

**PENGARUH PEMBERIAN GEL SECRETOM
HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL
TERHADAP EKSPRESI GEN α -SMA DAN DENSITAS
KOLAGEN**

**(Studi eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Model Infeksi Kulit
Superfisial yang diinduksi Bakteri *Staphylococcus aureus*)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:
Windi Sawitri
MBK 2118010270

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

TESIS

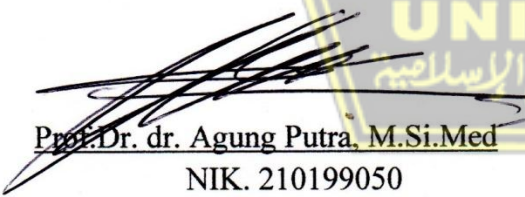
**PENGARUH PEMBERIAN GEL SECRETOM HYPOXIA
MESENCHYMAL STEM CELL TERHADAP EKSPRESI GEN α -SMA
DAN DENSITAS KOLAGEN**
(Studi eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Model Infeksi Kulit
Superfisial yang diinduksi Bakteri *Staphylococcus aureus*)

Disusun oleh
Windi Sawitri
(MBK 2118010270)

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,

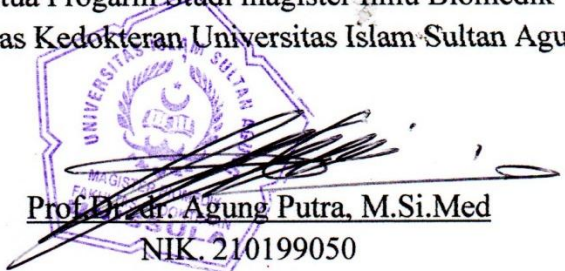

Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med

NIK. 210199050


Dr. dr. Chodidjah, M.Kes

NIK. 220186023

Mengetahui,
Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

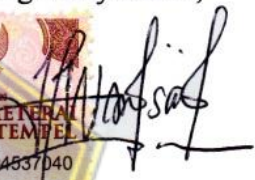

Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med

NIK. 210199050

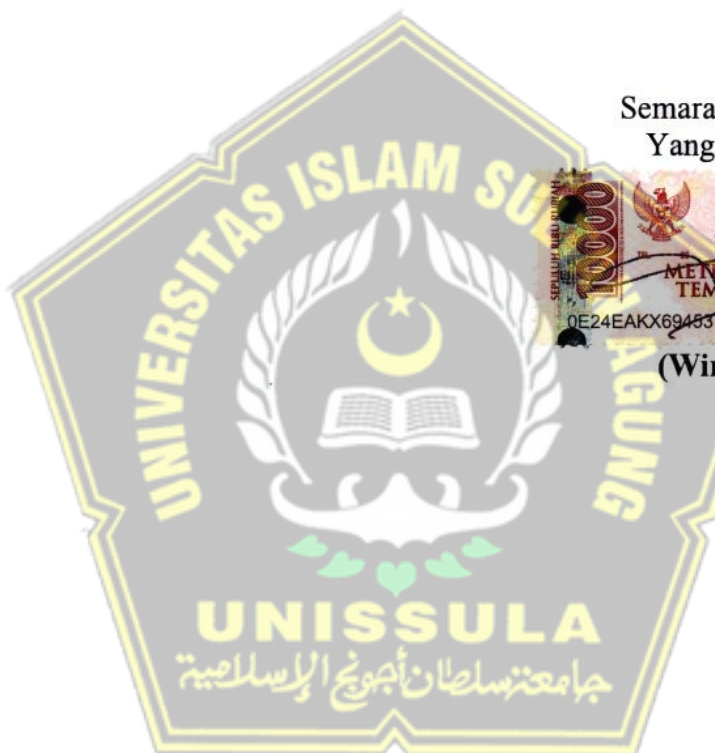
PERNYATAAN

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

Semarang, Maret 2023
Yang menyatakan,



(Windi Sawitri)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Windi Sawitri
Tempat, tanggal lahir : Tanjung Karang, 25 Agustus 1981
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Percobaan 2 Yogyakarta – SDN purworejo 1 : lulus tahun 1994
2. SLTP N 1 Purworejo: lulus tahun 1997
3. SMUN 1 Purworejo: lulus tahun 2000
4. FK Universitas Sebelas Maret Surakarta: lulus tahun 2007
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA: 2021 – sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2008 - 2011 : RSB Permata Bunda Jogjakarta
2. Tahun 2011-Sekarang: Praktek Dokter Umum

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Dr. Sri Wuryanto SpA
Ibu : Hartati
2. Nama Suami : Dr. Hanantya Henry Setyabudi SpOG (K)
3. Nama Anak : 1. Rakhaditya Darrel Ellanar
2. Rainaditya Deianeira Ellansa
3. Relienaditya Deleyna Ellanda

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis penulis yang berjudul, **“Pengaruh Pemberian Gel Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell Terhadap Ekspresi Gen α -SMA dan Densitas Kolagen (Studi eksperimental In Vivo pada Tikus Galur Wistar Model Infeksi Kulit Superfisial yang diinduksi Bakteri Staphylococcus aureus)”** ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc.Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
4. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.

5. Dr. Atina Hussana Msi Apt selaku penguji I, Dr. dr. Hadi Sarosa Mkes selaku penguji II dan Dr. dr. Djoko Wahyu Wibowo Mkes selaku penguji III yang telah berkenan menguji dan memberikan saran kritik membangun dalam penyusunan thesis ini
6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
7. Suami dan anak-anak kebanggaan mama : Darrel, Deianeira dan Deleya terimakasih dukungan dan pengertiannya.
8. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran Unisula : Mba Dina, mas Ariq, mas Iffan, mas Hussen terimakasih atas bantuan dan bimbingannya.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, April 2023

(Windi Sawitri)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
ABSTRAK.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Teoritis	4
1.4.2. Praktis.....	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>	9
2.1.1. Definisi.....	9
2.1.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler α -SMA dalam Sintesis Kolagen	9
2.2. Kolagen.....	11
2.2.1. Definisi.....	11

2.2.2.	Perubahan pada kolagen.....	14
2.2.3.	Mekanisme kerusakan kolagen	15
2.2.4.	Sintesis Kolagen.....	16
2.2.5.	Sintesis Prokolagen	16
2.3.	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	19
2.3.1.	Definisi.....	19
2.3.2.	Sumber MSCs	20
2.3.3.	Karakteristik MSCs.....	20
2.3.4.	Peran MSCs.....	21
2.4.	Hipoksia.....	22
2.5.	Sekretom <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	22
2.6.	Luka Infeksi Superfisial	23
2.7.	Sediaan Gel.....	27
2.8.	Farmakinetik Obat Topikal.....	31
2.8.1.	Jalur Penetrasi Sediaan Topikal	31
2.8.2.	Absorpsi Sediaan Topikal Secara Umum	32
2.9.	Efek Sekretom Hipoksia <i>Mesenchymal Stem Cells</i> Terhadap α -SMA dan kolagen	33
BAB III	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	35
3.1.	Kerangka Teori.....	35
3.2.	Kerangka Konsep	37
3.3.	Hipotesis	38
BAB IV	METODE PENELITIAN	39
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	39
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	40
4.2.1.	Variabel Penelitian	40
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	40
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	42
4.3.1.	Subjek Penelitian.....	42
4.3.2.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	43
4.3.3.	Besar Sampel.....	43

4.4.	Alat dan Bahan	44
4.4.1.	Alat.....	44
4.4.2.	Bahan.....	44
4.5.	Cara Penelitian.....	45
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	45
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> .	45
4.5.3.	Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	46
4.5.4.	Proses Hipoksia dan TFF	47
4.5.5.	Pembuatan Sediaan Gel.....	48
4.5.6.	Pembuatan Model Luka Superfisial dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	48
4.5.7.	Terminasi dan pengambilan jaringan	51
4.5.8.	Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	52
4.5.9.	Pembacaan α -SMA dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	54
4.5.10.	Pembuatan Blok Parafin.....	55
4.5.11.	Analisis Jumlah Densitas Kolagen.....	55
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	56
4.6.1.	Tempat Penelitian.....	56
4.6.2.	Waktu Penelitian.....	56
4.6.	Analisa Data	56
4.7.	Alur Penelitian.....	58
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		59
5.1.	Hasil Penelitian.....	59
5.1.1.	Isolasi Sekretom Hipoksia <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	59
5.1.2.	Validasi model luka infeksi superfisial	62
5.1.3.	Efek pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dan 20% terhadap ekspresi gen α -SMA	64
5.1.4.	Efek pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dan 20% terhadap densitas kolagen	66

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	69
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	73
6.1. Kesimpulan.....	73
6.2. Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA	74



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECM	: <i>Extra Celullar Matrix</i>
EDA-FN	: <i>Extra-domain A containing fibronectin</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IKB	: <i>I Kappa Beta</i>
IKK	: <i>IkB kinase</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LAP	: <i>Latency associated peptide</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>

MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCS	: <i>Mesenchymal stem cell v</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Aktivasi α -SMA yang diregulasi oleh sitokin TGF- β^{28}	11
Gambar 2.2.	Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah Kolagen pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua ³⁷	12
Gambar 2.3.	<i>Sintesis Kolagen</i> ⁴⁶	18
Gambar 2.4.	<i>Procollagen</i> ⁴⁶	19
Gambar 2.5.	Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSCs) ⁵⁰	20
Gambar 2.6.	Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁵³	21
Gambar 2.7.	Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS ⁵⁷	22
Gambar 2.8.	Target molekuler menginduksi penutupan luka pada luka infeksi ⁶⁷	25
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	37
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	37
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian	39
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	58
Gambar 5.1.	Isolasi MSCs dengan sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.	60
Gambar 5.2.	Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31	61
Gambar 5.3.	(A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan <i>alizarin red</i> dan <i>oil red</i> pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah putih).	61
Gambar 5.4.	Morfologi MSCs sebelum dan setelah kondisi hipoksia.....	62
Gambar 5.5.	Validasi luka infeksi superfisial dengan pewarnaan HE dan pewarnaan gram. Panah hitam menunjukan infeksi bakteri gram positif	63
Gambar 5.6.	Grafik ekspresi gen α -SMA Pada Seluruh Kelompok Penelitian.....	65

Gambar 5.7. (A) Hasil pewarnaan kolagen dengan masson trichome. (B)
Grafik densitas kolagen pada seluruh kelompok penelitian.....68



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4.1.	Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i>	47
Tabel 4.2.	Komponen PCR Mix α -SMA.....	54
Tabel 5.1.	Data hasil Penelitian Ekspresi Gen α -SMA dan Kolagen Tipe 1	64
Tabel 5.2.	Uji <i>Post Hoc Tamhane</i> ekspresi gen α -SMA pada Masing-masing Kelompok.....	66
Tabel 5.3.	Uji <i>Mann-Whitney</i> densitas kolagen pada Masing-masing Kelompok.....	68



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Data Penelitian	85
Lampiran 2.	Foto Kegiatan Penelitian	89
Lampiran 3.	<i>Etichal Clereance</i>	91



ABSTRAK

Latar belakang: Luka infeksi superfisial menyebabkan *delay remodelling* akibat penekanan ekspresi gen *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) sehingga menghambat sintesis kolagen. Secretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) mengandung berbagai sitokin dan *growth factor* yang berperan dalam percepatan penyembuhan luka dan penekanan infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel SH-MSCs terhadap ekspresi gen α -SMA dan densitas kolagen pada jaringan kulit tikus yang mengalami luka infeksi superfisial.

Metode: Desain penelitian ini adalah posttest only control grup dengan metode rancang acak lengkap. Sample yang diteliti 24 ekor tikus yang mengalami luka infeksi superfisial akibat induksi bakteri *Staphylococcus aureus* 5×10^7 CFU/mL sebanyak 100 μ l. Penelitian ini dilakukan empat kelompok yaitu kelompok sehat (K1), kelompok kontrol negatif (K2), perlakuan 1 (P1) dengan gel SH-MSCs dosis 10% dan perlakuan 2 (P2) dengan gel SH-MSCs dosis 20%. Ekspresi gen α -SMA dianalisis menggunakan qRT-PCR dan densitas kolagen dianalisis dengan pewarnaan trichome masson.

Hasil: Analisis qRT-PCR menunjukkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi gen α -SMA dikelompok P2 yang tertinggi ($10,03 \pm 3,78$), kemudian di ikuti oleh rerata ekspresi gen α -SMA kelompok P1 ($4,96 \pm 2,77$). Rasio terendah pada kelompok perlakuan kontrol negatif sebesar $0,46 \pm 0,09$. Analisis densitas kolagen juga terjadi peningkatan densitas kolagen dikelompok P2 ($35,68 \pm 5,28$) yang tertinggi, kemudian di ikuti oleh rerata densitas kolagen kelompok P1 ($34,78 \pm 1,72$). Data densitas kolagen terendah yaitu pada kelompok kontrol negatif sebesar $17,39 \pm 2,47$.

Kesimpulan: Pemberian gel SH-MSCs dapat meningkatkan ekspresi gen α -SMA dan densitas kolagen pada tikus model luka infeksi superfisial.

Kata kunci : Luka infeksi superfisial, *staphylococcus aureus*, α -SMA, densitas kolagen, secretom MSCs

ABSTRACT

Background: Superficial wound infections lead to delayed remodeling due to the suppression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) gene expression, thus inhibiting collagen synthesis. Secretome from hypoxia mesenchymal stem cells (SH-MSCs) contains various cytokines and growth factors that play a role in accelerating wound healing and suppressing infections. This study aims to determine the influence of SH-MSCs gel administration on the α -SMA gene expression and collagen density in the skin tissue of rats with superficial wound infections.

Method: The research design was a posttest-only control group with a complete randomized design. The study sample comprised 24 rats with superficial wound infections induced by *Staphylococcus aureus* bacteria at a concentration of 5×10^7 CFU/mL in 100 μ L. The study included four groups: healthy group (K1), negative control group (K2), treatment 1 (P1) with 10% dose of SH-MSCs gel, and treatment 2 (P2) with 20% dose of SH-MSCs gel. The α -SMA gene expression was analyzed using qRT-PCR, and collagen density was analyzed using Masson's trichrome staining.

Results: qRT-PCR analysis showed increased α -SMA gene expression in the P2 group, which was the highest (10.03 ± 3.78), followed by the mean α -SMA gene expression in the P1 group (4.96 ± 2.77). The lowest ratio was observed in the negative control treatment group, at 0.46 ± 0.09 . Collagen density analysis also revealed increased collagen density in the P2 group (35.68 ± 5.28), which was the highest, followed by the mean collagen density in the P1 group (34.78 ± 1.72). The lowest collagen density data was observed in the negative control group, at 17.39 ± 2.47 .

Conclusion: Administration of SH-MSCs gel can increase α -SMA gene expression and collagen density in a rat model of superficial wound infection.

Keywords: Superficial wound infection, *Staphylococcus aureus*, α -SMA, collagen density, MSCs secretome

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka infeksi superfisial (LIS) merupakan infeksi yang muncul di permukaan kulit dan dapat disebabkan oleh berbagai faktor eksternal, seperti virus, bakteri, jamur, atau parasite.¹ LIS paling umum disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus*. Luka sayatan, goresan, atau gigitan dapat memungkinkan bakteri tersebut masuk ke area luka dan menyebabkan LIS.²

LIS dikaitkan erat dengan respon inflamasi berlebih, yang ditandai dengan aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) dan hambatan proses penutupan luka akibat supresi kolagen.^{3,4} Penelitian Grande *et al* melaporkan aktivasi NF- κ B akibat infeksi bakteri menghambat sintesis kolagen sebagai respon terhadap inflamasi berlebih melalui penurunan regulasi *alfa smooth muscle actin* (α -SMA).⁵ Infeksi bakteri juga menghambat penutupan luka melalui inaktivasi jalur *transforming growth factor beta* (TGF- β) dan mencegah pembentukan α -SMA.⁶

LIS merupakan suatu keadaan yang sampai saat ini belum ada obatnya, beberapa terapi standart LIS seperti pemberian antibiotik dan kortikosteroid menimbulkan efek samping seperti iritasi dan resistensi⁷. Oleh karena itu, pendekatan terapi yang aman dan efektif diperlukan untuk pengobatan LIS, salah satunya menggunakan *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).

Prevalensi LIS yaitu 24,6 pasien per 1000 pasien pertahun. Duapuluh persen diantaranya disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* ⁸. Satu koma enam persen kasus LIS di Amerika Serikat membutuhkan rawat inap pada tahun 2012 ⁹. Peningkatan kasus LIS hingga dua kali lipat yang disebabkan infeksi *Staphylococcus aureus*, 48% diantaranya mengalami resistensi ¹⁰. *Japanese Healthcare Associated Infections Surveillance* melaporkan 3,5% kasus LIS akibat *Staphylococcus aureus*, kasus meningkat hingga 6,5% pasca operasi ². Berbagai penelitian tersebut menunjukkan dibutuhkan terapi alternatif untuk pengobatan LIS.

Studi preklinis menunjukkan bahwa SH-MSCs mengandung berbagai sitokin anti-inflamasi, seperti *interleukin-10* (IL-10), *transforming growth factor* (TGF- β)¹¹ yang dapat memicu efek anti-inflamasi dan menginduksi produksi kolagen ¹². SH-MSCs adalah medium kultur *mesenchymal stem cells* (MSCs) yang dikondisikan hipoksia dan telah melalui proses filtrasi menggunakan teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF)¹¹. Peran *conditioned media* atau *secretome* MSC dengan IL-10 dan TGF- β yang tinggi dapat menghambat respon inflamasi yang berlebih akibat infeksi pada LIS ¹³. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa IL-10 dapat menghambat proses inflamasi melalui penahanan aktivasi NF- κ B ¹⁴. TGF- β berperan dalam menginduksi α -SMA sehingga fibroblast berubah menjadi myofibroblast ^{15,16}. Myofibroblast yang terbentuk menginduksi pembentukan kolagen yang berperan penting dalam proses penyembuhan dan penutupan luka ¹⁷⁻¹⁹.

Berbagai penelitian melaporkan bahwa secretome MSCs mampu menekan sekresi sitokin pro-inflamasi²⁰. Pemberian secretome MSCs dosis 200µl dan 400µl dapat menghambat respon inflamasi melalui peningkatan sitokin anti-inflamasi interleukin-10 (IL-10) pada *wound healing*²¹. Pemberian secretome MSCs 100 µl dapat menginduksi percepatan penutupan luka pada tikus model luka eksisi dengan menginduksi ekspresi α -SMA dan sintesis kolagen²². Namun, pemberian krim SH-MSCs terhadap ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen pada tikus model luka infeksi superfisial masih sedikit penelitiannya. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen pada tikus galur wistar model luka infeksi superfisial.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian diatas, rumusan masalah pada padalah "Apakah terdapat pengaruh pemberian secretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen α -SMA dan densitas kolagen pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen α -SMA dan densitas kolagen pada tikus model luka infeksi superfisial.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain untuk :

1. Membuktikan pengaruh SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel terhadap peningkatan ekspresi gen α -SMA antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.
2. Membuktikan pengaruh SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel terhadap peningkatan jumlah kolagen antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen pada perbaikan luka infeksi superfisial.

1.4.2. Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan SH-MSCs dalam memperbaiki luka infeksi superfisial pada jaringan kulit.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Maryam Mirshekari, Hamed Afkhami, Shabnam Razavi, Faramarz, Masjedian Jazi, Davood Darban, Elnaz Ohadi, Majid Mottaghi Nezhad, Roya Karimi ²³	<i>Potential antibacterial activity and healing effect of topical administration of bone marrow and adipose mesenchymal stem cells encapsulated in collagen-fibrin hydrogel scaffold on 3rd degree burn wound infection caused by Pseudomonas aeruginosa</i>	Eksperimental <i>in vitro</i>	<i>Bone marrow MSCs dan adipose MSCs</i> menurunkan infeksi hingga 54 CFU/gr dan menginduksi <i>collagen-fibrin</i> hingga 80% pada <i>wound healing</i> .
Ji Hyun Kim, Denethia S Green, Young Min Ju, Mollie Harrison, J William Vaughan, Anthony Atala, Sang Jin Lee, John D Jackson, Cory Nykiforuk, James J Yoo ²⁴	<i>Identification and characterization of stem cell secretome-based recombinant proteins for wound healing applications</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Secretom mengekspresikan ANG-1, FGF-7, Follistatin, HGF, IL-6, Insulin, TGFβ-1, uPAR, dan VEGF yang secara signifikan mempercepat migrasi dan penutupan luka
Brysa M Silveira, Tiago O Ribeiro, Railane S Freitas, Ana C. O. Carreira, Marilda Souza Goncalves, Mari Sogayar, Roberto Meyer, Alexander Birbrair, Vitor Fortuna ^{25,26}	<i>Secretome from human adipose-derived mesenchymal stem cells promotes blood vessel formation and pericyte coverage in experimental skin repair</i>	Eksperimental <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Normoxia dan hypoxia prekondisi medium mempercepat penutupan luka dengan meningkatkan ekspresi NG2 dan nestin di area luka.
Young Hyeon An, Dae Hyun Kim, Eun Jung Lee, Dabin Lee, Mihun Jeong, Park, Junghyeon Ko, Dong Wook Kim, Jiwan Koh, Hyun	<i>High-Efficient Production of Adipose-Derived Stem Cell (ADSC) Secretome Through Maturation Process and Its Non-scarring Wound Healing Applications</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Pemberian secretom ADSC menginduksi penutupan luka melalui aktifitas angiogenik, dan epitelisasi

Sook Hong, Youngsook Son, Je-Yoel Cho, Ji- Ung Park, Sun- Dong Kim, Nathaniel S Hwang ²⁶			
Song JY, Kang HJ, Ju HM, Park A, Park H, Hong JS, Kim CJ, Shim JY, Yu J, Choi ⁷	<i>Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts ameliorate atopic dermatitis in mice by reducing the T cell responses</i>	Eksperimental <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Ekstrak dari UC- MSC menurunkan sitokin inflamasi (IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-5 and TNF- α), iNOS and NF- κ B, dan meningkatkan sitokin anti- inflamasi IL-10 dan TGF- β 1. Ekstrak dari UC- MSC memperbaiki kondisi DA berdasarkan skor klinis pada <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af)- <i>induced AD rats</i>
Hadi S, Setyo T, Agung P, Nur AC, Arya T, Chodijah C ²⁷	<i>The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Secretom hipoksia MSCs pada dosis 200uL dan 400uL mempercepat penutupan luka eksisi dengan meningkatkan ekspresi gen VEGF dan sintesis kolagen

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pemberian *bone marrow MSCs* dan *adipose MSCs* dapat menurunkan infeksi hingga 54 CFU/gr dan menginduksi *collagen-fibrin* hingga 80% pada *wound healing*²³. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSCs akan ditreatment pada tikus luka infeksi superfisial yang diinduksi

Staphylococcus aureus dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa secretom mengekspresikan ANG-1, FGF-7, Follistatin, HGF, IL-6, Insulin, TGF β -1, uPAR, dan VEGF yang secara signifikan mempercepat migrasi dan penutupan luka²⁴. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSCs akan ditreatment pada tikus luka infeksi superfisial yang diinduksi *Staphylococcus aureus* dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen¹. Penelitian terdahulu melaporkan normoxia dan hypoxia prekondisi medium mempercepat penutupan luka dengan meningkatkan ekspresi NG2 dan nestin diarea luka²⁵. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSCs akan ditreatment pada tikus luka infeksi superfisial yang diinduksi *Staphylococcus aureus* dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen. Penelitian terdahulu melaporkan pemberian secretom ADSC menginduksi penutupan luka melalui aktifitas angiogenik, dan epitelisasi. Penelitian terdahulu juga melaporkan ekstrak dari UC-MSC menurunkan sitokin inflamasi (IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-5 and TNF- α), iNOS and NF- κ B, dan meningkatkan sitokin anti-inflamasi IL-10 dan TGF- β 1²⁶. Ekstrak dari UC-MSC memperbaiki kondisi DA berdasarkan skor klinis pada *Aspergillus fumigatus* (Af)-induced AD rats. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSCs akan ditreatment pada tikus luka infeksi superfisial yang diinduksi *Staphylococcus aureus* dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa Secretom hipoksia MSCs

pada dosis 200uL dan 400uL mempercepat penutupan luka eksisi dengan meningkatkan ekspresi gen VEGF dan sintesis kolagen.²⁷ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSCs akan ditreatment pada tikus luka infeksi superfisial yang diinduksi *Staphylococcus aureus* dan dianalisis ekspresi gen α -SMA dan jumlah kolagen.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Alpha-Smooth Muscle Actin*

2.1.1. Definisi

Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) adalah isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis dengan berat molekul 42 kDa. α -SMA diekspresikan oleh *myofibroblast* dan ekspresi α -SMA berkorelasi dengan aktivasi *myofibroblast* ²⁸. *Myofibroblast* merupakan bentuk sel fibroblas yang telah berdiferensiasi sebagian menuju fenotipe *smooth-muscle* termasuk ke dalam fibroblas metabolik, dan memiliki morfologis yang khas. *Myofibroblast* yang teraktivasi akan berhenti berproliferasi dan memulai proses sintesis komponen protein *extracellular matrix* (ECM), termasuk kolagen dalam jumlah yang banyak ¹⁷. α -SMA yang diekspresikan oleh *myofibroblast* merupakan sumber utama kolagen fibrillar, yaitu kolagen tipe I, II, III, V, dan XI yang sangat penting untuk *tensile strength* dan *mechanical properties* kulit, sehingga mempercepat penutupan luka ^{29,30}.

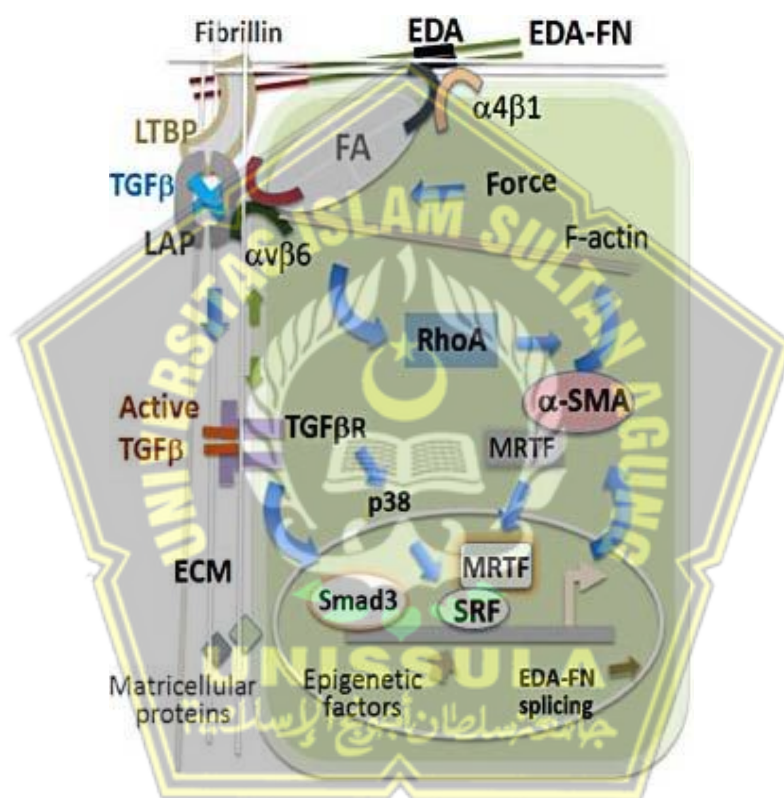
2.1.2. Aktivasi dan Mekanisme Seluler α -SMA dalam Sintesis Kolagen

Luka dapat mengubah regulasi homeostasis kolagen oleh fibroblast sehingga tidak adanya keseimbangan antara sintesis dan

degradasi kolagen. Kolagen merupakan ECM paling penting di dermis kulit, sehingga hilangnya kolagen secara langsung dapat menyebabkan kulit kendur, menua, dan menurunnya elastisitas. Adanya luka terbuka dapat menginduksi penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan menyebabkan kerusakan ireversibel dengan perubahan fungsi sel ³¹. Interaksi serat kolagen, fibroblast mengekspresikan reseptor adhesi permukaan sel yang mempromosikan hubungan antara molekul adhesi ekstraseluler, seperti fibronectin, dan protein sitoskeletal intraseluler, seperti α -SMA. α -SMA adalah *stress fibers* yang terlibat dalam aktivitas kontraktil fibroblas dan reorganisasi kolagen⁹.

Myofibroblast yang mengekspresikan α -SMA diregulasi oleh sitokin *transforming growth factor beta* (TGF- β). TGF- β 1 yang diaktifkan akan berikatan dengan kompleks TGF- β *receptor* (TGF- β R) yang mentransmisikan sinyal intraseluler yang mendorong produksi α -SMA. Transduksi mekanis ekstraseluler matriks melalui jalur *focal adhesion* (FA) akan menginduksi produksi *stress fibers* α -SMA.^{16,32} Selain itu, TGF- β 1 juga mengaktifkan *extra-domain A containing fibronectin* (EDA-FN) dalam ECM dapat mengubah konformasi *latency associated peptide* (LAP) melalui interaksi integrin.^{33,34} Hal tersebut menyebabkan perakitan G-aktin (monomer α -SMA) menjadi F-aktin (*stress fibers*) memungkinkan keluarnya *myocardin-related transcription factor* (MRTF) dari sekuestrasi G-

aktin di sitosol dan translokasi nuklirnya serta aktivasi *serum response factor* (SRF), yang pada gilirannya menyebarkan α -SMA dan produksi *stress fibers* (Gambar 2.1). Produksi α -SMA yang meningkat menyebabkan terjadinya sintesis kolagen dan dapat memodulasi remodeling kolagen.



Gambar 2.1. Aktivasi α -SMA yang diregulasi oleh sitokin TGF- β ²⁸

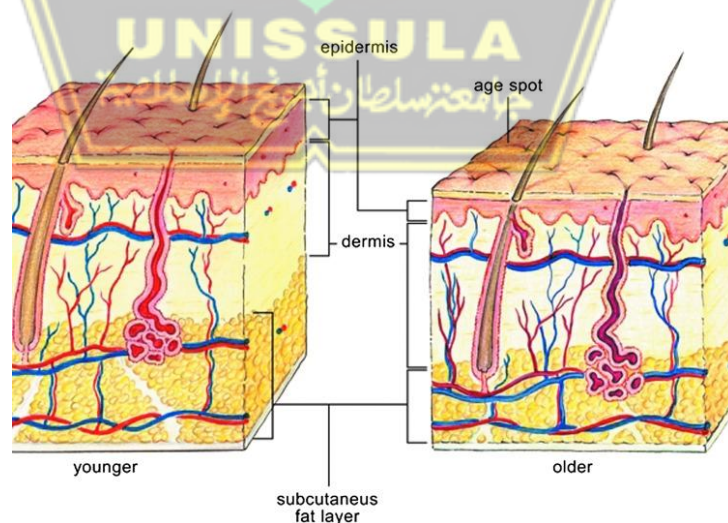
2.2. Kolagen

2.2.1. Definisi

Kolagen Merupakan protein (polipeptida) ekstraseluler utama dalam tubuh manusia yang ditemukan pada hampir semua organ tubuh. Sampai saat ini sudah ditemukan sebanyak 21 tipe kolagen,

jumlah dan jenisnya berbeda-beda pada berbagai organ tubuh manusia³⁵.

Kolagen-1 merupakan jenis serabut kolagen terbanyak yang dijumpai dalam tubuh manusia seperti pada tendon, tulang, kulit. Serabut kolagen-1 berperan penting dalam pembentukan jaringan parut. Kolagen-2, kolagen-9, kolagen-10, kolagen-11 ditemukan pada kartilago. Kolagen-3 banyak dijumpai pada kulit, dinding pembuluh darah, pada jaringan yang ada serabut retikuler, seperti pada jaringan yang mengalami pertumbuhan cepat terutama pada tahap awal penyembuhan luka. Kolagen-3 penyebarannya hampir sama dengan kolagen-1. Sedangkan kolagen-7 kebanyakan lokasinya terletak pada *anchoring fibril* di *dermal epidermal junction* pada kulit, mukosa dan servik. Kolagen-7 juga banyak terdapat pada dinding pembuluh darah³⁶.



Gambar 2.2. Perbedaan Kolagen Pada Kulit Muda dan Kulit Tua. Jumlah Kolagen pada kulit yang lebih muda lebih banyak dibandingkan kulit yang lebih tua³⁷.

Tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen-1 dan kolagen-3 yang berfungsi pada pertahanan mekanik. Akan tetapi tipe kolagen lain yang juga ada pada kulit, seperti kolagen-5, kolagen-6, kolagen-7, kolagen-12 ditemukan dalam jumlah minimal yang diperkirakan ikut menunjang, akan tetapi peran yang pasti belum jelas ³⁵. Karena kolagen-1 yang mendominasi organ kulit, maka kolagen-1 yang akan diukur pada penelitian kali ini.

Jumlah kolagen pada umumnya akan berkurang pada kondisi luka. Pada luka rasio kolagen tipe 1 dan 3 akan mengalami ketidakseimbangan, yaitu penurunan kolagen-3 dan peningkatan kolagen-1. Kolagen-1 terus meningkat sampai terjadi proses penutupan luka, saat kulit mencapai puncak kekuatan mekanik, setelah itu kolagen-1 akan menurun dan digantikan dengan peningkatan kolagen tipe 3.³⁶ Hal ini sebabkan kolagen tipe 3 adalah kolagen immature yang mendominasi ketika proses inflamasi sudah selesai saat luka. Sehingga pada fase awal penyembuhan luka terjadi penurunan kadar kolagen tipe 3.

Kolagen merupakan serat utama pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein yang berfungsi untuk kekuatan mekanik dan penyangga kulit. Walaupun kolagen-1 merupakan kolagen utama pada lapisan dermis kulit akan tetapi kolagen tipe lain juga tidak kalah perannya. Kolagen-7 yang terbanyak pada *anchoring fibril* terletak pada membrana basalis yang melekatkan

membrana basalis ke papila dermis. Pada pasien dengan luka terbuka akan menurunkan jumlah kolagen-7 dan akan mengakibatkan perlekatan antara membrana basalis dengan papilla dermis menurun sehingga ikatan epidermis dan dermis menjadi lemah. Pada satu penelitian didapatkan bahwa luka kulit terbentuk akibat lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis oleh karena degenerasi *anchoring fibril*. Hal ini ditambah adanya bukti adanya penurunan kolagen pada luka³⁸.

2.2.2. Perubahan pada kolagen

Produksi dan pembentukan kolagen dapat terganggu pada kondisi infeksi luka. Infeksi menyebabkan aktivasi sistem imun dan peningkatan produksi zat-zat yang mempengaruhi proses penyembuhan luka, seperti cytokine dan enzim proteolitik. Cytokine menyebabkan peningkatan aktivitas sel-sel imun dan menurunkan produksi kolagen. Enzim proteolitik menghancurkan matriks ekstraseluler dan kolagen yang sudah ada. Hasilnya adalah produksi kolagen yang terganggu dan proses penyembuhan luka yang melambat. Kondisi ini dapat menyebabkan luka yang sulit sembuh dan berkembang menjadi infeksi yang lebih serius. Oleh karena itu, penting untuk mengatasi infeksi luka secepat mungkin untuk mempercepat proses penyembuhan dan meminimalkan kerusakan jaringan^{39,40}.

2.2.3. Mekanisme kerusakan kolagen

Kolagen adalah protein utama yang membentuk jaringan ikat dan merupakan bagian penting dari proses penyembuhan luka. Kerusakan kolagen akibat luka dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka dan menyebabkan komplikasi seperti keloid, hipertrofi jaringan parut, dan jaringan parut yang tidak teratur. Patofisiologi kerusakan kolagen akibat luka terjadi saat jaringan ikat rusak dan sel-sel yang memproduksi kolagen mati. Hal ini memicu respons inflamasi, setelah fase inflamasi selesai akan terjadi respon peningkatan jumlah sel-sel fibroblast, yang memproduksi kolagen untuk memulihkan jaringan ikat yang rusak. Sel fibroblast adalah komponen utama dalam tubuh untuk memproduksi kolagen. Namun, peningkatan produksi kolagen yang tidak terkontrol dapat menyebabkan hipertrofi jaringan parut dan pembentukan jaringan parut yang tidak teratur³⁶.

Proses penyembuhan luka melibatkan tiga tahap utama: pembersihan, perbaikan, dan remodelasi. Pada tahap pembersihan, sel-sel imun menghilangkan jaringan mati dan membantu mencegah infeksi. Pada tahap perbaikan, sel-sel fibroblast memproduksi kolagen baru dan memulihkan jaringan ikat yang rusak. Pada tahap remodelasi, kolagen baru diteruskan dan diorganisasi untuk membentuk jaringan ikat yang kuat dan stabil^{41,42}.

2.2.4. Sintesis Kolagen

Poliipeptida dibentuk di dalam ribosom dari retikulum endoplasma kasar yang disebut rantai prokolagen α , dimana terjalin dalam sistena retikulum endoplasma sehingga terbentuk *triple helices*. Setiap asam amino ketiga pada rantai α disebut sebagai glisin; dua asam amino kecil lainnya terbanyak di dalam kolagen dihidroksilasi setelah proses translasi menjadi bentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin⁴³.

2.2.5. Sintesis Prokolagen

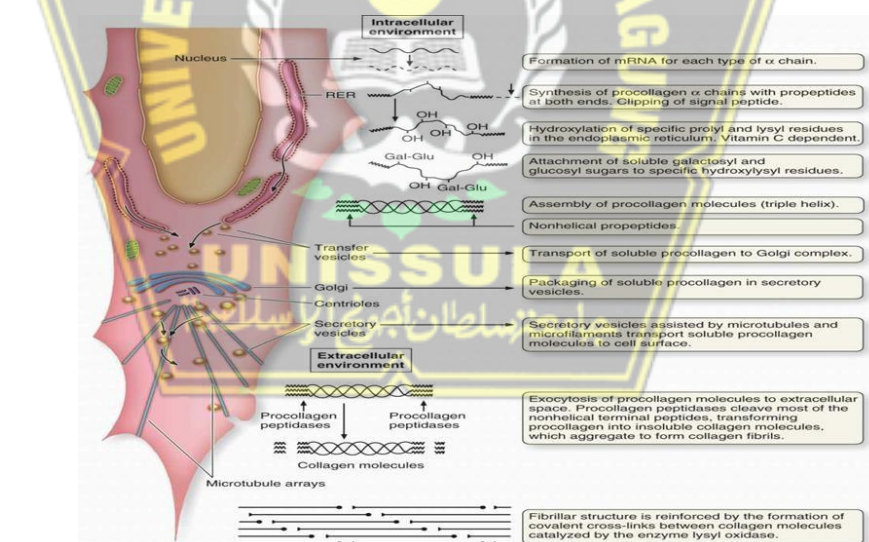
Bentuk *triple helix* dari rantai α berbetnuk molekul prokolagen seperti sebuah batang, dimana kolagen tipe 1 dan 2 berukuran panjang, 300nm dan lebar 1,5nm. Molekul prokolagen mungkin homotrimerik, dimana ketiga rantainya identik, atau heterotrimerik, dimana dua atau ketiga rantainya memiliki sekuen yang berbeda. Kombinasi dari banyak rantai prokolagen α sangat bertanggung jawab atas bermacam-macam tipe dari kolagen dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Pada kolagen tipe I, II, III, molekul kolagen bersatu dan menjadi berkelompok bersama-sama membentuk fibril⁴⁴.

Jumlah kolagen tipe I sangat banyak, maka didapatkan banyak penelitian tentang sintesis kolagen ini. Sintesis dari protein penting ini meliputi beberapa tingkat, dimana disimpulkan pada gambar 2.3⁴⁵.

1. lipetida rantai prokolagen α diproduksi pada ikatan poliribosom yang berikatan dengan membrane dari Retikulum Endoplasma yang kasar dan ditranslokasi di dalam sisterna dan dilanjutkan dengan sinyal peptide.
2. Hidroksilasi prolin dan lisin diawali sesudah rantai peptide telah mencapai panjang minimum tertentu dan masih terikat pada ribosom. Enzim yang menyertai adalah prolil hidroxilase dan lisil hidroxilase dan reaksi yang membutuhkan O_2 , Fe^{2+} dan asam askorbat (vitamin C) sebagai kofaktor.
3. Terjadi glikosilasi pada beberapa sisa hidroksilisin, dengan bermacam-macam tipe dari kolagen yang memiliki jumlah ikatan galaktosa-hidrosilisin yang berbeda-beda.
4. Gugus amino dan karboksil akhir dari setiap rantai α membentuk polipeptida non helix, kadang disebut propeptida ekstensi, dimana membantu rantai α (α_1 , α_2) membentuk dengan posisi yang benar menjadi *triplehelix*. Sebagai tambahan, propeptida nonhelix membuat molekul prokolagen soluble dan mencegah pembentukan intraseluler prematur dan pengendapan dari fibril kolagen. Prokolagen ditranspotasikan melalui jaringan golgi dan dieksositosis ke lingkungan ekstraselular.
5. Diluar sel, protease spesifik disebut peptidase prokolagen menyingkirkan perpanjangan propeptida, perubahan dari molekul prokolagen menjadi molekul kolagen. Sekarang ini sesuai untuk

pembentukan sendiri kedalam fibril kolagen polimerik, biasanya pada tempat tertentu dekat dengan permukaan sel.

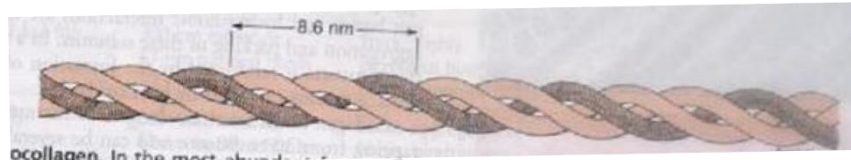
6. Pada beberapa tipe kolagen, *fibril* berkumpul membentuk *fiber*. Proteoglikan tertentu dan tipe kolagen (tipe V dan tipe XI) bergabung pada kumpulan molekul kolagen untuk membentuk *fibril-fibril* dan formasi *fiber* yang berasal dari *fibril* dan berikatan dengan struktur dari komponen-komponen ekstraselular matrik lainnya.
7. Struktur fibriler ditarik oleh formasi kovalen yang berikatan silang antara molekul-molekul kolagen, sebuah proses dikatalisis oleh enzim lisil oksidase.



Gambar 2.3. Sintesis Kolagen⁴⁶

Proses Hidrosilasi dan glikosilasi pada rantai α prokolagen dan pembentukan menjadi *triple helices* terjadi pada RER (*Rough Endoplasmic Reticulum*) dan pembentukan menjadi fibril terjadi pada *Extracellular Matrix* sesudah mengekskresikan prokolagen.

Karena ada sedikit perbedaan pada gen rantai α prokolagen dan produksi kolagen tergantung pada beberapa kejadian setelah translasi meliputi beberapa enzim lainnya, banyaknya penyakit kegagalan sintesa kolagen yang telah dijelaskan ⁴⁷.



Gambar 2.4. Procollagen ⁴⁶

Bentuk dari kolagen yang paling banyak, tipe 1, setiap molekul prokolagen terdiri dari dua rantai peptide yaitu $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. Massa 1 buah molecular kira-kira 100 kDa, terjalin helix pada sisi kanan dan bergabung bersama oleh interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Setiap putaran lengkap dari pilinan helix, dengan jarak 8,6 nm. Panjang setiap molekul tropokolagen adalah 300nm dan lebarnya 1,5 nm ⁴⁶.

2.3. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2.3.1. Definisi

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositi, dan neurosit. Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat ⁴⁸. Secara umum, MSCS diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada

permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenic⁴⁹.

2.3.2. Sumber MSCs

MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta⁴⁸.

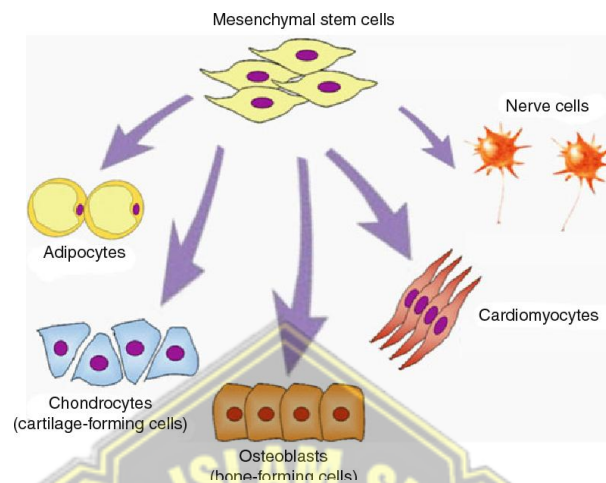


Gambar 2.5. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs)⁵⁰

2.3.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit⁵¹. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresikan beberapa sitokin baik

pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit⁵².



Gambar 2.6. Kemampuan diferensiasi dari MSCs⁵³

2.3.4. Peran MSCs

MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan secara *in vivo*. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi

selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengekspresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi^{54,55}.

2.4. Hipoksia

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 MSCs⁵⁶. Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs (Gambar 2.6).



Gambar 2.7. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS⁵⁷

2.5. Sekretom Mesenchymal Stem Cell

MSCs diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut sekretom, biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *growth factor* (GF), hormon, eksosom,

mikrovesikel, faktor antiinflamasi dll^{58,59}. Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel. Dalam hal regenerasi kulit, salah satu sitokin yang bertanggung jawab yaitu TGFβ^{60,61}. TGFβ memiliki peran kunci dalam regulator sintesis prokolagen I⁶². TGFβ secara signifikan terbukti menginduksi produksi α-SMA. TGFβ juga menginduksi produksi kolagen^{62,63}. Disisi lain TGFβ menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan kolagen teraktivasi⁶⁴. Kandungan IL-10 yang tinggi pada secretom dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53^{65,66}. Secretom MSCs memiliki dosis efektif dalam menginduksi kolagen pada kondisi luka terbuka mulai dosis 100uL⁶¹.

2.6. Luka Infeksi Superfisial

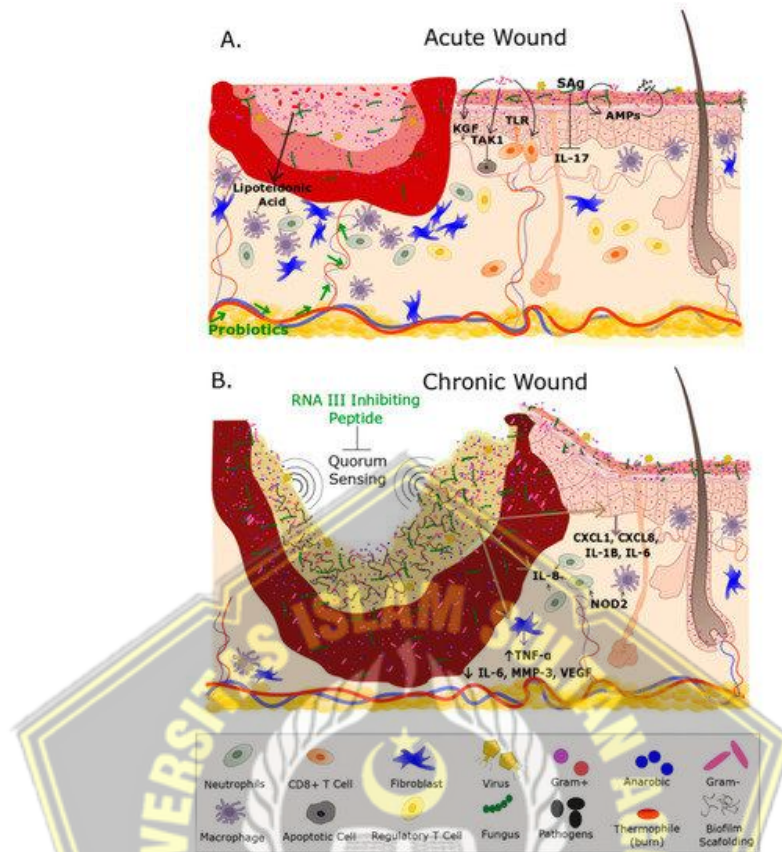
Luka superfisial adalah luka yang terbatas pada lapisan atas kulit atau membran mukosa. Biasanya, luka ini melibatkan kerusakan epidermis (lapisan luar kulit) dan mungkin juga melibatkan dermis (lapisan tengah kulit). Infeksi terjadi ketika mikroorganisme patogen (seperti bakteri, virus, atau jamur) masuk ke dalam luka dan mulai berkembang biak. Faktor-faktor yang dapat meningkatkan risiko infeksi meliputi kebersihan yang buruk, kurangnya sirkulasi darah yang memadai, atau penurunan sistem kekebalan tubuh. Pada umumnya infeksi luka superfisial dapat disebabkan oleh berbagai jenis mikroorganisme, tetapi yang paling umum adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes*.²

Infeksi merupakan masuknya mikroorganisme yang memperbanyak diri di jaringan tubuh yang menyebabkan peradangan. Infeksi luka adalah infeksi yang sering ditemukan yang berhubungan dengan pelayanan kesehatan atau nosokomial. Infeksi luka akibat operasi merupakan salah satu contoh infeksi nosokomial yang terjadi dalam kurun waktu 30 hari pasca operasi, dan infeksi tersebut sangat berhubungan dengan operasi, dan melibatkan suatu bagian anatomis tertentu pada tempat insisi saat operasi.⁸

Salah satu jenis luka infeksi adalah *superficial ncision SSI* (ITP Superfisial) merupakan infeksi yang terjadi paska operasi dalam kurun waktu 30 hari dan infeksi tersebut hanya melibatkan kulit dan jaringan subkutan pada tempat insisi dengan setidaknya ditemukan salah satu tanda sebagai berikut:

- a. Terdapat cairan purulent.
- b. Kuman dari cairan atau tanda dari jaringan superfisial.
- c. Terdapat minimal 1 dari tanda-tanda inflamasi.

Tanda-tanda inflamasi meliputi kemerahan, panas, bengkak, nyeri, fungsi laesa terganggu.



Gambar 2.8. Target molekuler menginduksi penutupan luka pada luka infeksi⁶⁷

Luka akut seperti luka bakar dan luka eksisi terbuka mengandung mikrobioma yang mungkin atau mungkin tidak memiliki populasi yang sangat berbeda dari yang ada di kulit sehat yang berdekatan. Mikroba yang hadir pada luka akut tidak selalu menghambat respons peradangan sehingga memungkinkan terjadinya penyembuhan luka. Beberapa sel fibroblas, dan sel inflamasi seperti makrofag, neutrofil, dan Sel T sangat terlibat dalam proses penyembuhan luka infeksi. Produksi asam lipoteikoid oleh *Staphylococcus epidermidis* mengurangi peradangan. Keratinosit mengeluarkan peptida antimikroba (AMP) sebagai respons terhadap *S. Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* Grup A

yang memberikan perlindungan terhadap bakteri patogen. Suplementasi dengan probiotik (misalnya, *Lactobacillus reuteri*) mempercepat penyembuhan luka meskipun mekanismenya belum diketahui. Sel T CD8⁺ sebagai respons terhadap *Staphylococcus epidermidis* meningkatkan perkembangan keratinosit yang cepat melalui Toll-like receptor (TLR). Selain itu, *Pseudomonas* mempercepat epitelisasi dan pertumbuhan pembuluh darah melalui sinyal *transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1).⁶⁷

Penurunan populasi *Staphylococcus aureus* menghasilkan superantigen (Sag) yang mengurangi interleukin (IL-17) dan selanjutnya mempromosikan penyembuhan luka. Jumlah fibroblas, makrofag, dan neutrofil yang sehat di sekitar tempat luka dan pembuluh darah yang utuh yang penting dalam proses penyembuhan. Di sebelah luka terdapat kulit yang tidak rusak (sehat) yang mengandung makrofag, fibroblas, dan komunitas ekologis mikroorganisme yang sehat yang mencakup Gram Negatif, Gram Positif, fungi, dan virus di dalam epidermis dan batang rambut.⁶⁸

Luka kronis mengandung biofilm dan populasi mikroorganisme yang padat termasuk bakteri anaerob yang menghambat penyembuhan luka dengan mencegah antibiotik topikal mencapai tempat luka. Quorum sensing dalam biofilm mempromosikan pembentukan biofilm, sedangkan topikal eksogen seperti peptida penghambat RNA menghambat pembentukan biofilm. Biofilm meningkatkan ekspresi sitokin IL-1B, IL-6, ligand kemokin

(CXCL) 1 dan 8. Bakteri dalam biofilm meningkatkan tingkat IL-8 yang merupakan kemotaktan neutrofil yang kuat. Selain itu, biofilm meningkatkan tingkat TNF- α , dan mengurangi IL-6, MMP-3, dan vascular endothelial growth factor (VEGF). Protein yang mengandung domain pengikat oligomerisasi nukleotida 2 (NOD2) menstimulasi respons inang dan sangat diekspresikan dalam luka kronis. Hilangnya pembuluh darah ke tempat luka juga mencegah migrasi faktor yang terkait dengan kekebalan dan pengiriman terapi eksogen. Migrasi fibroblas terhambat oleh pembentukan biofilm. Perhatikan epidermis hiperproliferatif di bagian luar tempat luka dalam upaya epitelisasi luka. Meskipun peradangan hadir dalam luka kronis, jumlah fibroblas dan makrofag yang berfungsi normal secara keseluruhan rendah yang lebih lanjut menghambat penyembuhan.⁶⁸

2.7. Sediaan Gel

Beberapa bentuk sediaan topikal antara lain gel, krim, pasta dan salep. Bentuk sediaan yang nyaman untuk penggunaan topical adalah bentuk sediaan gel. Gel terdiri dari suspensi semipadat yang terbuat dari partikel anorganik kecil atau molekul organik besar, yang terpenetrasi oleh suatu cairan. Sediaan gel memiliki kelebihan antara lain mempunyai sifat tiksotropi sehingga bila dioles mudah merata, tidak mudah mengalir pada permukaan kulit karena mempunyai viskositas dan daya lekat yang tinggi, tidak berbekas, hanya lapisan tipis seperti *film* saat dipakai, terdapat sensasi dingin saat digunakan dan mudah dicuci dengan air, penetrasinya lebih

dalam dibandingkan krim, dapat digunakan pada area berambut dan secara kosmetika lebih disukai, gel cepat mencair bila kontak dengan kulit ⁶⁹.

Polimer-polimer yang umum digunakan untuk membuat gel-gel farmasetik antara lain pektin gom alam tragakan, karagen, asam alginat, agar, serta bahan semisintetis dan sintetis seperti hidroksi etil selulosa, metil selulosa, karboksi metil selulosa, dan karbopol yang merupakan polimer vinil sintetis dengan gugus karboksil yang terionisasi. Gel dibuat melalui proses peleburan, atau memerlukan prosedur khusus berkaitan dengan sifat mengembang gel. Bahan pembentuk gel idealnya harus bersifat inert, tidak ada perubahan viskositas pada penyimpanan yang normal, aman dan tidak bereaksi dengan bahan-bahan lain dalam formula ⁷⁰.

Konsistensi gel dikarenakan bahan pembentuk gel yang setelah mengabsorpsi air akan membentuk struktur tiga dimensi. Gel mengabsorpsi larutan dan mengembang, dengan meningkatkan volume. Pengembangan merupakan tahap awal disperse yaitu terjadi penetrasi fase dari luar kedalam matriks gel dan menimbulkan interaksi diantara pembentuk gel dan solven. Gel merupakan interaksi diantara unit-unit fase koloidal dari senyawa anorganik dan organik, tidak terpisah dari fase luar, membentuk *structural viscosity*. Karakteristik gel harus disesuaikan dengan tujuan penggunaan gel, misalnya pada gel topikal jangan terlalu liat, konsentrasi dan berat molekul bahan pembentuk gel yang digunakan jangan terlalu tinggi sehingga dapat menyebabkan gel sulit didispersikan dan dioleskan ⁷¹.

Pemilihan basis dalam pembuatan gel, dapat mempengaruhi karakter gel yang terbentuk. Basis gel terbagi atas basis gel hidrofilik dan hidrofobik. Basis gel hidrofilik memiliki sifat yang memperlambat pengeringan sehingga cocok digunakan secara topikal karena kemampuannya bertahan lama di permukaan kulit. Gel hidrofilik mempunyai sistem koloid yang lebih stabil dan lebih mudah dibuat dibandingkan gel hidrofobik. Gel hidrofobik memiliki dasar yang terdiri atas fase anorganik, hanya sedikit interaksi diantara dasar gel hidrofobik dengan fase pendispersinya. Bahan hidrofobik tidak menyebar dengan spontan.

Karakteristik cairan gel terbagi menjadi gel hidrofilik dan gel hidrofobik⁷²:

- a. Gel hidrofilik, mempunyai basis terdiri dari molekul organik yang besar dan larut dengan fase pendispersi. Sistem koloidnya lebih stabil dan lebih mudah dibuat dibandingkan hidrofobik. Gel hidrofilik mengandung bahan pengembang, penahan lembab, air, dan pengawet. Karakteristik gel hidrofilik ini mempunyai aliran tiksotropik, kompatibel dengan beberapa eksipien, tidak lengket, larut dalam air, mudah menyebar dan mudah dibersihkan.
- b. Gel hidrofobik, basisnya mengandung minyak lemak atau polietilen dan parafin cair dengan bahan pembentuk gel koloidal silika atau zink sabun atau aluminium. Gel ini tersusun dari partikel anorganik, kemudian akan terjadi interaksi dengan basis gel jika ditambahkan ke dalam fase pendispersi. Basis gel hidrofobik tidak secara spontan menyebar.

Kontrol kualitas sediaan gel, meliputi ⁷³:

- a. Organoleptis, merupakan diskripsi sediaan gel yang terdiri atas warna, bentuk, bau, dan kejernihan. Pengamatan dilakukan secara makroskopis.
- b. Homogenitas, sediaan gel yang dihasilkan harus tercampur homogen dan merata. Pengujian homogenitas dapat dilakukan dengan cara visual. Homogenitas gel diamati di atas kaca objek dengan adanya bantuan cahaya.
- c. Daya sebar, berkaitan dengan kenyamanan pada pemakaian, mudah dioles tanpa perlu penekanan yang berlebih. Sediaan topikal diharapkan memiliki daya sebar yang baik.
- d. Daya lekat, adalah kemampuan menempel pada lapisan epidermis, pengujiannya untuk mengetahui kemampuan melekat atau waktu retensi yang dihasilkan saat digunakan.
- e. Viskositas, mempengaruhi sifat sediaan dalam campuran dan sifat alirnya pada saat proses produksi, proses pengemasan, serta sifat-sifat penting pada saat pemakaian, seperti daya sebar, konsistensi atau bentuk, dan kelembaban. Selain itu, viskositas dapat mempengaruhi bioavailabilitas dan stabilitas fisik. Semakin tinggi viskositas, menyebabkan daya lekatnya semakin besar, sedangkan daya sebar akan semakin kecil. Viskositas sediaan dapat dinaikkan dengan penambahan polimer.
- f. pH, diukur segera pada saat sediaan telah selesai dibuat diharapkan nilai pHnya sama dengan nilai pH tempat pemakaian atau kulit untuk

mencegah terjadi iritasi. Kulit manusia memiliki pH normal antara 4,5-6,5.

2.8. Farmakinetik Obat Topikal

Farmakokinetik sediaan topikal merupakan gambaran terhadap jalannya bahan aktif yang diaplikasikan ke kulit pada konsentrasi tertentu, lalu diserap oleh lapisan kulit, kemudian didistribusikan secara sistemik. Hal ini penting dalam menentukan sediaan topikal yang akan dipakai untuk terapi ⁷⁴. Sediaan topikal setelah diaplikasikan secara umum akan melewati tiga bagian yaitu: permukaan kulit, stratum korneum, dan jaringan yang sehat. Stratum korneum merupakan reservoir bagi vehikulum, dimana kandungan didalam obat kontak dengan permukaan kulit tetapi belum terjadi penetrasi, namun tidak dapat dihilangkan walaupun dihapus oleh pakaian atau digosok.

Sediaan obat tertentu dapat menyebabkan bahan aktif langsung menembus hipodermis. Vehikulum sediaan topikal mengandung unsur yang dapat mengalami evaporasi, sehingga kemudian zat aktif berikatan pada lapisan yang dilewatinya misalnya epidermis, dermis, selanjutnya zat aktif akan diserap oleh vaskuler dermis dan hipodermis kulit ⁷⁰.

2.8.1. Jalur Penetrasi Sediaan Topikal

a. Penetrasi transepidermal

Penetrasi transepidermal melalui jalur interseluler dan intraseluler. Jalur penetrasi yang utama melalui interseluler, menembus lapisan stratum korneum melewati ruang antar sel

korneosit yang dikelilingi lapisan lipid, berdifusi pada matriks lipid protein stratum korneum, kemudian akan menembus epidermis di bawahnya, dan berdifusi ke pembuluh kapiler.⁴⁰ Jalur penetrasi intraseluler, obat berdifusi menembus dinding sel korneosit dan melewati matriks lipid protein stratum korneum, kemudian menuju sel di lapisan bawahnya sampai ke pembuluh kapiler di bawah stratum basal epidermis dan berdifusi ke kapiler.

b. Penetrasi transfolikular

Penetrasi folikular diperlihatkan pada percobaan in vivo, terdapat molekul yang kecil seperti kafein berpenetrasi melalui rute folikular selain melalui sel korneum. Difusi obat melewati celah folikel rambut serta kelenjar sebacea dan selanjutnya berdifusi ke pembuluh kapiler⁷⁵.

2.8.2. Absorpsi Sediaan Topikal Secara Umum

Absorpsi sediaan topikal yang dioleskan ke kulit, melalui beberapa fase:

- a. Lag phase, fase ini saat sediaan dioleskan ke kulit dan belum menembus stratum korneum, sehingga bahan aktif obat pada fase ini belum ada dalam pembuluh darah.
- b. Rising phase, sebagian sediaan sudah mulai menembus stratum korneum kulit, dan masuk pembuluh kapiler dermis, sehingga obat sudah ditemukan di pembuluh darah.

- c. Falling phase, adalah fase dimana bahan aktif obat dilepaskan dari permukaan kulit dan dibawa ke pembuluh kapiler lapisan dermis.

Gel mampu berpenetrasi menembus lapisan hipodermis, serta mampu membentuk lapisan absorpsi yang menyebabkan difusi secara transfolikulernya juga baik, sehingga banyak digunakan pada sediaan gel analgetik yang memerlukan penetrasi yang baik ⁶⁹.

2.9. Efek Secretom Hipoksia *Mesenchymal Stem Cells* Terhadap α -SMA dan kolagen

MSCs mensekresikan mediator-mediator dan growth faktor yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti sitokin antiinflamasi (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), tumor necrosis factor alfa (TNF- α), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF β 1), angiopoietin, IL-1, IL-6, dan IFN γ yang akan merangsang pembentukan kolagen dan mempercepat regenerasi kulit. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan growth factor ^{51,56} selanjutnya di sebut SH-MSCs.

IL-10 yang berasal dari sekretom memiliki kemampuan untuk menghambat aktivasi NF- κ B sehingga mencegah ekspresi MMP dalam hal ini MMP-1 yang paling bereperan di kulit. MMP-1 adalah mediator utama timbulnya degradasi fibril kolagen dan elastin, sehingga dengan adanya IL-10 dari sekretom degradasi kolagen dapat dicegah. Disisi lain sekretom juga mengandung TGF- β yang berperan dalam produksi procollagen type I ⁷⁶.

TGF- β yang berikatan dengan reseptor membrane sel fibroblas akan mengaktifkan protein pada sitoplasma sampai ke nucleus (jalur proliferasi) sehingga terjadi proliferasi fibroblas dan terjadi kenaikan jumlah fibroblast sehingga terjadi proses penutupan luka ⁷⁷. Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa IL-10 secara langsung mampu menghambat ekspresi NF-kB. Kandungan lain dari sekretom adalah TGF β yang terbukti secara signifikan menghambat jalur PI3K sehingga terjadi α -SMA yang berujung pada induksi kolagen ^{62,63}. α -SMA adalah protein yang menunjukkan aktivitas myofibroblast yang mengendalikan sintesis dan pembentukan kolagen. Studi menunjukkan bahwa pemberian sekretom, seperti cytokine dan *growth factor*, dapat mempengaruhi aktivitas α -SMA dan meningkatkan sintesis kolagen dalam proses penyembuhan luka ⁴. Maka dengan adanya sekretom, merupakan kandidat yang mampu mempercepat penyembuhan luka infeksi superfisial ²⁷.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

LIS dikaitkan erat dengan inflamasi berkepanjangan, penurunan ekspresi α -SMA dan penurunan densitas kolagen. Ekspresi α -SMA dan densitas kolagen mengalami penurunan saat kondisi pro-inflamasi dan infeksi yang dominan, sehingga memicu penghambatan penutupan dan penyembuhan luka^{2,8}.

Proses aktivasi reseptor molekul pro-inflamasi yang di induksi lipopolisakaride dari bakteri menyebabkan disosiasi kompleks IKK, yang mempengaruhi transfer NF- κ B ke nukleus⁷⁸. Mekanismenya melibatkan fosforilasi salah satu protein yang membentuk kompleks IKK, yaitu I κ B, yang mengarah ke ubiquitinasi dan degradasi I κ B oleh proteasome. Transfer NF κ B ke gen target menginduksi aktivasi dan ekspresi berbagai molekul pro-inflamasi yang memengaruhi overaktivasi sel imun⁷⁹. Peningkatan kadar ROS dapat meningkatkan ekspresi MAPK sehingga menginduksi pelepasan matrix metalloproteinase (MMPs) yang akan mendegradasi kolagen.⁷⁸ IL-10 yang diekspresikan oleh secretom MSCs dapat menginduksi pelepasan enzim antioksidan seperti SOD dan GPx melalui aktivasi jalur Nrf2, sehingga menekan pembentukan ROS.⁸⁰

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 normal⁸¹. Berbagai sitokin dan mediator yang muncul sebagai respon MSC terhadap adanya hipoksia, salah satunya adalah IL-10 dan TGF- β ⁸². 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 ⁸⁰.

TGF- β yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur PI3K melalui jalur TGF- β yang melibatkan TGF- β reseptor I dan II. Aktivasi PI3K akan mengaktifkan Akt yang berdampak pada aktivasi mTOR. mTOR yang aktif akan menginduksi ekspresi SMAD2/3 yang berujung pada aktivasi SMAD2/3. SMAD2/3 yang dilepaskan memicu pelepasan α -SMA sehingga terjadi perubahan fibroblast menjadi myofibroblast yang berujung pada

3.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah :

1. Terdapat pengaruh SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel terhadap peningkatan ekspresi gen α -SMA antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.
2. Terdapat pengaruh SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel terhadap peningkatan jumlah kolagen antar kelompok perlakuan dibanding kontrol pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.

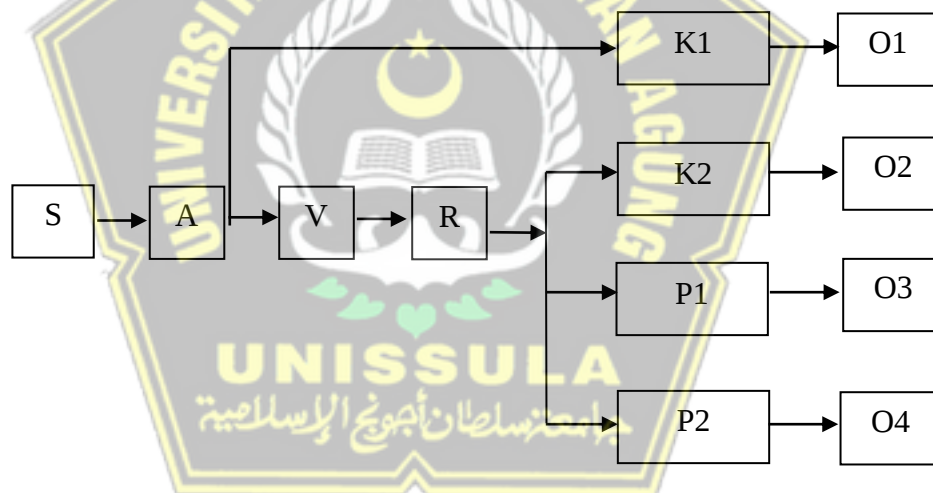


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol negatif) dan 1 kelompok tikus sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : K1: Tikus Sehat

Perlakuan : K2: Kontrol Negatif (Tikus model Luka Infeksi Superfisial

dengan perlakuan base gel)

Perlakuan : P1: Tikus model Luka Infeksi Superfisial dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dalam sediaan gel.

Perlakuan : P2: Tikus model Luka Infeksi Superfisial dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 20% dalam sediaan gel.

O : Observasi

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen α -SMA dan jumlah densitas kolagen.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. Gel SH-MSCs

Gel SH-MSCs adalah gel yang mengandung molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSCs. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs secara hipoksia, kemudian difiltrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*. SH-MSCs sebanyak 100 μ L $\approx$ 0,1 ml dan 200 μ L $\approx$ 0,2 ml kemudian dicampur dengan

gel sebanyak 1000 mg sebagai campuran. Sehingga menghasilkan dosis SH-MSC 10% dan 20%. Gel sekretom terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kelompok P3 diberikan SH-MSCs dosis 10% dan kelompok P4 diberikan SH-MSC dosis 20% dalam sediaan gel. Gel sebanyak 100 mg dioleskan pada bagian LIS sekali sehari selama 14 hari.

Skala: Ordinal

4.2.2.2. Ekspresi gen α -SMA

Ekspresi gen α -SMA adalah gene isoform aktin yang mendominasi dalam sel pembuluh darah *smooth-muscle* dan memainkan peran penting dalam fibrogenesis. Ekspresi gen α -SMA dianalisis dari jaringan kulit yang diambil pada hari ke 15 dan dilakukan dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk *multiple*.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Densitas kolagen

Densitas kolagen adalah protein matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh fibroblast yang teraktivasi setelah awal pemberian perlakuan dan berwarna biru pada pengecatan *Masson Trichome*. Metode penghitungan jumlah kolagen berdasarkan perhitungan setiap perseratus

lapang pandang dengan menggunakan aplikasi computer ImageJ.

Skala: Rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200–250-gram yang dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian yang diperoleh dari *Animal House Integrated Biomedical Laboratory*, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

4.3.1.1. Kriteria Inklusi adalah sebagai berikut:

1. Tikus putih jantan galur *Wistar* yang mengalami luka infeksi superfisial.
2. Luka superfisial yang divalidasi adanya populasi bakteri pada area luka dengan pengecatan gram.
3. Umur 8-12 minggu.
4. Berat badan 200-250 gram.

4.3.1.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit selama waktu adaptasi
2. Tikus dengan luka yang menunjukkan tanda-tanda pendarahan berlebihan dan nekrosis

4.3.1.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati selama penelitian.

4.3.2. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 4 perlakuan yaitu perlakuan K1 (tikus sehat), K2 (tikus diinduksi luka superfisial dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan diberi base gel 100 mg), P1 (Pemberian gel SH-MSCs dosis 10%), dan P2 (Pemberian gel SH-MSCs dosis 20%).

4.3.3. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus sampel eksperimental dari Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

Rumus Federer : $(t-1)(n-1) \geq 15$

Sampel tiap Kelompok : $(4-1)(n-1) \geq 15$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 6 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 6 ekor tikus perkelompok.

Keterangan:

t= banyaknya perlakuan

n= banyak sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan untuk membuat hewan model antara lain, pisau cukur, kandang paparan, kandang pemeliharaan, tempat air minum tikus dan pemotong rambut. Alat yang digunakan untuk pengumpulan data adalah *vacutainer*, tabung hematokrit, pot 5 mL, 6 mm *biopsy punch*, sentrifus, mikropipet, 1000 uL mikropipet tip, dan *vial tube* 1,5 mL. Alat yang digunakan untuk analisis data antara lain *microplate reader*, mikroskop, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi α -SMA dan analisis jumlah densitas kolagen.

4.4.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa bahan yang terdiri bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alkohol 70%, PBS, Ketamin, Xylasine, kloroform, *Primer* α -SMA, *Primer* GAPDH, dan *Tricome masson*.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.5.2. Prosedur 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* beserta janin tikus diletakkan dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* beserta janin tikus diletakkan ke petri dish, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus lalu dipotong sepanjang 3 – 5 cm kemudian 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. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS) *buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.
2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel ke dalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.

7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500µl *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC mouse anti-human CD29	5µl
2	PE mouse anti-human CD90	5µl
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5µl
4	APC Mouse anti-human CD31	5µl
5	Kosong	-
	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20µl
6	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20µl
	hMSC <i>positive cocktail</i>	20µl
7	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20µl

4.5.4. Proses Hipoksia dan TFF

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam hypoxic chamber.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.

4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFT untuk mendapatkan SH-MSCs yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis P1 dan P2.

4.5.5. Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel SH-MSCs dilakukan dengan cara mencampurkan SH-MSC dengan gel sehingga konsentrasi gel SH-MSCs mempunyai kandungan dosis 10% (P3) dan 20% (P4).
2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.5.6. Pembuatan Model Luka Superfisial dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylasine (20mg/kgbb). Tikus disinfeksi terlebih dahulu dengan menggunakan usapan

kapas alcohol di bagian perut kiri bawah, lalu dilakukan penyuntikan pada intraperitoneal tikus.

2. Sesudah tikus dalam keadaan tenang atau mengantuk, rambut pada bagian punggung tikus dilakukan pencukuran hingga bersih, kemudian disinfeksi pada daerah yang akan dilukai dengan kassa povidine iodine.
3. Punggung tikus dieksisi pada bagian epidermis dengan ukuran 2x2 cm kedalaman 1 mm dan diinduksi infeksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* 5×10^7 CFU/mL sebanyak 100 μ l dengan menggunakan micropipet dan spatula untuk meratakannya.
4. Tunggu 1-2 jam setelah pemberian bakteri *S.aureus* agar sedasi pada tikus hilang atau tikus bangun. Kemudian masukkan tikus kembali kedalam kandang berdasarkan kelompok.
5. Luka infeksi ditreatment dengan pemberian gel topical yang mengandung SH-MSCs 10% dan 20% sebanyak 100 mg 1 kali sehari selama 14 hari dimulai 1 hari setelah pembuatan luka. Tikus sehat tidak diberikan treatment apapun, sedangkan tikus kontrol diberikan perlakuan basis gel.
6. Terminasi tikus dilakukan pada hari ke 15.
7. Sampel kulit pada semua kelompok diambil untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan gram.
8. Sampel kulit tikus pada semua kelompok diambil dan difiksasi dalam larutan NBF 10%

9. Sampel kulit dibilas dengan alkohol 70% sampai bersih dari sisa larutan fiksatif.
10. Sampel kulit dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 30 menit untuk proses dehidrasi.
11. Sampel kulit dimasukkan ke dalam toluol sampai jernih atau transparan selama 1 jam.
12. 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.
13. *Embedding*, sampel kulit dari parafin murni ditanamkan ke dalam cetakan blok parafin yang telah berisi parafin cair dan ditunggu hingga parafin mengeras.
14. Sampel kulit dalam blok paraffin diiris dengan ketebalan irisan sebesar 6 μm menggunakan mikrotom.
15. 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.

16. Sediaan histologis dideparafinasi dengan cara dimasukkan ke dalam xylol selama 24 jam.
17. *Staining* (pewarnaan) dilakukan dengan pewarna gram. 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 Hematoksin 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.
18. Preparat ditutup kaca penutup, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan.

4.5.7. Terminasi dan pengambilan jaringan

1. Terminasi tikus dilakukan hari ke 15 setelah terapi dengan menggunakan cocktail dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Xylazine 10 mg/kgBB dan

Acepromazine 2 mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuskular.

2. Setelah tikus meninggal, dilakukan koleksi organ kulit kemudian disimpan dalam cryotube yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

4.5.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel kulit sebanyak 100 mg diambil dari RNA later kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
2. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropaste dan ditambahkan lagi RNA Iso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
3. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
4. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°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.
5. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanolol dengan

volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.

6. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40⁰C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
7. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (Diethyl pyrocarbonat) DEPC lalu bolak balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40C.
8. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 μ m. Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
9. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 μ l OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 μ l, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70⁰C.
10. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 μ l, DEPC-Treated H₂O 5 μ l, ReverTraAce 1 μ l. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 250C selama 5 menit, 42⁰C selama 50 menit dan 85⁰C selama 5 menit.

4.5.9. Pembacaan α -SMA dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi mRNA dari α -SMA dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 μ l cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ l, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 μ l untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μ l Nuclease Free Water.
3. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine.
4. Peningkatan ekspresi gen di analisis dalam ratio peningkatan terhadap housekeeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.

Tabel 4.2. Komponen PCR Mix α -SMA

Komponen	Jenis
Primer α -SMA	Forward α -SMA 5'- AGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA-3'
	Reverse α -SMA 5'- TCACCATTACCTCGCACTTCTCA -3'
Primer GAPDH	Forward GAPDH 5'- GAGCTAGCG AGA ATC CCA AAA GCC TCA A-3'
	Reverse GAPDH 5'- CTCTCGAGG CGG GGT TGC AGA AGT GT -3'
Reagen RNA transcribed cDNA	Trizol Reagen High Capacity cDNA Reverse Transcription SYBR Green

4.5.10. Pembuatan Blok Parafin

1. Dehidrasi, masukan potongan jaringan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 60%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% (bertingkat) untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Masukan jaringan ke dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam kemudian masukan jaringan pada larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.
2. Parafinisasi dan Embedding dengan memasukan jaringan dalam parafin cair selama 2 x 2 jam. Tunggu hingga parafin memadat, potong jaringan dalam parafin setebal 4 mikron dengan mikrotom.
3. Hasil dari potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat.
4. Masukan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.11. Analisis Jumlah Densitas Kolagen

1. Slide jaringan dideparafinisasi.
2. Cairan Bouin dipanaskan pada suhu 54-64°C.
3. Slide diinkubasi dalam Cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir.
4. Slide diinkubasi dalam Hematoxylin Besi Weigert selama 5 menit, kemudian bilas dengan air.

5. Slide diinkubasi dalam larutan *Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin* selama 15 menit, kemudian dibilas dengan air.
6. Slide diinkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat/fosfotungstat selama 10-15 menit.
7. Slide diinkubasi dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air.
8. Slide diinkubasi dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit.
9. Slide dilakukan proses dehidrasi, kemudian pasang *desk glass*.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) FK Unissula Semarang.

4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juni 2023 .

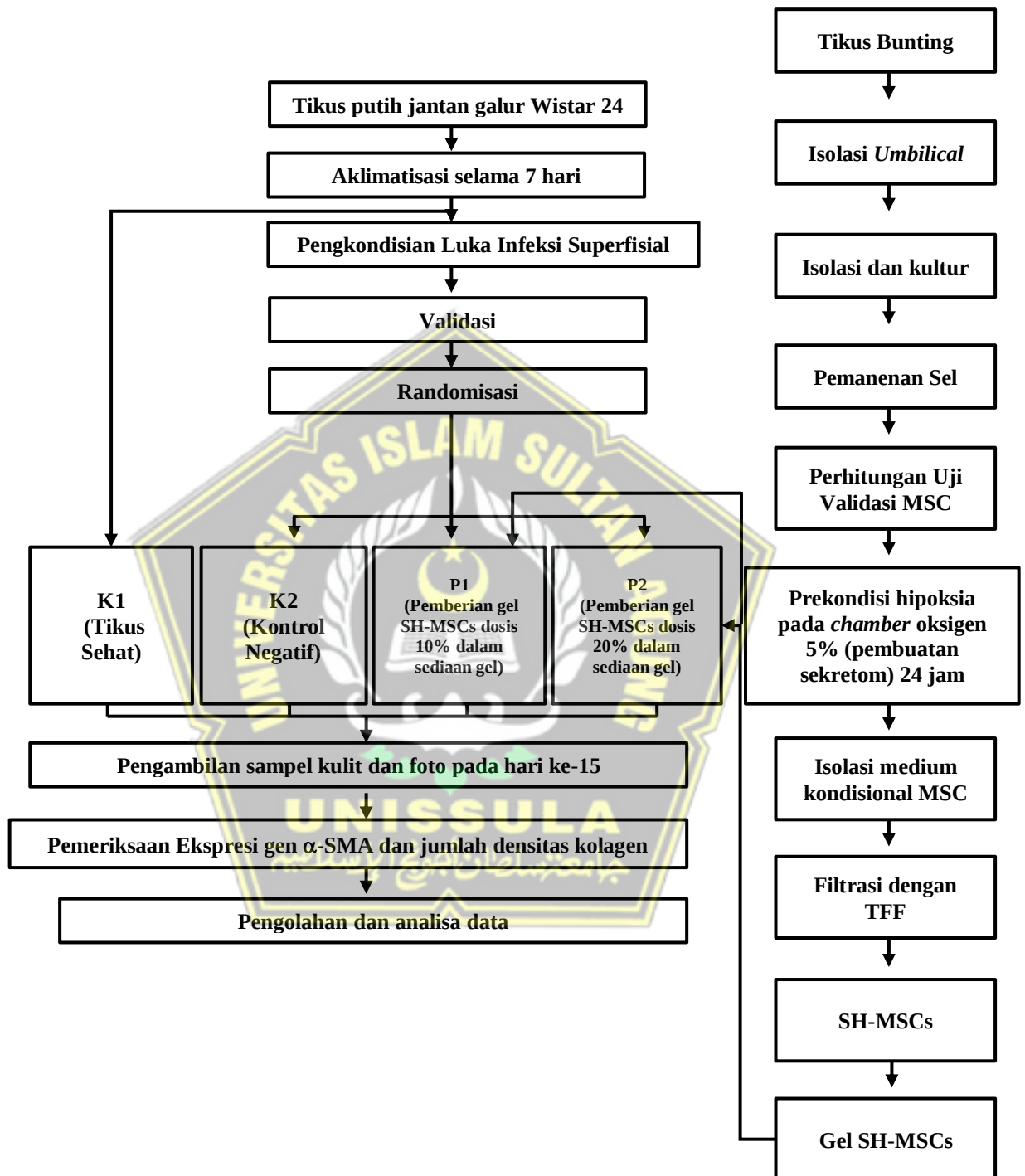
4.6. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Uji ekspresi gen α -SMA diperoleh data normal ($P > 0,05$), namun tidak homogen ($P < 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk

mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Data densitas kolagen memiliki sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows.



4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian sekretom hipoksia mesenchymal stem cell (SH-MSCs) terhadap ekspresi gen α -SMA dan densitas kolagen pada tikus model luka infeksi superfisial. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juli sampai Agustus 2023 bertempat di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang.

Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 24 ekor tikus sesuai kriteria fedderer. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok sehat, kelompok kontrol negatif, kelompok pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dan kelompok pemberian gel SH-MSCs dosis 20%.

MSCs yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Umbilical Cord* tikus usia kehamilan 21 hari. Validasi MSCs dilakukan menggunakan analisis kemampuan differensiasi osteogenic, adipogenik serta analisis fenotip sel menggunakan *flowcytometri*. Sel yang telah tervalidasi kemudian di inkubasi pada kondisi hipoksia.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi Sekretom Hipoksia *Mesenchymal Stem Cells*

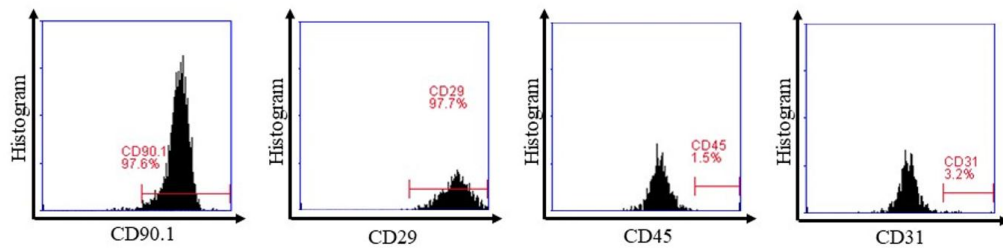
Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang yang menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian

dilakukan kultur pada flask plastik dengan medium khusus. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke 5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis (gambar 5.1).



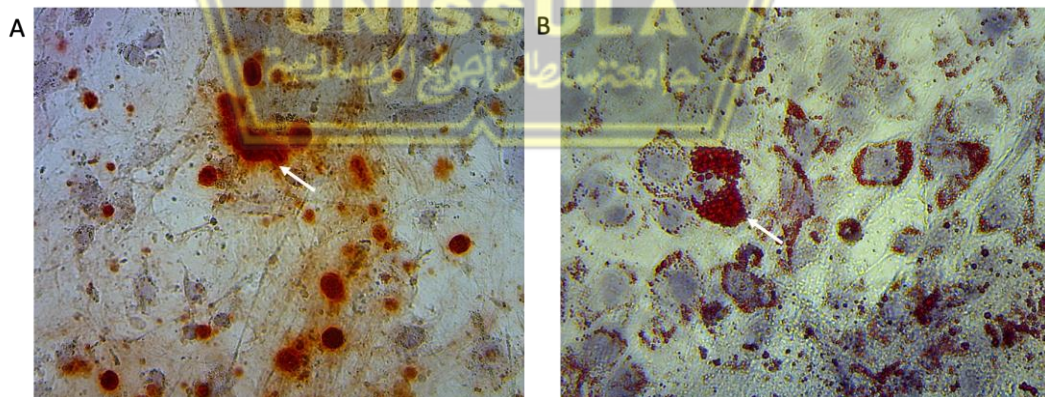
Gambar 5.1. Isolasi MSCs dengan sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.

Hasil isolasi sel punca mesenkimal divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Pada penelitian ini menunjukan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (97,60%), CD29 (97,70%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,50%) dan CD31 (3,20%) (Gambar 5.2).



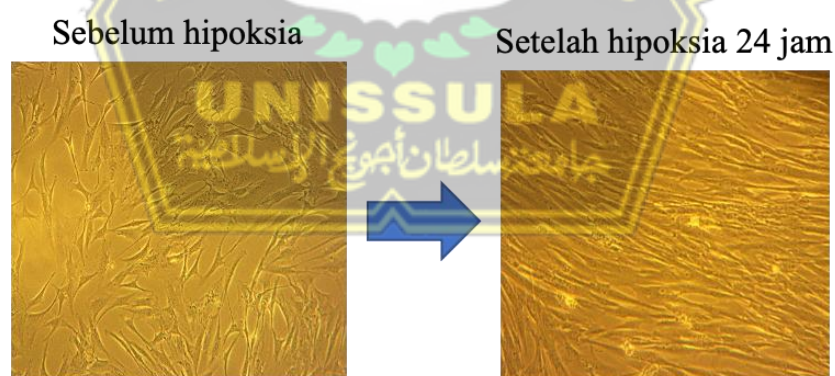
Gambar 5.2. Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

Penelitian ini juga menganalisis kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel matur. MSCs diberi medium khusus agar dapat berdiferensiasi masing-masing menjadi osteosit dan adiposit. Penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit yang diindikasikan dari endapan kalsium dan lemak berupa penampakan merah menggunakan pewarnaan *alizarin red* dan *oil red dye* pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah putih).

Sel MSCs kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 5% selama 24 jam menggunakan *chamber hypoxia*. Medium kultur sel punca mesenkimal yang mengandung sekretom kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan molekular *weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50kDa yang mengandung sitokin interleukin-10 atau IL-10 dan *Transforming growth factor* β ^{84,85}. IL-10 merupakan molekul antiinflamasi monomer berukuran ~18kDa yang berfungsi dominan dalam proses imunosupresi dan dapat disekresikan oleh sel MSCs pada kondisi hipoksia.⁸⁶ TGF- β merupakan molekul *growth factor* dimer berukuran 25kDa yang memiliki peran mencegah proses inflamasi berlangsung lebih lama.

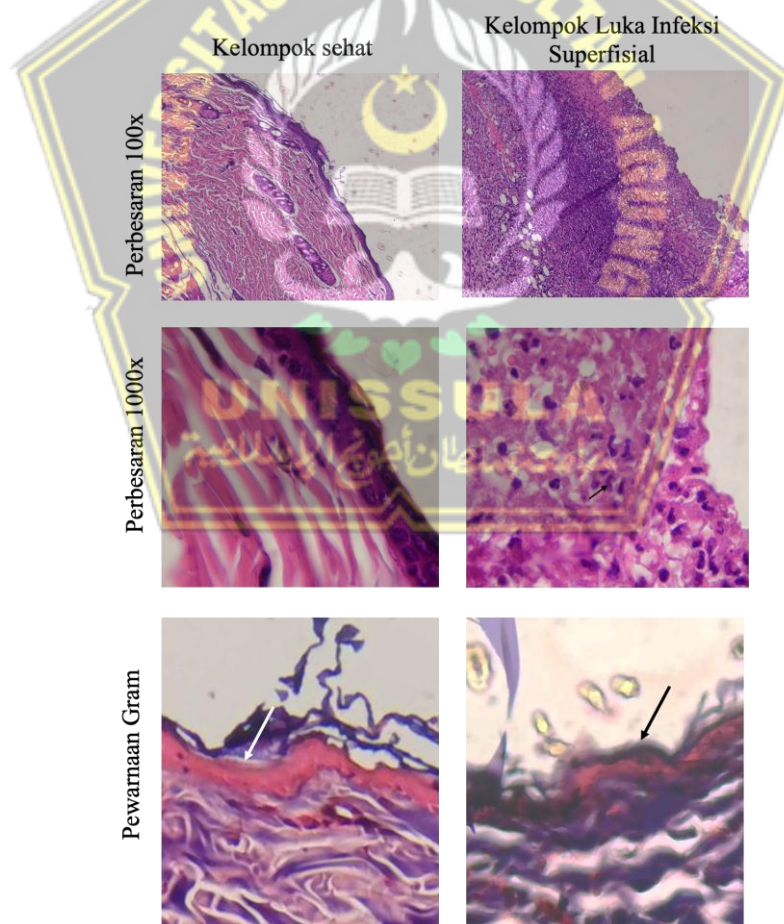


Gambar 5.4. Morfologi MSCs sebelum dan setelah kondisi hipoksia

5.1.2. Validasi model luka infeksi superfisial

Penelitian ini menggunakan model luka infeksi superfisial. Hewan model diinduksi luka dengan sayatan hingga bagian epidermis dan diinisiasikan dengan bakteri *Staphylococcus aureus*

untuk menginduksi infeksi. Validasi luka infeksi superfisial di amati pada hari ke-6 setelah induksi. Pada pewarnaan HE terlihat bahwa kelompok luka infeksi superfisial mengalami inflamasi, hal ini terkonfirmasi dari banyaknya neutrophil yang terbentuk (tanda panah hitam pada perbesaran 100x) (Gambar 5.5). Pada pewarnaan gram terlihat koloni berwarna biru di area epidermis (panah hitam) jika dibandingkan pada kelompok sehat yang tidak muncul warna biru pada daerah epidermis. Hal ini menunjukkan bahwa hewan model terkonfirmasi mengalami luka infeksi superfisial.



Gambar 5.5. Validasi luka infeksi superfisial dengan pewarnaan HE dan pewarnaan gram. Panah hitam menunjukkan infeksi bakteri gram positif

5.1.3. Efek pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dan 20% terhadap ekspresi gen α -SMA

Peneliti mendapatkan hasil bahwa gel SH-MCs mampu meningkatkan ekspresi α -SMA pada tikus model luka infeksi superfisial secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.6).

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen α -SMA dan Kolagen Tipe 1

Variabel	Kelompok				pvalue
	Sehat n=5 Mean $\pm$ SD (K1)	Kontrol negative n=5 Mean $\pm$ SD (K2)	gel SH- MSCs 10% n=5 Mean $\pm$ SD (P1)	gel SH-MSCs 20% n=5 Mean $\pm$ SD (P2)	
Ekspresi gen α -SMA	1,00 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,09	4,96 $\pm$ 2,77	10,03 $\pm$ 3,78	
<i>Saphiro wilk</i>	0,070*	0,518*	0,090*	0,393*	
<i>Levene test</i>					0,002
<i>One way ANOVA</i>					0,000***
Densitas kolagen	54,25 $\pm$ 0,82	17,39 $\pm$ 2,47	34,78 $\pm$ 1,72	35,68 $\pm$ 5,28	
<i>Saphiro wilk</i>	0,560*	0,489*	0,983*	0,010	
<i>Levene test</i>					0,000
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0,000****

Keterangan :

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

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

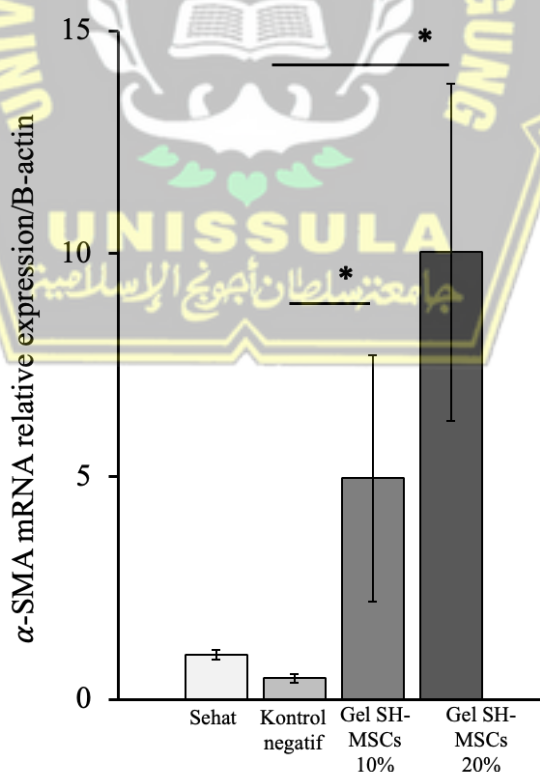
*** *One Way Anova* ($p < 0,05$ = ada beda makna)

*****Kruskal-Wallis Test* ($p < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1.

Rerata ekspresi gen α -SMA dikelompok P2 yang tertinggi (10,03 $\pm$ 3,78), kemudian di ikuti oleh rerata ekspresi gen α -SMA kelompok P1 (4,96 $\pm$ 2,77). Rasio terendah pada kelompok perlakuan kontrol negatif sebesar 0,46 $\pm$ 0,09. Data ekspresi gen α -SMA

keempat kelompok semuanya berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p > 0,05$ dan juga memiliki varian data yang tidak homogen ditunjukkan dengan hasil *Levene's Test* dengan nilai $p = 0,002$ ($p < 0,05$). Distribusi dan varian data ekspresi gen α -SMA normal dan tidak homogen, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *One Way Anova* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi gen α -SMA yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *One Way Anova* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.6. Grafik ekspresi gen α -SMA Pada Seluruh Kelompok Penelitian

Tabel 5.2. Uji *Post Hoc Tamhane* ekspresi gen α -SMA pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K2	P1*	0,031	-8,47	-0,51
	P2*	0,005	-14,99	-4,13
P1	K2*	0,031	0,51	8,47
	P2	0,077	-10,64	0,51
P2	K2*	0,005	4,13	14,99
	P1	0,077	-0,51	10,64

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

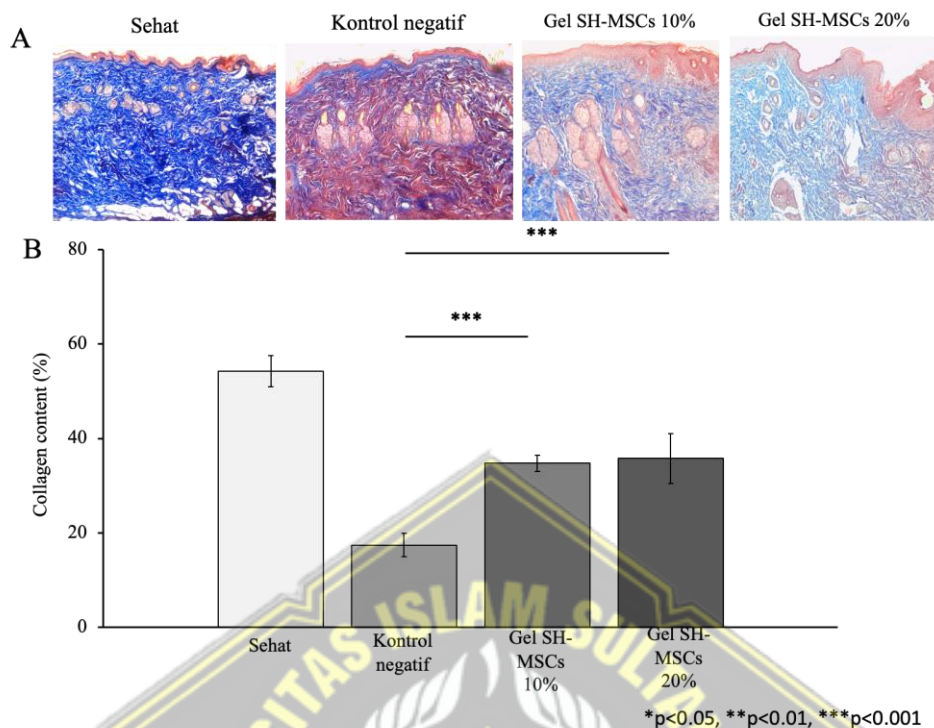
Berdasarkan data diatas didapatkan rerata perbandingan antara kelompok K2 dengan P1 (0,031) dan K2 dengan P2 (0,005) yang menunjukan terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan perbandingan kelompok P1 dan P2 (0,077) tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan K2 dan P2 diperoleh nilai 0,005 ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Peningkatan ekspresi α -SMA paling signifikan ditunjukkan pada pemberian SH-MSCs 20% dengan nilai batas bawah -14,99 dan nilai batas atas -4,13. Hasil uji *Post Hoc Tamhane* pada data ekspresi gen α -SMA menunjukkan bahwa pemberian gel SH-MSCs yang dapat meningkatkan ekspresi gen α -SMA pada tikus jantan galur wistar model luka infeksi superfisial.

5.1.4. Efek pemberian gel SH-MSCs dosis 10% dan 20% terhadap densitas kolagen

Penelitian ini didapatkan hasil bahwa gel SH-MCs mampu meningkatkan densitas kolagen pada tikus model luka infeksi

superfisial secara signifikan bergantung dosis (Tabel 5.1; Gambar 5.7).

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 5.1. Rerata densitas kolagen dikelompok P2 ($35,68 \pm 5,28$) yang tertinggi, kemudian di ikuti oleh rerata densitas kolagen kelompok P1 ($34,78 \pm 1,72$). Data densitas kolagen terendah yaitu pada kelompok kontrol negatif sebesar $17,39 \pm 2,47$. Data densitas kelompok K1, K2, dan P1 berdistribusi normal, namun data kelompok P2 (0,010) tidak terdistribusi normal berdasarkan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p < 0,05$. Distribusi data densitas kolagen tidak normal, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata densitas kolagen yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal-Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 5.7. (A) Hasil pewarnaan kolagen dengan masson trichome. (B) Grafik densitas kolagen pada seluruh kelompok penelitian

Tabel 5.3. Uji Mann-Whitney densitas kolagen pada Masing-masing Kelompok

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
K2	P1*	0,000	0,000	0,153
	P2*	0,000	0,000	0,531
P1	K2*	0,000	0,000	0,153
	P2	0,176	0,675	-0,786
P2	K2*	0,000	0,000	0,531
	P1	0,176	0,675	-0,786

Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan perbandingan rerata K2 (kontrol negatif) dengan P1 (SH-MSCs 10%) (0,000) dan P2 (SH-MSCs 20%) (0,000) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan P1 dan P2 (0,176) tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan kelompok K2 dan P2 diperoleh nilai 0,000 (p

<0,05) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut. Nilai densitas kolagen tertinggi paling signifikan ditunjukkan pada pemberian SH-MSCs 20% dengan nilai batas bawah 0,000 dan nilai batas atas 0,531. Hasil uji *Mann-whitney* pada data densitas kolagen menunjukkan bahwa pemberian gel SH-MSCs yang dapat meningkatkan densitas kolagen pada tikus jantan galur wistar model luka infeksi superfisial.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Luka infeksi dikaitkan erat dengan inflamasi berkepanjangan, penurunan ekspresi α -SMA dan penurunan densitas kolagen. Ekspresi α -SMA dan densitas kolagen mengalami penurunan saat kondisi pro-inflamasi dan infeksi yang dominan, sehingga memicu penghambatan penutupan dan penyembuhan luka^{2,8}. Penggunaan MSCs dalam penyembuhan luka telah terbukti dapat meningkatkan penyembuhan cedera kulit, termasuk luka akut. Namun, penelitian terbaru menunjukkan bahwa sekretom hipoksia MSCs, yang mengandung beberapa molekul dan sitokin dapat menginduksi regenerasi jaringan dan imunomodulasi, juga dapat meningkatkan penyembuhan luka. Sekretom MSCs telah terbukti meningkatkan jumlah fibroblas dermal dan pembuluh darah serta kepadatan kolagen, yang merupakan mediator penting dalam penyembuhan luka.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen α -SMA pada kelompok P1 (SH-MSCs 10%) dan P2 (SH-MSCs 20%) mengalami peningkatan secara signifikan dibandingkan kelompok tikus luka infeksi

superfisial yang tidak mendapatkan terapi (Kontrol negatif). Hal ini menunjukan bahwa peningkatan ekspresi gen α -SMA dapat meningkatkan penyembuhan luka dengan meningkatkan jumlah fibroblas dan pembuluh darah serta meningkatkan pembentukan kolagen, yang merupakan komponen penting dari matriks ekstraseluler.

TGF- β yang berasal dari SH-MSCs mengaktifkan jalur PI3K melalui jalur TGF- β yang melibatkan TGF- β reseptor I dan II. Aktivasi PI3K akan mengaktifkan Akt yang berdampak pada aktivasi mTOR. mTOR yang aktif akan menginduksi ekspresi SMAD2/3 yang berujung pada aktivasi SMAD2/3. SMAD2/3 yang dilepaskan memicu pelepasan α -SMA sehingga terjadi perubahan fibroblast menjadi myofibroblast yang berujung pada percepatan penyembuhan luka^{33,83}.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan peningkatan ekspresi α -SMA *inline* dengan peningkatan densitas kolagen sehingga terjadi percepatan penutupan luka. Kelompok P1 dan P2 meningkatkan densitas kolagen secara signifikan dibandingkan kontrol negatif. Hal ini diduga disebabkan karena adanya pengaruh dari IL-10 yang terkandung dalam SH-MSCs yang memiliki fungsi sebagai anti inflamasi dengan cara menghambat jalur NF- κ B melalui mekanisme IL-10 STAT3 *Pathways*.⁸⁷⁻⁸⁹ Penelitian ini sejalan dengan penelitian lainnya yang menggunakan gel sekretom SH-MSCs dosis 400 μ l dimana terdapat penurunan inflamasi pada adhesi peritoneal.⁹⁰ Pada penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa terjadi penurunan inflamasi melalui aktivasi jalur IL-10 STAT3 *pathways*. IL-10 akan berikatan dengan

IL-10R menghasilkan aktivasi dari JAK 1 yang menginduksi fosforilasi STAT3. Protein STAT3 akan masuk ke nucleus dan mengaktivasi sekuens mRNA SOSC3 yang kemudian akan diekspresikan secara intraseluler dan dapat menekan jalur pensinyalan proinflamasi, yaitu NF- κ B. Penekanan pada jalur NF- κ B akan menyebabkan penurunan sekresi sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-6.^{91,92} Percepatan penutupan luka yang ditandai dengan terbentuknya kolagen pada P1 dan P2 menandakan bahwa SH-MSCs mempercepat fase inflamasi akibat kandungan IL-10 pada SH-MSCs⁸⁰. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sekretom MSCs telah terbukti memiliki karakteristik sekretori, homing, dan imunomodulator, yang penting untuk regenerasi jaringan dan imunomodulasi.

Secretom MSCs dapat mempercepat penutupan luka dan meningkatkan angiogenesis dengan bertindak melalui interaksi parakrin. Penelitian terdahulu melaporkan SH-MSCs mengeluarkan berbagai sitokin dan kemokin, termasuk TGF- β , VEGF, dan IGF-1, yang mendorong migrasi dan proliferasi fibroblas dan keratinosit sehingga menginduksi pembentukan kolagen.⁹³ TGF- β pada SH-MSCs dapat mengatur sintesis kolagen dengan mendorong diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, yang bertanggung jawab untuk deposisi kolagen.⁹⁴ SH-MSCs juga mengeluarkan kolagen tipe 1 dan fibronectin, yang terlibat dalam perbaikan jaringan setelah terjadi luka.⁹⁵ Penggunaan SH-MSC dalam penyembuhan luka telah terbukti

menjadi pendekatan yang menjanjikan untuk perbaikan jaringan dan penyembuhan luka.

Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan kadar IL-10 setelah di berikan perlakuan gel SH-MSCs sehingga tidak diketahui langsung terkait proses inflamasi pada luka infeksi superfisial lebih lanjut. Pada penelitian ini juga tidak dilakukan analisis ekspresi gen TGF-B, dimana TGF-B adalah growth factor utama dalam proses remodeling penyembuhan luka yang mengatur ekspresi α -SMA. Pada penelitian ini juga tidak menganalisis keberadaan bakteri pada luka diakhir waktu pengamatan untuk memastikan bahwa bakteri sudah sepenuhnya mati.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen α -SMA pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.
2. Pemberian SH-MSCs dosis 10% dan 20% dalam sediaan gel terbukti secara bermakna berpengaruh terhadap peningkatan densitas kolagen pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.

6.2. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut tentang pengukuran kadar IL-10 setelah dilakukan pemberian SH-MSCs pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut tentang pengukuran kadar TGF-B setelah dilakukan pemberian SH-MSCs pada tikus galur *Wistar* model luka infeksi superfisial.
3. Perlu dilakukan pemeriksaan bakteri pada waktu penyembuhan luka infeksi.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Ibrahim MI, Moustafa GF, Al-Hamid ASA, Hussein MR. Superficial incisional surgical site infection rate after cesarean section in obese women: A randomized controlled trial of subcuticular versus interrupted skin suturing. *Arch Gynecol Obstet* 2014; **289**: 981–986.
- 2 Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, Huang YY, Bil de Arce VJ, Hamblin MR. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*. 2011; **2**. doi:10.4161/viru.2.4.16840.
- 3 Shi R, Gao S, Smith AH, Li H, Shao M, Shangguan J *et al*. Superoxide-induced Type I Collagen Secretion Depends on Prolyl 4-Hydroxylases. 2021. doi:10.1016/j.bbrc.2020.07.002.Superoxide-induced.
- 4 Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of smad2/3-dependent signaling pathways: Potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids. *Int J Mol Med* 2013; **31**: 1148–1152.
- 5 Grande R, Pacella S, di Giulio M, Rapino M, di Valerio V, Cellini L *et al*. NF-kB mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/Streptococcus mutans co-cultured cells. *Clin Oral Investig* 2015; **19**: 841–849.
- 6 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al*. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
- 7 Mekhla, Borle F. Determinants of superficial surgical site infections in abdominal surgeries at a Rural Teaching Hospital in Central India: A prospective study. *J Family Med Prim Care* 2019; **8**: 2258.

- 8 Lorette G, Beaulieu PH, Allaert FA, Mahmoudi A, Jarlier V. Superficial community-acquired skin infections: Prevalence of bacteria and antibiotic susceptibility in France. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2009; **23**: 1423–1426.
- 9 Zhou WC, Tan PF, Chen XH, Cen Y, You C, Tan L *et al.* Berberine-incorporated shape memory fiber applied as a novel surgical suture. *Front Pharmacol* 2019; **10**. doi:10.3389/fphar.2019.01506.
- 10 Kaye KS, Petty LA, Shorr AF, Zilberberg MD. Current epidemiology, etiology, and burden of acute skin infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2019; **68**: S193–S199.
- 11 Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, Amansyah F, Amansyah F, Berlian MA *et al.* Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Res* 2021; **10**: 1–19.
- 12 Jee MK, Im YB, Choi JI, Kang SK. Compensation of cATSCs-derived TGF β 1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatitis. *Cell Death Dis* 2013; **4**: 1–13.
- 13 Song J young, Kang HJ, Ju HM, Park A, Park H, Hong JS *et al.* Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts ameliorate atopic dermatitis in mice by reducing the T cell responses. *Sci Rep* 2019; **9**: 1–9.
- 14 Chen E, Liu G, Zhou X, Zhang W, Wang C, Hu D *et al.* Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF-kB signaling pathways. *FASEB Journal* 2018; **32**: 4917–4929.
- 15 Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* 2007; **179**: 1311–1323.
- 16 Sousa AM, Liu T, Guevara O, Stevens JA, Fanburg BL, Gaestel M *et al.* Smooth muscle α -actin expression and myofibroblast differentiation by TGF β are dependent upon MK2. *J Cell Biochem* 2007; **100**: 1581–1592.

- 17 Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014; 7: 301–311.
- 18 Lancellotti P, Oury C. IL-10 targets myofibroblasts and dampens cardiac fibrosis. *J Public Health Emerg* 2017. doi:10.21037/jphe.2017.10.03.
- 19 Li B, Wang JH. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing : Force generation and measurement. *J Tissue Viability* 2011; **20**: 108–120.
- 20 Shephard MT, Merkhani MM, Forsyth NR. Human Mesenchymal Stem Cell Secretome Driven T Cell Immunomodulation Is IL-10 Dependent. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 13596.
- 21 Golubinskaya PA, Sarycheva M V., Dolzhikov AA, Bondarev VP, Stefanova MS, Soldatov VO *et al*. Application of multipotent mesenchymal stem cell Secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Farmatsiya i Farmakologiya* 2020; **8**: 416–425.
- 22 Jung H, Son GM, Lee JJ, Park HS. Therapeutic effects of tonsil-derived mesenchymal stem cells in an atopic dermatitis mouse model. *In Vivo (Brooklyn)* 2021; **35**: 845–857.
- 23 Mirshekar M, Afkhami H, Razavi S, Jazi FM, Darban D, Ohadi E *et al*. Potential antibacterial activity and healing effect of topical administration of bone marrow and adipose mesenchymal stem cells encapsulated in collagen-fibrin hydrogel scaffold on 3rd degree burn wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns* 2023. doi:10.1016/J.BURNS.2023.01.005.
- 24 Kim JH, Green DS, Ju YM, Harrison M, Vaughan JW, Atala A *et al*. Identification and characterization of stem cell secretome-based recombinant proteins for wound healing applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2022; **10**. doi:10.3389/fbioe.2022.954682.
- 25 Silveira BM, Ribeiro TO, Freitas RS, Carreira ACO, Gonçalves MS, Sogayar M *et al*. Secretome from human adipose-derived mesenchymal stem cells promotes blood vessel formation and pericyte coverage in

- experimental skin repair. *PLoS One* 2022; **17**. doi:10.1371/journal.pone.0277863.
- 26 An YH, Kim DH, Lee EJ, Lee D, Park MJ, Ko J *et al*. High-Efficient Production of Adipose-Derived Stem Cell (ADSC) Secretome Through Maturation Process and Its Non-scarring Wound Healing Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; **9**. doi:10.3389/fbioe.2021.681501.
 - 27 Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Sa'dyah NAC, Tjipta A, Chodidjah C. The Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* 2020; **11**: 134.
 - 28 Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; **57**: 376–379.
 - 29 Lunardi LO, Martinelli CR, Lombardi T, Soares EG, Martinelli C. Modulation of MCP-1 , TGF- β 1 , and α -SMA Expressions in Granulation Tissue of Cutaneous Wounds Treated with Local Vitamin B Complex : An Experimental Study. 2014; : 98–107.
 - 30 Baillie R, Coombes RC, Smith J. Multiple forms of TGF- β 1 in breast tissue: A biologically active form of the small latent complex of TGF- β 1. *European Journal of Cancer Part A* 1996; **32**: 1566–1573.
 - 31 Xia R, Sheng X, Xu X, Yu C, Lu H. Hesperidin induces apoptosis and GO/G1 arrest in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Int J Mol Med* 2018; **41**: 464–472.
 - 32 Talele NP, Fradette J, Davies JE, Kapus A, Hinz B. Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 2015; **4**: 1016–1030.
 - 33 Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B *et al*. TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring harbor Perspectives Biology* 2018; : 1–49.
 - 34 Luo Y, Ren Z, Du B, Xing S, Huang S, Li Y *et al*. Structure Identification of ViceninII Extracted from *Dendrobium officinale* and the Reversal of

- TGF- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells through TGF- β /Smad and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways. *Molecules* 2019; **24**. doi:10.3390/molecules24010144.
- 35 Hoenig LJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases. *Skinmed* 2017; **15**: 240.
- 36 Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 929–958.
- 37 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; **2**: 5–10.
- 38 Chung HJ, Uitto J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol Clin* 2010; **28**: 93–105.
- 39 Zhang YZ, Ran LY, Li CY, Chen XL. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 6098–6107.
- 40 Fan J, Zhuang Y, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients* 2013; **5**: 223–233.
- 41 Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SEG, Kang S, Fisher GJ *et al*. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology* 2006; **168**: 1861–1868.
- 42 Galicka A, Jolanta N. Stimulation of collagen biosynthesis by flavonoid glycosides in skin fibroblasts of osteogenesis imperfecta type I and the potential mechanism of their action. *Int J Mol Med* 2007; **20**: 889–895.
- 43 Fernandez F. BIOSYNTHESIS OF COLLAGEN Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes Preparation of the Ribosomal Suspension. *J Cell Biol* 1967; **33**: 27–42.
- 44 Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1341–1353.

- 45 Omari S, Makareeva E, Gorrell L, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Leikin S. Mechanisms of procollagen and HSP47 sorting during ER-to-Golgi trafficking. *Matrix Biol* 2020; : 1–16.
- 46 Xi Q. *Razumikhin-type theorems for impulsive differential equations with piecewise constant argument of generalized type*. 2018 doi:10.1186/s13662-018-1725-5.
- 47 Ishikawa Y, Bächinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2013; **1833**: 2479–2491.
- 48 Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C *et al*. Mesenchymal stem cells from the Wharton’s jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; **12**: 218–226.
- 49 Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* 2018.
- 50 Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.
- 51 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina* 2019; **38**: 164.
- 52 Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10.
- 53 Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
- 54 Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Rep* 2016; **2**: 168–173.
- 55 Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19092783.

- 56 Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M *et al.* Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; **7**: 305–310.
- 57 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**: 1–14.
- 58 Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* 2019; **8**: 467.
- 59 Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 552.
- 60 Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H *et al.* Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–8.
- 61 Kevin Range and DMYAM. 基因的改变NIH Public Access. *Bone* 2012; **23**: 1–7.
- 62 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al.* Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; **116**: 351–358.
- 63 Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; **36**: 1482–1491.
- 64 Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct

- interaction with Smad4 protein. *Journal of Biological Chemistry* 2013; **288**: 8737–8749.
- 65 Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: 1196–1202.
 - 66 Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–15.
 - 67 Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, Dubick MA, Christy RJ, Nicholson SE *et al.* The cutaneous microbiome and wounds: New molecular targets to promote wound healing. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19092699.
 - 68 Saleh K, Schmidtchen A. Surgical site infections in dermatologic surgery: Etiology, pathogenesis, and current preventative measures. *Dermatologic Surgery*. 2015; **41**: 537–549.
 - 69 Shoma Suresh K, Bhat S, Guru BR, Muttigi MS, Seetharam RN. A nanocomposite hydrogel delivery system for mesenchymal stromal cell secretome. *Stem Cell Res Ther* 2020; **11**: 1–14.
 - 70 Waters R, Alam P, Pacelli S, Chakravarti AR, Rafeeq PH, Paul A *et al.* HHS Public Access. 2019; : 95–106.
 - 71 Maxey J. AADE-11-NTCE-23 Viscosity and Gel Structure : The Unseen Results of Their Manipulation. 2011.
 - 72 Trostyanskaya YB, Makarova SB, Aptova TA, Murashko IN. Hydrophobic and hydrophilic gels of various permeabilities prepared by copolymerization of styrene with p-divinylbenzene. *Polymer Science USSR* 1965; **7**: 2282–2289.
 - 73 Cabral MES, Ramos AN, Macedo AJ, Trentin DS, Treter J, Manzo RH *et al.* Formulation and quality control of semi-solid containing harmless bacteria by-products: Chronic wounds pro-healing activity. *Pharm Dev Technol* 2015; **20**: 911–918.

- 74 Nair A, Jacob S, Al-Dhubiab B, Attimarad M, Harsha S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; **49**: 423–434.
- 75 Xie WJ, Zhang YP, Xu J, Sun XB, Yang FF, Kalia Y. The effect and mechanism of transdermal penetration enhancement of Fu's cupping therapy: New physical penetration technology for transdermal administration with Traditional Chinese Medicine (TCM) characteristics. *Molecules* 2017; **22**. doi:10.3390/molecules22040525.
- 76 Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations . *Lab Anim Res* 2011; **27**: 1.
- 77 Ribeiro FM, Volpato H, Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, de Souza RO, Fonseca MJV *et al.* The extended production of UV-induced reactive oxygen species in L929 fibroblasts is attenuated by posttreatment with *Arrabidaea chica* through scavenging mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 2018; **178**: 175–181.
- 78 Hanke J. Role of NFκB and Bcl-2 in IGFBP-3 mediated intrinsic apoptosis. *Graduate School - New Brunswick Rutgers, The State university of New Jersey* 2017.
- 79 Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res* 2018; **11**: 407–419.
- 80 Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules* 2020; **10**: 1–15.
- 81 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina* 2019; **38**: 164–171.
- 82 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**: 1–17.

- 83 Xu C, Yu P, Han X, Du L, Gan J, Wang Y *et al.* TGF- β Promotes Immune Responses in the Presence of Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology* 2014; **192**: 103–109.
- 84 Bar-Or D, Thomas GW, Rael LT, Gersch ED, Rubinstein P, Brody E. Low Molecular Weight Fraction of Commercial Human Serum Albumin Induces Morphologic and Transcriptional Changes of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 2015; **4**: 945–955.
- 85 Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, Amansyah F, Amansyah F, Berlian MA *et al.* Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Res* 2021; **10**: 1–19.
- 86 Walter MR. The molecular basis of IL-10 function: From receptor structure to the onset of signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; **380**: 191–212.
- 87 Wilson EB, Kidani Y, Elsaesser H, Barnard J, Raff L, Karp CL *et al.* NIH Public Access. 2013; **11**: 481–491.
- 88 Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **133**: 11–21.
- 89 Mühl H, Dhingra S, Booz GW, Goren NB, Cevey ÁC, Penas FN *et al.* IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org 2019; **1**: 1267.
- 90 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**: 3937–3943.
- 91 Mühl H, Dhingra S, Booz GW, Goren NB, Cevey ÁC, Penas FN *et al.* IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org 2019; **1**: 1267.
- 92 Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 170–181.

- 93 Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: Novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7. doi:10.1186/s13287-016-0303-6.
- 94 Bian D, Wu Y, Song G, Azizi R, Zamani A. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther.* 2022; 13. doi:10.1186/s13287-021-02697-9.
- 95 Jiang D, Scharffetter-Kochanek K. Mesenchymal Stem Cells Adaptively Respond to Environmental Cues Thereby Improving Granulation Tissue Formation and Wound Healing. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8. doi:10.3389/fcell.2020.00697.

