III (gel topikal SH-MSCs dosis 400 μ l/kgBB).

5.1 Hasil Penelitian

Secretome hipoksia MSC yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari *Umbilical Cord* tikus bunting berumur 21 hari, Kemudian dilakukan validasi dengan menggunakan analisis fenotipik sel menggunakan alat *flowcytometry* dan menguji kapasitas diferensiasi osteogenik. Sel-sel yang diverifikasi kemudian dikultur dalam lingkungan hipoksia.

Hasil isolasi selanjutnya dikultur pada cawan petri menggunakan medium khusus yaitu *Dulbeccos's modified eagle medium* (DMEM). Sel-sel yang terlihat

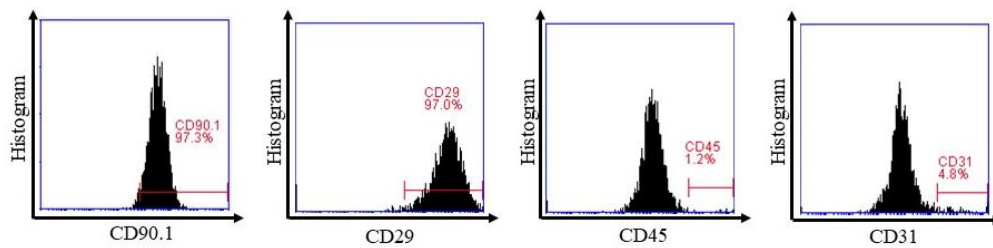
secara mikroskopis dalam kultur SH-MSCs setelah tahap kelima bagian bawah memiliki morfologi yang mirip dengan *spindle*.



Gambar 5.1 Kultur MSC berbentuk *spindle* (perbesaran 100x).

SH-MSCs tervalidasi menggunakan marker CD90, CD29, CD45, dan CD31 selanjutnya dilakukan perlakuan hipoksia dimana SH-MSCs diinkubasi ke dalam *hypoxic chamber* dengan kadar oksigen mencapai 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Tahapan akhir yaitu melakukan pemeliharaan sel hingga SH-MSCs mencapai konfluensi 80% untuk mendapatkan hipoksia SH-MSCs.

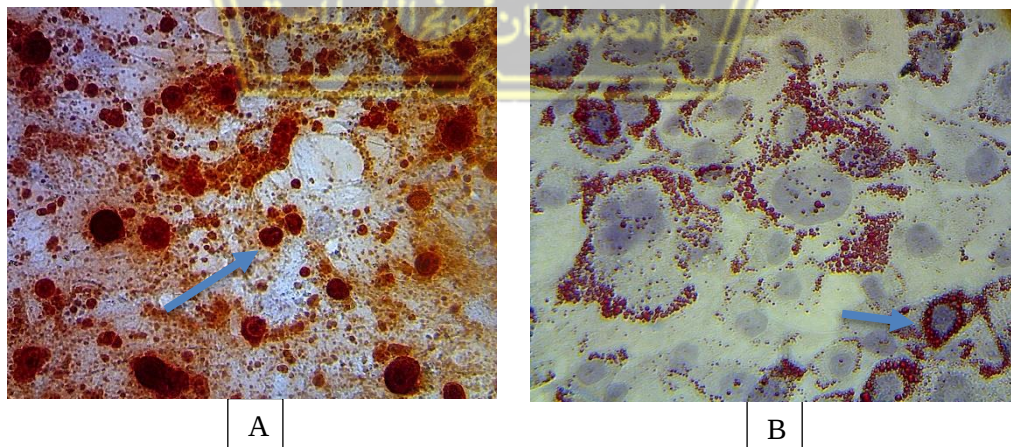
Penelitian ini menunjukkan bahwa SH-MSCs mampu mengekspresikan CD90 (97,3%), CD29 (97,0%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,2%) dan CD31 (4,8%)



Gambar 5. 2 Ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31 pada *Flow cytometry*.

Setelah pemberian penanda, *secretom* MSC dalam proses hipoksia, langkah selanjutnya adalah mempertahankan sel agar menghasilkan *secretom hypoxia* MSC.

Studi ini juga menguji kapasitas MSC untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel dewasa. MSC dibedakan menjadi osteofit dan adiposit menggunakan media yang berbeda. Hasil dari pekerjaan ini menunjukkan bahwa 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 **(A)** MSC berdiferensiasi menjadi osteosit dan **(B)** MSC berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizerin red* dan *oil red* pada pembesaran 400x

Ekspresi gen PDGF berperan dalam proses penyembuhan luka. PDGF dilepaskan dari degranulasi trombosit pada cedera sehingga akan menstimulasi mitogenesis dan kemotaksis neutrofil, makrofag, fibroblas, dan sel otot polos menuju lokasi luka untuk membantu inisiasi respons inflamasi.⁴¹ Faktor pertumbuhan PDGF mampu merangsang pertumbuhan sel targetnya dan dapat mempengaruhi kemotaksis dan reorganisasi sistem filamen aktin.³⁸ Faktor pertumbuhan PDGF juga dapat mempengaruhi diferensiasi jenis sel tertentu seperti sel fibroblast menjadi myofibroblas yang aktif memproduksi kolagen.^{39,40}

Hasil makroskopis luka eksisi tiap kelompok menunjukkan perbaikan penyembuhan luka jika dibandingkan antara hari ke dua dengan hari ke 6. Pemberian gel *secretom hypoxia mesencymal stem cell* (SH-MSCs) pada dosis 400 μ l/kgBB terbukti secara makroskopis mempercepat penyembuhan luka dibuktikan dengan gambar secretome H6 yang memiliki diameter luka yang kecil dibandingkan dengan kelompok *clobetasol* maupun kelompok base gel.

5.1.1 Pengaruh pemberian SH-MSC dosis 400 μ L terhadap ekspresi gen PDGF dan IFN- γ .

Hasil analisis ekspresi gen PDGF dan IFN- γ pada hari ke 6, menggunakan metode *RT-PCR* menggunakan alat *Eco Real-Time PCR* Illumina didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.1 Data Hasil Penelitian ekspresi gen PDGF

Variabel	Kelompok			<i>P value</i>
	K- N=6	K+ N=6	P1 N=6	
Ekpresi gen PDGF (pg/mL)				
Mean ± SD	0,63 ± 0,23	0,84 ± 0,15	2,32 ± 0,22	
<i>Shapiro wilk</i>	0,49*	0,76*	0,18*	
<i>Levene test</i>				0,35**
<i>One way anova</i>				0,000***

Keterangan :

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

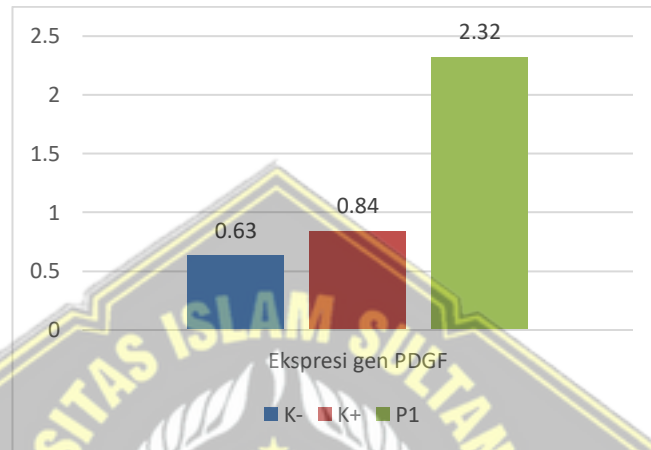
** *Levene's Test* ($p > 0,05$ = homogen)

*** *One Way Anova* ($p < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel diatas, Rata-rata ekspresi gen PDGF di kelompok P1 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata ekspresi gen PDGF kelompok K+. Selanjutnya rerata ekspresi gen PDGF kelompok K- dengan nilai terendah.

Data ekspresi gen PDGF 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 $p = 0,35$ ($p > 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen PDGF normal dan homogen, maka dilakukan analisa statistik

dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen PDGF yang bermakna diantara ketiga kelompok.



Gambar 8. Grafik Kadar PDGF Pada Seluruh Kelompok

Tabel 5. 2 Data Hasil Penelitian ekspresi gen IFN- γ

Variabel	Kelompok			P value
	K- N=6	K+ N=6	P1 N=6	
Ekpresi gen IFN-γ. (pg/mL)				
Mean $\pm$ SD	2,55 $\pm$ 0,10	0,21 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,12	
Shapiro wilk	0,78*	0,49*	0,26*	
Levene test				0,70**
One way anova				0,000***

Keterangan :

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

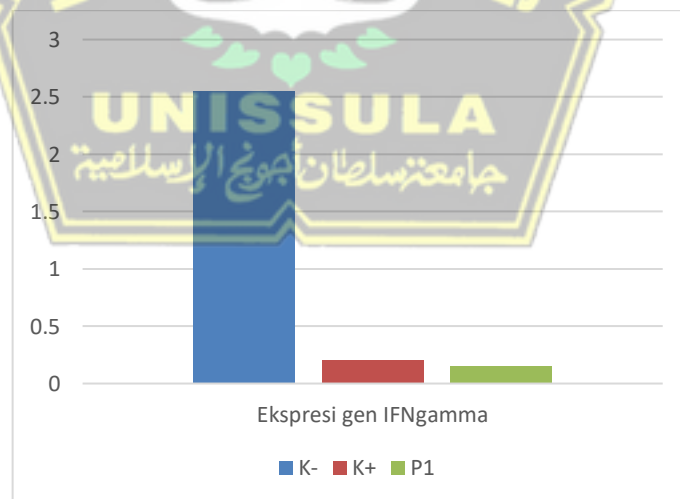
** Levene's Test ($p > 0,05$ = homogen)

*** One Way Anova ($p < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel diatas, Rata-rata ekspresi gen IFN- γ di kelompok K- yang tertinggi, kemudian diikuti oleh rerata

ekspresi gen IFN- γ kelompok K+. Selanjutnya rerata ekspresi gen IFN- γ kelompok P1 dengan nilai terendah.

Data ekspresi gen IFN- γ 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 $p = 0,70$ ($p > 0,05$). Maka dilakukan analisa statistik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rata-rata ekspresi gen IFN- γ yang bermakna diantara ketiga kelompok. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.4 Grafik Kadar IFN- γ Pada tiap Kelompok

5.1.2 Analisis perbedaan rata-rata ekspresi PDGF dan IFN- γ

Perbedaan ekspresi gen PDGF ditunjukkan oleh pasangan kelompok, dengan hasil uji *post hoc* LSD pada tabel dibawah ini:

Tabel 5. 3 Uji *Post Hoc* LSD kadar PDGF pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K-	K+	0,102	-0.4620	0.0467
	P1	0,000*	-1.9394	-1.4306
K+	K-	0,102	-0.0467	0.4620
	P1	0,000*	-1.7318	-1.2230
P1	K-	0,000*	1.4306	1.9394
	K+	0,000*	1.2230	1.7318

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan perbandingan K- dengan K+ (0,102) maupun K+ dengan K- (0,102) tidak terdapat perbedaan bermakna, K- dengan P1, K+ dengan P1, P1 dengan K-, dan P1 dengan K+ terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,005$). Hasil uji *Post Hoc* LSD dengan pemberian gel topikal SH-MSCs 400 μ l/kgBB dapat meningkatkan ekspresi PDGF pada tikus *Wistar* jantan model luka eksisi.

Tabel 5.4 Uji *Post Hoc* LSD kadar IFN- γ pada tiap kelompok.

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K-	K+	0,000*	0,8207	1.3406
	P1	0,000*	1.0029	1.5228
K+	K-	0,000*	-1.3406	-0.8207
	P1	0,156	-0.0778	0.4421
P1	K-	0,000*	-1.5228	-1.0029
	K+	0,156	-0.4421	0.0778

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan rerata K- dengan K+ (0,000) terdapat perbedaan yang bermakna, hal yang sama pada K- dengan P1, K+ dengan K- dan P1 dengan K- terdapat perbedaan bermakna, sedangkan K+ dengan P1 dan P1 dan K+ tidak berbeda bermakna antar kedua kelompok. Hasil uji *Post Hoc* LSD menunjukkan bahwa pemberian gel *secretom hypoxia mesencymal stem cell* (SH-MSC) dosis 400 μ l/kgBB dapat menurunkan kadar IFN- γ pada tikus jantan galur *Wistar* model luka eksisi.

5.2 Pembahasan

Luka eksisi merupakan salah satu jenis luka yang terjadi pada permukaan kulit, bagian bawah lapisan yang terpotong dengan kedalaman yang bervariasi dengan pinggiran luka yang teratur.⁵⁹ 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.⁶⁰

Transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi merupakan langkah kunci selama penyembuhan luka. Fase inflamasi sangat penting untuk mengarah ke hemostasis dan perekrutan sistem kekebalan bawaan, yang melindungi tubuh dari serangan patogen dan membantu mengangkat jaringan mati. Peradangan yang berkepanjangan dapat menghambat tahap normal penyembuhan luka dan juga dikaitkan dengan jaringan parut yang berlebihan.⁶¹ Transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi merupakan langkah yang paling krusial selama proses penyembuhan luka.⁶²

Pada penelitian ini *Mesenchymal stem cell* dikondisikan dalam kondisi hipoksik kemudian dilakukan dioles *hypoxic MSC* di sekitar area luka untuk dapat mempercepat penyembuhan luka dengan mempersingkat masa peralihan dari fase inflamasi menuju ke fase proliferasi. *Mesenchymal stem cell* yang dioles akan melakukan migrasi ke area luka.⁶³ Menurut penelitian sebelumnya Oleh Chen et al, 2014, Widowati, et al 2017, Peruzzaro et al, 2019 dan Putra et

al., 2019. Prekondisi MSC dengan lingkungan hipoksia memiliki *survival chance* yang lebih tinggi pada area luka dibandingkan dengan MSC yang dikultur pada kondisi normoksia. Pada saat kondisi hipoksia, dimana konsentrasi oksigen pada *niche* sel punca 2-9% dapat mendorong *Hypoxia-Inducible Factor 1- α* (HIF-1 α) meningkat sehingga menurunkan tingkat *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam mitokondria MSC, mengaktifkan *Nuclear Factor Kappa B* (NF κ B). HIF-1 α juga merangsang sintesis *Prion Protein Celuler Normal* (PrPC), dan NF κ B mempromosikan ekspresi protein anti-apoptosis, memperbaiki faktor pertumbuhan, dan enzim antioksidan.^{64,65}

Analisis terhadap medium yang dikondisikan MSC menunjukkan bahwa MSC mengeluarkan banyak mediator perbaikan jaringan yang dikenal termasuk faktor pertumbuhan, sitokin, dan kemokin, khususnya VEGF, PDGF, bFGF, EGF, faktor pertumbuhan keratinosit (KGF), dan TGF- β .⁶⁶ Peningkatan kemampuan MSC dalam memicu polarisasi disebabkan oleh lebih banyaknya sekresi IL10 oleh MSC akibat inkubasi pada kondisi hipoksia. Kondisi hipoksia diketahui mampu mendorong MSC untuk mensekresikan lebih banyak sitokin.⁶⁷

MSC dapat meningkatkan penyembuhan luka melalui dua mekanisme utama yaitu dengan memberikan isyarat yang diperlukan untuk penyembuhan luka melalui pelepasan mediator inflamasi, bersama-sama dengan sitokin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*), selanjutnya melalui MSC sendiri berpartisipasi dalam proses penyembuhan luka.⁶⁸ MSC berkomunikasi dengan sel lain dalam tubuh manusia dan mengalami proses *homing* ke daerah cedera

sebagai upaya untuk menanggapi sinyal dari kerusakan sel, yang dikenal sebagai sinyal *homing*. Keadaan *homing* terjadi apabila terdapat TNF- α yang merupakan mediator pro-inflamasi keluar ketika jaringan mengalami kerusakan sehingga MSC akan bermigrasi ke jaringan yang rusak tersebut.⁶⁹

MSC juga berperan dalam setiap fase penyembuhan luka. Pada fase inflamasi MSC berperan dalam regulasi proses inflamasi, supresi TNF- α , blokade proliferasi dari sel T. Pada fase proliferasi MSC berperan dalam produksi *growth factor* (VEGF, HGF, PDGF dan FGF), perekrutan dari keratinosit, fibroblas dermal, dan *niche stem cell*. Pada fase remodelling MSC berperan dalam produksi TGF- β , KGF, regulasi dari MMPs/TIMPS dan regulasi dari deposisi kolagen.⁷⁰

Penelitian ini sejalan dengan penelitian lainnya yang menggunakan gel sekretom MSC dosis 400 μ l dimana terdapat penurunan inflamasi pada adhesi peritoneal.⁷¹ Pada penelitian ini didapatkan hasil pemberian gel *secretom hypoxia mesencymal stem cell* (SH-MSC) dosis 400 μ l/kgBB menurunkan kadar IFN- γ pada tikus jantan galur Wistar model luka eksisi, Sejalan dengan penelitian oleh Anggarwan, at al. dengan penambahan MSC ke dalam respon imun aktif menurunkan sekresi sitokin proinflamasi TNF- α dan interferon- (IFN- γ) sementara sekaligus meningkatkan produksi anti-inflamasi sitokin interleukin-10 (IL-10) dan IL-4.⁶⁶

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400 $\mu\text{L/kgBB}$ terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen PDGF pada tikus model luka eksisi.
2. Pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400 $\mu\text{L/kgBB}$ terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen IFN- γ 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 PDGF-AA, PDGF BB, PDGF AB dan PDGF DD 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 molekuler lain pada tikus model luka eksisi yang dipapar bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dian, dkk. 2018. Pengembangan Kondisi Hipoksia Produksi Gel dari Conditioned Medium Sel Punca Mesenkimal Asal Jaringan Lemak Sebagai Bahan Topikal Wound-Healing Penderita Diabetic Foot Ulcer (DFU). Published online 2018.
2. Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J.* 2016;13:5-15. doi:10.1111/iwj.12623
3. Purnama H, Ratnawulan S. *Raya Bandung-Sumedang Km 21 Jatinangor 45363 Telp.*
4. Tottoli EM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics.* 2020;12(8):1-30. doi:10.3390/pharmaceutics12080735
5. 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
6. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9). doi:10.3390/ijms18091852
7. Ryan. 2020. Pengaruh Pemberian Sekretom Selpuncamesenkimal Terhadap Ekspresi Vascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1) Pada Plasentamencit Bunting Model Lupus Induksiprista.
8. Tran C, Damaser MS. Stem cells as drug delivery methods: Application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;82:1-11. doi:10.1016/j.addr.2014.10.007
9. 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
10. Folestad E, Kunath A, Wågsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Mol Aspects Med.* 2018;62:1-11. doi:10.1016/j.mam.2018.01.005
11. Vaidyanathan L. Growth factors in wound healing ¶ a review. *Biomedical and Pharmacology Journal.* 2021;14(3):1469-1480. doi:10.13005/bpj/2249
12. Kesehatan J, Verdiana R, Ali H, Kadri H. *Ekspresi PDGF-B Dan SCUBE 1 Pada Arteri Karotis Mencit Yang Diligasi Dan Tidak Diligasi.* Vol 4.; 2015. <http://jurnal>.
13. Pdgf E, Epidermis DK, Penyembuhan P, Radiasi D, Sprague-Dawley T. *Pengaruh Pemberian Topikal Minyak Aloe Vera Terozonisasi Terhadap Effects of Ozonated Aloe Vera Oil Topical on the PDGF Expression and Epidermal Thickness in Radiation Dermatitis in Sprague Dawley.*
14. Kang YM, Hong CH, Kang SH, et al. Anti-photoaging effect of plant extract fermented with *Lactobacillus buchneri* on CCD-986sk fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *J Funct Biomater.* 2020;11(1). doi:10.3390/jfb11010003
15. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Dermatol Venereol.* Published online 2021:37-42. doi:10.1097/JD9.0000000000000068
16. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The role of $\text{tnf-}\alpha$ induced mscs on

- suppressive inflammation by increasing $\text{tgf-}\beta$ and il-10 . *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783. doi:10.3889/oamjms.2018.404
17. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5(2):65-78. doi:10.1089/wound.2014.0608
 18. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol*. 2018;9(MAY). doi:10.3389/fimmu.2018.00847
 19. Drago D, Cossetti C, Iraci N, et al. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*. 2013;95(12):2271-2285. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.020
 20. 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
 21. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):419-427. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002
 22. Oh JY, Ko JH, Lee HJ, et al. Mesenchymal stem/stromal cells inhibit the NLRP3 Inflammasome by Decreasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Stem Cells*. 2014;32(6):1553-1563. doi:10.1002/stem.1608
 23. 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
 24. Ayu D, Istiqomah F, Djannah D, Mulyani SP. *The Effect of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells on The Gene Expression of Transforming Growth Factors- β in Wistar Rats Excision Wound Model*. Vol 1.; 2022.
 25. Bartaula-Brevik S. Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *Int J Stem Cell Res Ther*. 2017;4(1). doi:10.23937/2469-570x/1410045
 26. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):605-628. doi:10.3390/ijms15010605
 27. Shiddiqi T, Arifin Adnan Z, Nurudhin Sub Bagian Reumatologi A, Ilmu Penyakit Dalam B. *Pengaruh Secretome Sel Punca Mesenkimal Terhadap Ekspresi Interleukin -1 β Dan Caspase-1 The Effect Of Mesenchymal Stem Cell Secretome Toward Interleukin-1 β Anda Caspase-1 Expression*. Vol 9.; 2017.
 28. 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.
 29. 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
 30. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):605-628. doi:10.3390/ijms15010605

31. 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
32. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association.* 2018;81(2):94-101. doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002
33. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. Published online 2019. doi:10.1016/j.isci
34. Ghaneialvar H, Soltani L, Rahmani HR, Lotfi AS, Soleimani M. Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2018;33(1):46-52. doi:10.1007/s12291-017-0641-x
35. Chu DT, Phuong TNT, Tien NLB, et al. Adipose tissue stem cells for therapy: An update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. *J Clin Med.* 2019;8(7). doi:10.3390/jcm8070917
36. Abderrahmani A, Yengo L, Caiazzo R, et al. *Liver Overexpression of PDGF-AA Impairs Insulin Signaling in Diabetes.*
37. Thompson AI, Conroy KP, Henderson NC. Hepatic stellate cells: Central modulators of hepatic carcinogenesis. *BMC Gastroenterol.* 2015;15(1). doi:10.1186/s12876-015-0291-5
38. Nagano K, Bornhauser BC, Warnasuriya G, et al. PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *EMBO Journal.* 2006;25(9):1871-1882. doi:10.1038/sj.emboj.7601059
39. Liu Q, Zhou Y, Li Z. PDGF-BB promotes the differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells through the Src/JAK2 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2018;18(4):3719-3726. doi:10.3892/mmr.2018.9351
40. Zhou L, Shao CY, Xie YJ, et al. Gab1 mediates PDGF signaling and is essential to oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *Elife.* 2020;9. doi:10.7554/eLife.52056
41. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: A short overview of certain bioactive components. *Open Medicine (Poland).* 2016;11(1):242-247. doi:10.1515/med-2016-0048
42. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: A short overview of certain bioactive components. *Open Medicine (Poland).* 2016;11(1):242-247. doi:10.1515/med-2016-0048
43. Jackson CJ, Tønseth KA, Uthaim TP. Cultured epidermal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1). doi:10.1186/s13287-017-0587-1
44. Rima. 2022. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor Terhadap Ekspresi Gen PDGF dan Alpha SMA.
45. Bhat MY, Solanki HS, Advani J, et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J Cell Commun Signal.* 2018;12(4):745-751. doi:10.1007/s12079-018-0486-y
46. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189. doi:10.1189/jlb.0603252
47. Bhat MY, Solanki HS, Advani J, et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J Cell Commun Signal.* 2018;12(4):745-751.

- doi:10.1007/s12079-018-0486-y
48. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*.
 49. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(3):e264-e277. doi:10.18295/squmj.2018.18.03.002
 50. Ogbonnaya Eleazu C, Chinedum Eleazu K, Chukwuma S, Essien UN. *Review of the Mechanism of Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, Its Practical Use and Potential Risk to Humans*.; 2013. <http://www.jdmdonline.com/content/12/1/60>
 51. Joseph A, Baiju I, Bhat IA, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. *J Cell Physiol*. 2020;235(7-8):5555-5569. doi:10.1002/jcp.29486
 52. Kesehatan J, Verdiana R, Ali H, Kadri H. *Ekspresi PDGF-B Dan SCUBE 1 Pada Arteri Karotis Mencit Yang Diligasi Dan Tidak Diligasi*. Vol 4.; 2015. <http://jurnal>.
 53. 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
 54. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02837
 55. 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
 56. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02837
 57. Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules*. 2020;10(7):1-15. doi:10.3390/biom10071017
 58. 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
 59. 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)*.
 60. 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
 61. 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
 62. 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

63. 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
64. 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
65. 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.
66. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(2):142-149. doi:10.5966/sctm.2011-0018
67. 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
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. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: Strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells Int*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/342968
70. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(2):142-149. doi:10.5966/sctm.2011-0018
71. 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

