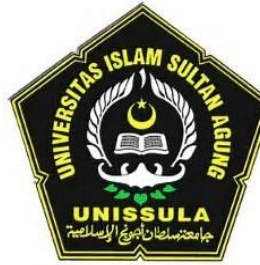


**PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP  
EKSPRESI PDGF DAN IL-1b**

**(Studi Eksperimental pada tikus *Wistar* model luka hiperglikemi)**

**Tesis**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat  
Magister (S2)**



**Disusun Oleh:**

**Nensi Rianti  
MBK.22.19.010292**

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP  
EKSPRESI PDGF DAN IL-1 $\beta$**

(Studi Eksperimental pada tikus *Wistar* model luka hiperglikemi)

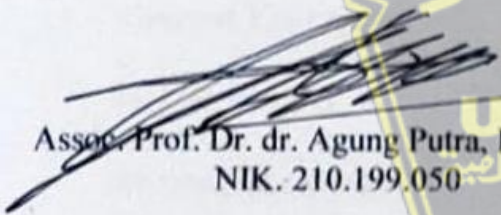
disusun oleh  
**Nensi Rianti**  
MBK.22.19.010292

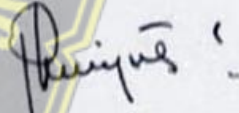
yang dipertahankan di depan Tim Penguji  
Oktober 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui.


Pembimbing 1

Pembimbing 2

  
Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si, Med  
NIK. 210.199.050

  
Prof. Dr. dr. Hj. Prasetyowati Subchan,  
Sp.D.V.E., Subsp.D.K.E, FINS DV, FAADV  
NIDN: 8951110021

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

  
Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si, Med  
NIK. 210.199.050

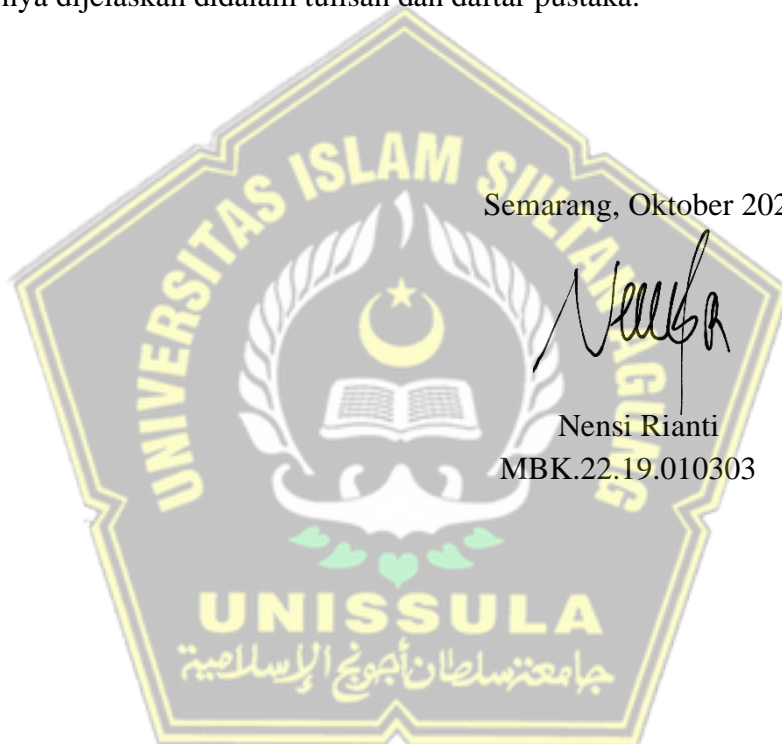
## PERNYATAAN

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

Semarang, Oktober 2023



Nensi Rianti  
MBK.22.19.010303



## RIWAYAT HIDUP

### Identitas

Nama : Nensi Rianti  
Tempat/Tanggal Lahir : Serdang Menang/27-03-1992  
Agama : Islam  
Jenis kelamin : Perempuan

### Riwayat Pendidikan

SDN 2 Sp Padang : 1997-2003  
SMP N 1 Sp Padang : 2003-2006  
SMA N 1 Sp Padang : 2006-2009  
S1 Universitas Sriwijaya : 2009-2016  
S2 Biomedik FK Unissula : 2022-Sekarang

### Riwayat Pekerjaan

Praktek Pribadi

### Riwayat Keluarga

Ayah : alm. Kusnadi  
Ibu : Suryani  
Suami : Saddam Roberto, SE, M.Si.,Ak  
Anak : Alkhalifi Zikri



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat, nikmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat mengajukan proposal tesis yang berjudul “PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI PDGF DAN IL-1b (Studi Eksperimental pada tikus *Wistar* model luka hiperglikemi)”. Tesis ini diajukan sebagai bagian dari tugas akhir menyelesaikan Studi di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang,
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp. F selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan selaku pembimbing 1, yang telah memberikan semangat dalam penyusunan laporan tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp. KK (K) selaku Pembimbing 2 yang telah memberikan banyak perhatian, kritik, saran, serta dorongan semangat selama penyusunan laporan tesis ini
5. Dr. dr. Danis Pertiwi, M.Si. Med, Sp.PK selaku penguji yang telah meluangkan waktu, memberikan banyak masukan untuk perbaikan serta membantu dalam perbaikan laporan tesis.

6. Dr. Dra. Atina Husaana, M,Si, Apt selaku penguji yang telah meluangkan waktu, memberikan kritik dan saran untuk perbaikan laporan tesis.
7. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp. A selaku penguji yang juga telah meluangkan waktu, memberikan kritik dan saran untuk perbaikan laporan tesis.
8. Para Dosen Pengajar Magister Biomedik yang telah memberikan masukan ide, semangat, dan membantu segala hal terkait dalam penyelesaian laporan tesis ini.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan tesis ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Semarang, Oktober 2023



Nensi Rianti  
MBK.22.19.010292

## DAFTAR ISI

	Halaman
TESIS .....	i
PERNYATAAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Originalitas Penelitian .....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Ekspresi gen PDGF ( <i>Platelet derived growth factor</i> ) .....	9
2.2 Ekspresi gen IL-1b .....	11
2.3 <i>Mesenchymal stem cells</i> (MSC) .....	15
2.4 Luka Hiperglikemi .....	17

2.5 Pengaruh pemberian gel MSC <i>secretome hypoxia</i> terhadap ekspresi gen PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur <i>Wistar</i> model luka hiperglikemi. ....	20
<b>BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>	
<b>PENELITIAN</b> .....	22
3.1 Kerangka Teori.....	22
3.2 Kerangka konsep .....	25
3.3 Hipotesis.....	25
<b>BAB IV METODELOGI PENELITIAN</b> .....	26
4.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian .....	26
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	27
4.3 Subyek dan Sampel Penelitian .....	29
4.3.1 Subyek Penelitian.....	29
4.3.2 Sampel Penelitian.....	29
4.4 Teknik Pengambilan Sampel .....	30
4.5 Besar Sampel .....	30
4.6 Alat dan Reagensia.....	30
4.6.1 Alat.....	30
4.6.2 Bahan penelitian .....	31
4.7 Cara Penelitian.....	31
4.7.1 Perolehan Ethical Clearance .....	31
4.7.2 Isolasi MSC dari <i>Umbilical Cord</i> .....	31
4.7.3 Pembuatan Hipoksia dan TFF.....	32
4.7.4 Pembuatan Sediaan gel MSC <i>secretome hypoxia</i> .....	32
4.7.5 Pembuatan Model Tikus Hiperglikemi.....	33
4.7.6 Validasi pemeriksaan luka hiperglikemi.....	33



4.7.7 Perawatan Luka hiperglikemi.....	35
4.7.8 Proses isolasi RNA dan sintesis cDNA.....	36
4.7.9 Diagnosis Ekpresi gen PDGF dan IL-1b metode RTq-PCR .....	37
4.8 Tempat dan Waktu Peneltian .....	38
4.8.1 Tempat Penelitian.....	38
4.8.2 Waktu Penelitian.....	38
4.9 Analisa Data .....	38
4.10 Alur penelitian.....	39
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>40</b>
5.1 Hasil Penelitian.....	40
5.1.1 Isolasi MSC <i>secretome</i> dari <i>Umbilical Cord</i> .....	40
5.1.2 Validasi kadar gula darah pada tikus model hiperglikemi.....	42
5.1.3 Gambaran makroskopis luka hiperglikemi.....	44
5.1.4 Hasil histopatologi pewarnaan HE .....	45
5.1.5 Efek pemberian MSC <i>secretome hypoxia</i> terhadap ekspresi gen PDGF..	46
5.1.6 Efek pemberian MSC <i>secretome hypoxia</i> terhadap ekspresi gen IL-1b...	47
5.2 Pembahasan.....	49
<b>BAB VI KESIMPULAN.....</b>	<b>54</b>
6.1 Kesimpulan.....	54
6.2 Saran.....	54
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>63</b>
Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i> .....	63
Lampiran 2. Surat penelitian .....	64
Lampiran 3. Statistik ekspresi gen PDGF .....	65

Lampiran 4. Statistik ekspresi gen IL-1b .....	66
Lampiran 5. Foto kegiatan penelitian.....	68



## DAFTAR SINGKATAN

ACE	: <i>Angiotensin converting enzyme</i>
ADP	: <i>Adenosin diposfat</i>
AD-MSC	: <i>Preconditioned diabetic stem cells</i>
AGEs	: <i>Advance glycation end product b</i>
bFGF	: <i>basic Fibroblast growth factor</i>
CXCL4	: <i>Differential effect of platelet factor 4</i>
DAMP	: <i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
ERK	: <i>Ekstraseluler regulated kinase</i>
FAK	: <i>Focal adhesion kinase signaling mediated</i>
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
G-CFS	: <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia inducible factor</i>
HGF	: <i>Hepatocyte growth factor</i>
iNOS	: <i>Inducible nitric oxide</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like growth factors 1</i>
IL-1b	: <i>Interleukin 1b</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
IL-8	: <i>Interleukin 8</i>
IL-10	: <i>Interleukin 10</i>

mTOR	: <i>Mammalian target of rapamycin</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
MSC	: <i>Mesenchymal stem cell</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>
PAMPS	: <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
PI3K/Akt	: <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	: <i>Protein kinase C</i>
PLC-γ	: <i>Fosfolipase C-γ</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SDF	: <i>Stromal cell derived factor</i>
Shc	: <i>Src homology and Collagen</i>
SH-MSC	: <i>Secretome hypoxia mesenchymal stem cell</i>
TIMPs	: <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF-α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TGF-β1	: <i>Transforming growth factor-β 1</i>
TGFα	: <i>Transforming growth facto-α</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur molekuler PDGF.....	9
Gambar 2.2 Jalur pensinyalan PDGF.....	10
Gambar 2.3 Jalur IL-1b dalam gangguan penyembuhan luka. ....	13
Gambar 2.4 Mekanisme penyembuhan luka pasien diabetes.....	14
Gambar 2.5 Jalur pensinyalan yang menargetkan diabetes melitus terkait PDGF dan komplikasinya.....	18
Gambar 3.1 Skema kerangka teori.....	24
Gambar 3.2 Skema kerangka konsep.....	25
Gambar 4.1 Skema alur penelitian.....	39
Gambar 5.1 Isolasi MSC dengan sel berbentuk spindle-like. ....	41
Gambar 5.2 (a) MSC berdiferensiasi menjadi osteosit dan (b) MSC berdiferensiasi menjadi Adiposit.....	41
Gambar 5.3 Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31 .....	42
Gambar 5.4 Hasil validasi kadar glukosa pada tikus kelompok perlakuan.....	43
Gambar 5.5 Makroskopis luka hiperglikemi.....	44
Gambar 5.6 Histopatologi pewarnaan HE .....	45
Gambar 5.7 Rerata Ekspresi gen PDGF antar kelompok perlakuan.....	47
Gambar 5.8 Ekspresi rerata, ekspresi gen IL-1b antar kelompok perlakuan .....	49

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 5.1 Hasil validasi kadar glukosa pada tikus kelompok hiperglikemi.....	43
Tabel 5.2 Ekspresi rerata, normalitas dan homogenitas PDGF antar kelompok perlakuan .....	46
Tabel 5.3 Ekspresi rerata, normalitas dan homogenitas ekspresi gen IL-1b antar kelompok perlakuan .....	48



## ABSTRAK

Latar Belakang: Kondisi luka dengan hiperglikemik membutuhkan waktu lebih lama untuk sembuh, glukosa yang tinggi mengakibatkan peningkatan sel inflamasi, penurunan proses angiogenesis dan produksi *growth factor*. Perawatan pemberian antibiotik, *surgical* maupun debridemen dapat meningkatkan risiko amputasi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian gel MSC *secretome hypoxia* terhadap ekspresi PDGF dan IL-1b pada tikus *Wistar* model luka hiperglikemi. Metode: Penelitian eksperimen laboratorium *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Sampel berjumlah 30 ekor tikus *Wistar*, dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok tikus sehat (P1), kontrol negatif (P2), kontrol positif dengan gentamicin (P3), gel *secretome* dosis 20  $\mu\text{L}$ /tikus (P4) dan gel *secretome* dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus (P5). Perlakuan gel MSC *secretome hypoxia* 10 hari, kemudian sampel jaringan kulit diperiksa dengan metode RTq-PCR untuk menganalisis ekspresi gen PDGF dan IL-1b. Hasil Penelitian: Analisis ekspresi gen PDGF terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan menggunakan uji *Kruskal Wallis* dengan hasil 0,018 ( $p < 0,05$ ), namun tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok dengan uji *Mann Whitney* ( $p < 0,05$ ). Analisis ekspresi gen IL-1b terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan menggunakan uji *Kruskal Wallis* dengan hasil 0,001 ( $p < 0,05$ ), berbagai dosis gel *secretome* berpengaruh menurunkan ekspresi gen IL-1b dengan uji *Mann Whitney* didapatkan hasil 0,004 ( $p < 0,05$ ). Penurunan paling signifikan pada dosis *secretome* 40  $\mu\text{L}$ /tikus. Kesimpulan: Gel MSC *secretome hypoxia* dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus efektif berpengaruh menurunkan ekspresi gen IL-1b pada tikus *Wistar* model luka hiperglikemi, Namun berbagai dosis Gel MSC *secretome hypoxia* tidak berbeda signifikan meningkatkan ekspresi gen PDGF.

Kata Kunci: PDGF, IL-1b, Gel MSC *secretome hypoxia*, luka hiperglikemi

## ABSTRACT

Background: Hyperglycemic wounds take longer to heal, high glucose results in an increase in inflammatory cells, a decrease in the angiogenesis process and the production of growth factors. Antibiotic treatment, surgery or debridement can increase the risk of amputation. The aim of this study was to determine the effect of administering MSC secretome hypoxia gel on the expression of PDGF and IL-1b in Wistar rats with a hyperglycemic injury model. Method: In vivo laboratory experimental research with a Post Test Only Control Group Design. The samples consisted of 30 Wistar rats, divided into 5 groups, namely healthy rats (P1), negative control (P2), positive control with gentamicin (P3), gel secretome dose of 20  $\mu$ L/rat (P4) and gel secretome dose of 40  $\mu$ L/ mice (P5). MSC secretome hypoxia gel treatment for 10 days, then skin tissue samples were examined using the RTq-PCR method to analyze PDGF and IL-1b gene expression. Results: Analysis of PDGF gene expression showed significant differences between treatment groups using the *Kruskal Wallis* test with a result of 0.018 ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences between groups using the *Mann Whitney* test ( $p < 0.05$ ). Analysis of IL-1b gene expression showed significant differences between treatment groups using the *Kruskal Wallis* test with a result of 0.001 ( $p < 0.05$ ), various doses of secretome gel had an effect on reducing IL-1b gene expression using the *Mann Whitney* test with a result of 0.004 ( $p < 0, 05$ ). The most significant decrease was at a secretome dose of 40  $\mu$ L/mouse. Conclusion: MSC secretome hypoxia gel at a dose of 40  $\mu$ L/mouse effectively reduces IL-1b gene expression in Wistar rats with a hyperglycemic wound model. However, various doses of MSC secretome hypoxia gel do not significantly increase PDGF gene expression.

Keywords: PDGF, IL-1b, Gel MSC secretome hypoxia, hyperglycemic wounds



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kontrol glikemik yang buruk dalam jangka panjang berdampak negatif pada pemulihan luka.<sup>1</sup> Kondisi luka dengan hiperglikemik membutuhkan waktu lebih lama untuk sembuh.<sup>2</sup> Sulitnya penyembuhan luka disebabkan oleh glukosa yang tinggi pada *microenvironment* dan berbagai faktor biologis. Luka mudah rusak, sulit sembuh, dan akhirnya berkembang menjadi luka kronis.<sup>1</sup> Penyembuhan luka menjadi terhambat akibat peningkatan sel inflamasi, penurunan proses angiogenesis dan penurunan produksi *growth factor*.<sup>3</sup> Hiperglikemia diketahui menginduksi ekspresi *interleukin 1b* (IL-1b) di sejumlah tipe sel yang berbeda di setiap kejadian luka. Jalur IL-1b dapat menjadi bagian dari *loop* umpan balik positif yang mempertahankan peradangan pada luka kronis dan berkontribusi terhadap gangguan penyembuhan.<sup>4</sup> *Platelet-derived growth factor* (PDGF) merupakan faktor pertumbuhan yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel, PDGF mendorong penyembuhan luka dengan memperkuat migrasi kemotaktik, mitosis dan proliferasi sel inflamasi serta fibroblas untuk mendorong pembentukan jaringan granulasi pada luka.<sup>5</sup>

Perawatan luka hiperglikemi dengan pemberian antibiotik, *surgical* maupun debridemen, masih dapat meningkatkan risiko amputasi dengan kekambuhan yang sering.<sup>6</sup> Terapi faktor pertumbuhan menjadi strategi yang menarik untuk mempercepat penutupan luka, MSC adalah sel stroma multipoten yang memiliki kapasitas untuk meregenerasi kerusakan jaringan.<sup>7</sup> Oleh karena itu, pendekatan terapi tambahan yang efektif serta aman diperlukan terhadap luka, salah satunya dengan

*mesenchymal stem cells* (MSC) *secretome hypoxia* yang dapat berpolarisasi menjadi sitokin anti-inflamasi di lingkungan hipoksia dan menghasilkan berbagai sitokin anti-inflamasi dan faktor pertumbuhan.<sup>8</sup>

Penyembuhan luka menjadi terganggu akibat adanya komplikasi penyakit yang mengurangi aktivitas fisik dan menyebabkan luka kronis sampai dengan amputasi.<sup>9</sup> Hiperglikemi pada pasien diabetes, penyakit pembuluh darah, dan neuropati adalah kondisi yang menghambat proses penyembuhan luka.<sup>4</sup> Kondisi luka pada hiperglikemia terkait dengan komplikasi diabetes melitus, mempengaruhi 439 juta orang secara global pada tahun 2030 (berusia 20 hingga 79 tahun), berpotensi menyebabkan terjadinya ulkus kronis dan meningkatkan risiko amputasi 17 hingga 40 kali lebih tinggi.<sup>10</sup>

Penelitian membuktikan bahwa MSC *secretome hypoxia* mengeluarkan berbagai mediator dan faktor pertumbuhan yang mendorong regenerasi kulit yaitu PDGF, *Hepatocyte growth factor* (HGF), *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Fibroblast growth factor* (FGF) dan *Transforming growth factor- $\beta$  1* (TGF- $\beta$ 1). *Secretome hypoxia* memiliki potensi anti-inflamasi dan memiliki kemampuan untuk mendeteksi keberadaan molekul pensinyalan cedera, bermigrasi ke area cedera dan mempercepat penyembuhan luka.<sup>11</sup> Penelitian *In Vitro* menunjukkan bahwa MSC *secretome* mengaktifkan kaskade pensinyalan *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K/Akt) atau *Focal adhesion kinase signaling mediated* (FAK)/ *Ekstraseluler regulated kinase* (ERK1/2) dan selanjutnya meningkatkan kemampuan proliferasi dan migrasi dari berbagai jenis sel kulit, seperti fibroblas, keratinosit, dan sel epitel vaskular sehingga mempercepat kontraksi luka, penghambatan jalur pensinyalan ini

mengakibatkan efek menguntungkan yang diinduksi oleh sekresi pada berbagai sel kulit.<sup>12</sup> Penelitian preklinis lainnya melaporkan efek antioksidan dan antiinflamasi rutin terhadap penyembuhan luka pada tikus hiperglikemik yang diinduksi *streptozotocin*. Rutin meningkatkan produksi enzim antioksidan yang diinduksi oleh faktor nuklir *erythroid related factor 2* (NRF2), menghambat ekspresi *matrix metalloproteinases* (MMPs) diatur oleh NF- $\kappa$ B, dan menurunkan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mengurangi stres oksidatif dan respons inflamasi pada tikus hiperglikemi sehingga meningkatkan penyembuhan luka dan selanjutnya mengurangi risiko perkembangan ulkus.<sup>1</sup>

PDGF pada konsentrasi 20-200 pmol mempercepat infiltrasi sel inflamasi dan fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler dan pembentukan kolagen pada luka, sehingga menghasilkan proses penyembuhan yang cepat dibandingkan dengan model yang tidak diobati.<sup>13</sup> Studi *In Vivo* melaporkan bahwa beberapa faktor dapat mempengaruhi fenotip makrofag yang diekspresikan pada luka kronis, memiliki potensi untuk mempertahankan lingkungan proinflamasi. Makrofag pada luka kronis mengekspresikan molekul proinflamasi IL-1 $\beta$  tingkat tinggi, *matrix metalloproteinase 9* (MMP-9), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan penurunan ekspresi penanda nonprohealing *insulin-like growth factors 1* (IGF-1), *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), dan *interleukin 10* (IL-10). Pada kondisi hiperglikemi diketahui menginduksi ekspresi interleukin IL-1 $\beta$  di sejumlah sel yang berbeda, jalur IL-1 $\beta$  menjadi bagian dari umpan balik positif yang menopang peradangan pada luka kronis dan berkontribusi pada gangguan penyembuhan.<sup>4</sup>

MSC *secretome hypoxia* dapat menekan sekresi sitokin pro-inflamasi

sehingga menurunkan kadar IL-6, IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-4 dan mempercepat perbaikan kondisi luka pada tikus<sup>14</sup> Penelitian mengungkapkan MSC *secretome hypoxia* mensekresikan *growth factor* yang mendukung regenerasi kulit, seperti PDGF mengatur aktivitas seluler pada proses penyembuhan luka, mendeteksi keberadaan molekul sinyal yang cedera, bermigrasi ke area cedera dan mempercepat penyembuhan luka.<sup>3,11</sup> Berbagai penelitian melaporkan potensi MSC *secretome* prakondisi dalam mereparasi jaringan luka, meningkatkan sifat regenerative dalam sekresi sel. MSC *secretome hypoxia* sebagai sumber sekresi pelindung jaringan dan regeneratif dalam penyembuhan luka.<sup>15</sup> Namun potensi gel MSC *secretome hypoxia* dalam meregenerasi luka hiperglikemi belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlunya melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh gel MSC *secretome hypoxia* terhadap ekspresi gen PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi.

## **1.2 Rumusan Masalah Penelitian**

Apakah gel MSC *secretome hypoxia* berpengaruh terhadap ekspresi PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui pengaruh pemberian gel MSC *secretome hypoxia* terhadap ekspresi PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Menganalisis perbedaan ekspresi PDGF tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- b. Menganalisis perbedaan ekspresi IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* dibandingkan dengan kelompok kontrol.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### a. Manfaat teoritis

Hasil dari penelitian dapat menambah literasi dan pengetahuan bahwa pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dapat meningkatkan ekspresi gen PDGF dan menurunkan ekspresi gen IL-1b pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi.

#### b. Manfaat praktis

Penelitian ini memberikan pertimbangan ide alternatif terapi menggunakan MSC *secretome hypoxia* pada kasus luka hiperglikemi.

## 1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1. 1 Originalitas Penelitian

Penulis	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Karuniawan, A. M. <sup>16</sup>	Uji Efek Penyembuhan Luka Sayat Salep Ekstrak Ikan Toman (Channa Micropeltes) Secara Topikal Pada Tikus Yang Diinduksi <i>Streptozotocin</i> .	<i>Experimetal</i> <i>In Vitro</i>	Penggunaan topikal ekstrak ikan toman meningkatkan penyembuhan luka pada tikus hiperglikemi. Pada hari ke 9, dosis 3 memberikan efek penyembuhan luka paling cepat dengan persentase rata-rata 91,62% dibandingkan dengan dosis 1 dan 2 (masing-masing 86,66% dan 54,69%) yang memiliki efek lebih lambat.
Chen LY, Huang CN, Liao CK, et al. <sup>1</sup>	<i>Effects of rutin on wound healing in hyperglycemic rats.</i>	<i>Experimetal</i> <i>In Vivo</i>	<i>Rutin</i> mengurangi stres oksidatif dan respons inflamasi pada tikus hiperglikemik, meningkatkan penyembuhan luka dan selanjutnya mengurangi risiko luka borok.
Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Kohl TJ. <sup>4</sup>	<i>Blocking interleukin-1<math>\beta</math> induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes.</i>	<i>Experimetal</i> <i>In Vivo</i>	Dibandingkan dengan makrofag, makrofag luka kronis mengekspresikan molekul proinflamasi tingkat tinggi IL-1 $\beta$ , matrix metalloproteinase (MMP)-9, dan TNF- $\alpha$ .
Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. <sup>17</sup>	<i>Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. Molecular Therapy.</i>	<i>Experiment al</i> <i>In Vivo</i> <i>In Vitro</i>	Kelompok yang menerima perawatan secretome menunjukkan penyembuhan luka yang cepat dan jaringan parut yang lebih sedikit. Selain itu, penelitian lebih lanjut menggunakan fibroblas manusia sekretom berfungsi sebagai kontrol protein manusia. Ketika luka diobati dengan sekresi sel punca, ketebalan epidermal dan dermal meningkat secara nyata lebih cepat

			dari pada sekresi fibroblas manusia.
Ahmadi H, Amini A, Fadaei, Fathabady F, et al. <sup>18</sup>	<i>Transplantation of photobiomodulation-preconditioned diabetic stem cells accelerates ischemic wound healing in diabetic rats.</i>	<i>Experiment al In Vivo dan In Vitro</i>	Dalam model tikus diabetes dengan luka penyembuhan tertunda yang terinfeksi iskemik, prakondisi AD-MSK diabetes dengan fotobiomodulasi in vitro yang dikombinasikan dengan fotobiomodulasi in vivo sangat mempercepat penyembuhan.

Penelitian terdahulu menggunakan salep ekstrak ikan Toman (*Channa Micropeltes*) penggunaan topikal ekstrak ikan toman meningkatkan penyembuhan luka pada tikus hiperglikemi. Pada hari ke 9, dosis 3 memberikan efek penyembuhan luka paling cepat dengan persentase rata-rata 91,62% dibandingkan dengan dosis 1 dan 2 (masing-masing 86,66% dan 54,69%) yang memiliki efek lebih lambat.<sup>16</sup> Berbeda dengan penelitian yang menganalisis perbedaan ekspresi PDGF dan IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* yang dosis 20 µL/tikus dan 40 µL/tikus dengan kelompok kontrol.

Penelitian terdahulu menggunakan *rutin*, hasil penelitian menunjukkan *rutin* mengurangi stres oksidatif dan respons inflamasi pada tikus hiperglikemik, meningkatkan penyembuhan luka dan selanjutnya mengurangi risiko luka borok.<sup>1</sup> Berbeda dengan penelitian ini menganalisis perbedaan ekspresi PDGF dan IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* yang dosis 20 µL/tikus dan 40 µL/tikus dengan kelompok kontrol.

Penelitian terdahulu menggunakan antibodi IL-1b (Sistem R&D) dengan hasil penelitian dibandingkan dengan makrofag turunan monosit darah yang tidak aktif, makrofag luka kronis mengekspresikan molekul proinflamasi tingkat tinggi IL-

1b, *matrix metalloproteinase* (MMP)-9, dan TNF- $\alpha$ .<sup>4</sup> Berbeda dengan penelitian yang menganalisis perbedaan ekspresi PDGF dan IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* yang dosis 20  $\mu$ L/tikus dan 40  $\mu$ L/tikus dengan kelompok kontrol.

Penelitian terdahulu menggunakan *Stem Cell Secretome* didapat hasil penelitian dengan kelompok yang menerima perawatan *secretome* menunjukkan penyembuhan luka yang cepat dan jaringan parut yang lebih sedikit. Selain itu, penelitian lebih lanjut menggunakan fibroblas, *secretome* berfungsi sebagai kontrol protein manusia. Ketika luka diobati dengan sekresi sel punca, ketebalan epidermal dan dermal meningkat secara nyata lebih cepat daripada sekresi fibroblas.<sup>17</sup> Berbeda dengan penelitian yang menganalisis perbedaan ekspresi PDGF dan IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* yang dosis 20  $\mu$ L/tikus dan 40  $\mu$ L/tikus dengan kelompok kontrol.

Penelitian terdahulu menggunakan *preconditioned diabetic stem cells*, dilaporkan hasil penelitian model tikus diabetes dengan luka penyembuhan tertunda yang terinfeksi iskemik, prakondisi AD-MSc diabetes dengan fotobiomodulasi in vitro yang dikombinasikan dengan fotobiomodulasi in vivo sangat mempercepat penyembuhan.<sup>18</sup> Berbeda dengan penelitian yang menganalisis perbedaan ekspresi PDGF dan IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* yang dosis 20  $\mu$ L/tikus dan 40  $\mu$ L/tikus dengan kelompok kontrol.

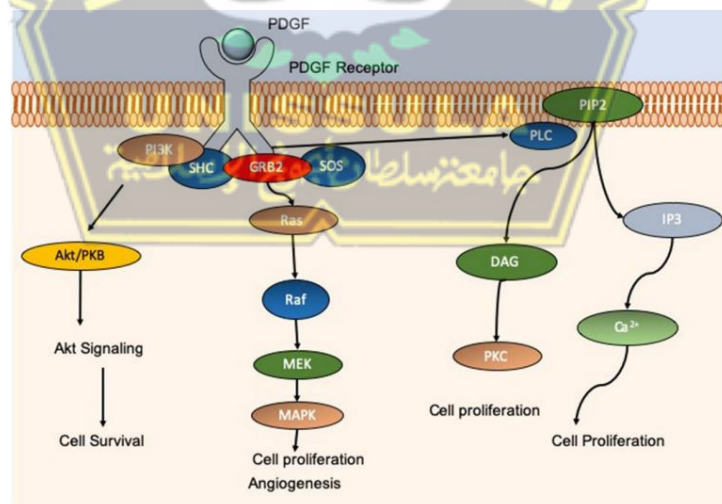


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Ekspresi gen PDGF (*Platelet derived growth factor*)

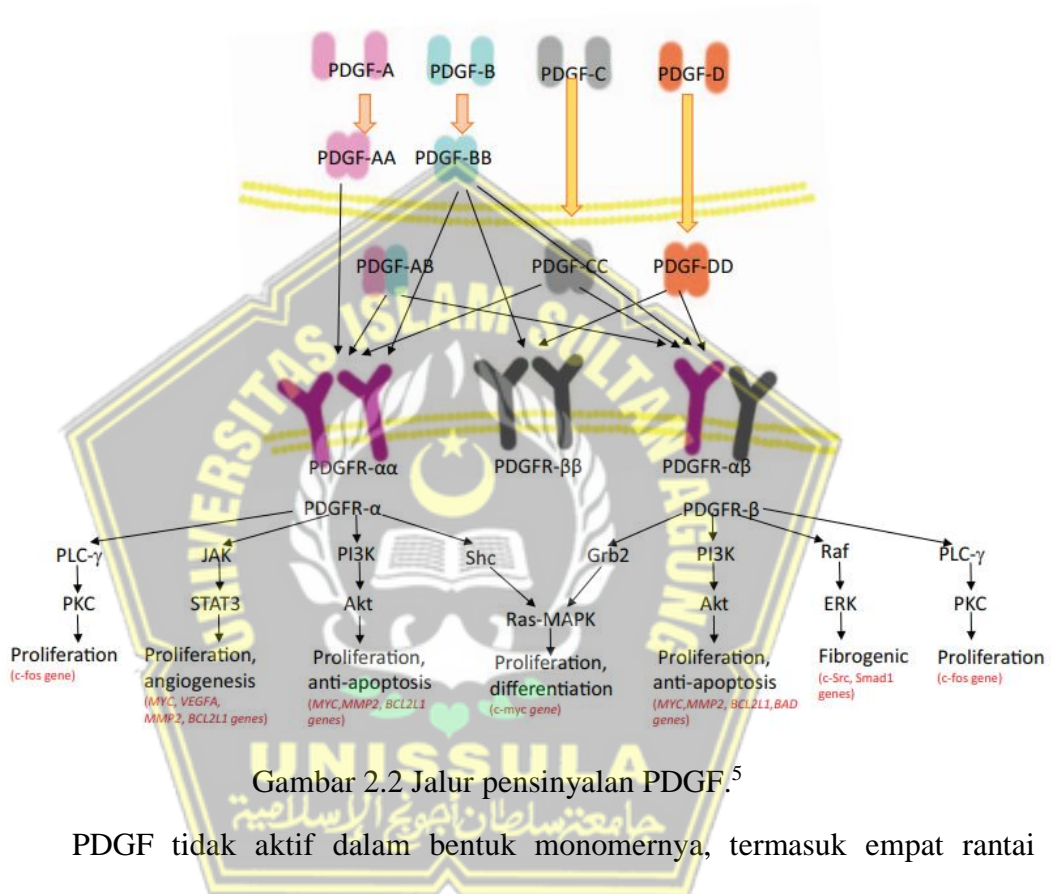
PDGF merupakan *growth factor* yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel. PDGF disintesis oleh trombosit, sel otot polos, makrofag aktif dan sel endotel pada saat aktivasi.<sup>5</sup> PDGF berperan penting dalam pembentukan pembuluh darah selama embriogenesis, migrasi sel mesenkim, proliferasi, dan kemotaksis. PDGF sebagian besar dapat memengaruhi proses diabetes melitus dan komplikasinya melalui PKC  $\theta$  dan PKC $\epsilon$ , NF- $\kappa$ B, PI3K, PLC $\gamma$ , Src/Smad1/Col4, JAK/STAT, PI3K/Akt/mTOR, p38 MAPK-SHP-1 dan jalur ERK/Akt. terutama gangguan migrasi dan proliferasi endotel oleh inflamasi dan efek angiogenik PDGF.<sup>5,19</sup>



Gambar 2.1 Jalur molekuler PDGF.<sup>20</sup>

PDGF berperan pada peningkatan proliferasi sel, migrasi, dan angiogenesis melalui Akt, MAPK, dan jalur kalsium. PDGF sangat penting untuk perbaikan luka yang efisien dan meminimalkan potensi jaringan parut.<sup>20</sup> PDGF penting

dalam inisiasi dan perkembangan perbaikan luka, bertindak sebagai instrumen kemotaktik untuk neutrofil, monosit, dan fibroblas. PDGF dapat memblokir diferensiasi fibroblast menjadi myofibroblast sehingga mengurangi pembentukan parut.<sup>20</sup>



PDGF tidak aktif dalam bentuk monomernya, termasuk empat rantai polipeptida (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C dan PDGF-D), aktif dengan dimerisasi keempat polipeptida membentuk isoform homodimerik (PDGF-AA, PDGF -BB, PDGF-CC dan PDGFDD). PDGF sebagian besar dapat mempengaruhi proses diabetes mellitus dan komplikasinya melalui jalur pensinyalan yang beragam atau isoform heterodimerik (PDGF-AB).<sup>21</sup> PDGF berperan mengikat reseptor membran trans tirosin kinase (PDGFR) yang mengandung isoform homodimerik dan heterodimerik (PDGFR- $\alpha\alpha$ , PDGFR- $\beta\beta$  and PDGFR- $\alpha\beta$ ).<sup>21,22</sup>

PDGFR terdiri dari domain pengikat ekstraseluler dan domain tirosin kinase intraseluler. PDGF-AA hanya berikatan dengan PDGFR- $\alpha\alpha$ , sedangkan PDGF-BB berikatan dengan yang lain. PDGF-AB dan PDGF-CC keduanya memberi sinyal ke PDGFR- $\alpha\alpha$  dan PDGFR- $\alpha\beta$ . Selain itu, PDGF-DD berikatan dengan PDGFR- $\beta\beta$  and PDGFR- $\alpha\beta$ . Mengikat ke domain ekstraseluler menyebabkan autofosforilasi dan aktivasi residu tirosin dalam sitoplasma.<sup>5</sup>

Aktivasi pensinyalan JAK, STAT, Raf/ERK protein kinase teregulasi ekstraseluler (ERK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB, Akt)/ *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *Src homology and Collagen* (Shc)/*Ras-mitogen-activated protein kinase* (MAPK), protein terikat reseptor faktor pertumbuhan 2 /Ras-MAPK, dan fosfolipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ )/ protein kinase C (PKC). Setelah itu, pensinyalan kaskade yang kompleks bertindak sebagai faktor transkripsi yang menargetkan gen PDGF secara spesifik.<sup>5</sup> PDGF diregulasi oleh rangsangan eksternal, seperti hipoksia, trombin hiperglikemia dan sitokin lainnya. Selain itu, PDGF dapat diinduksi oleh stimulasi sel tumor *autocrine*.<sup>23</sup>

## 2.2 Ekspresi gen IL-1b

*Interleukin-1* (IL-1) berperan sentral dalam mengatur respon imun terhadap cedera jaringan, luka kronis merupakan masalah klinis utama dimana penutupan luka dicegah oleh berbagai faktor patologis, termasuk disregulasi imun.<sup>24</sup> luka kronis biasanya terjebak dalam fase peradangan dari proses penyembuhan dan gagal berkembang menuju fase penyembuhan selanjutnya secara teratur dan tepat waktu.<sup>25</sup>

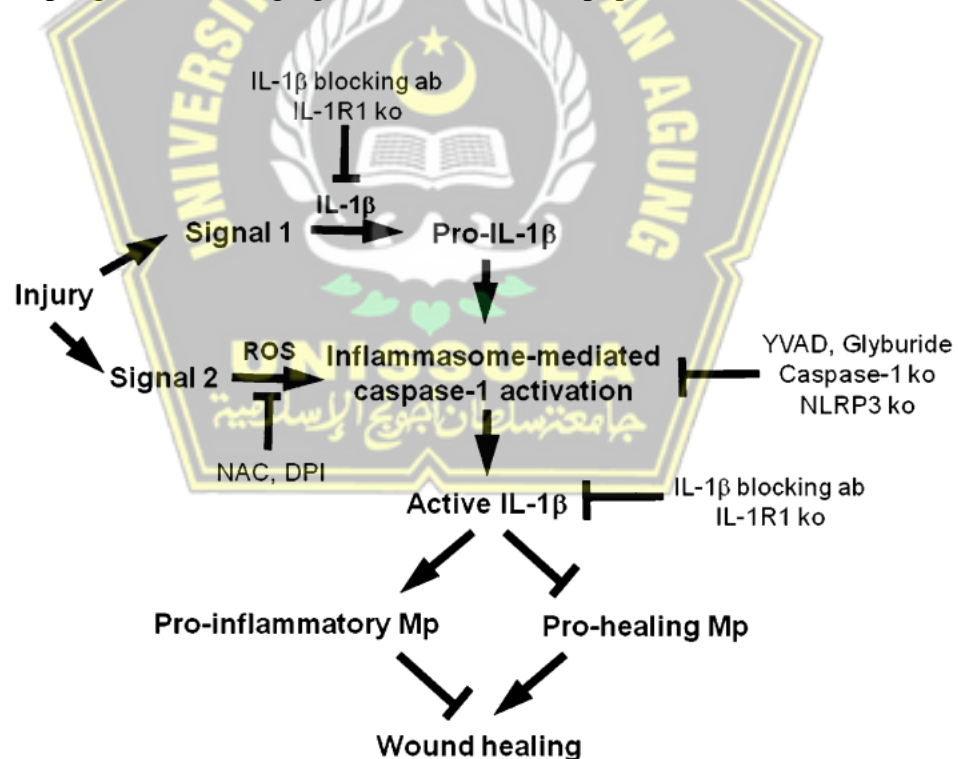
Peradangan yang terus-menerus mencegah perkembangan luka kronis

menjadi keadaan anti-inflamasi/perbaikan kemungkinan besar disebabkan oleh disregulasi pensinyalan kekebalan. Respons imun yang tidak adekuat dan ketidakseimbangan dalam pensinyalan imun terjadi pada pasien diabetes dan lanjut usia di mana tingkat tinggi sitokin interleukin-1 (IL-1) pro-inflamasi memainkan peran sentral.<sup>26</sup>

IL-1 adalah bagian dari *loop* umpan balik positif proinflamasi yang mempertahankan fenotipe makrofag luka proinflamasi persisten yang berkontribusi terhadap gangguan penyembuhan pada diabetes. Makrofag diisolasi dari luka pada manusia diabetes dan tikus menunjukkan fenotipe proinflamasi, termasuk ekspresi dan sekresi IL-1b.<sup>4</sup> Makrofag luka kronis mengekspresikan molekul proinflamasi tingkat tinggi IL-1b, matrix metalloproteinase (MMP)-9, dan TNF-a.<sup>4</sup> Tingkat rendah dari penanda fenotip terkait penyembuhan CD206, IGF-1, TGF-b, dan IL-10. Selain itu, analisis *imunofluoresensi cryosections* biopsi luka kronis menunjukkan bahwa protein IL-1b berkolokasi dengan penanda makrofag CD68 menunjukkan makrofag luka kronis menghasilkan protein IL-1b. Secara keseluruhan, fenotipe makrofag luka kronis sangat mirip dengan makrofag turunan monosit darah yang distimulasi dengan IFN-g dan TNF-a *in vitro*, meskipun ekspresi IL-6 lebih rendah pada makrofag luka dibandingkan dengan aktivasi makrofag.<sup>4</sup>

Tingkat serum IL-1b meningkat pada pasien dengan diabetes.<sup>27</sup> Kontribusi IL-1b terhadap peradangan persisten pada luka kronis dan perannya dalam gangguan penyembuhan luka, keseimbangan antara aktivitas *Matrix metalloproteinases* (MMPs) dan *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs)

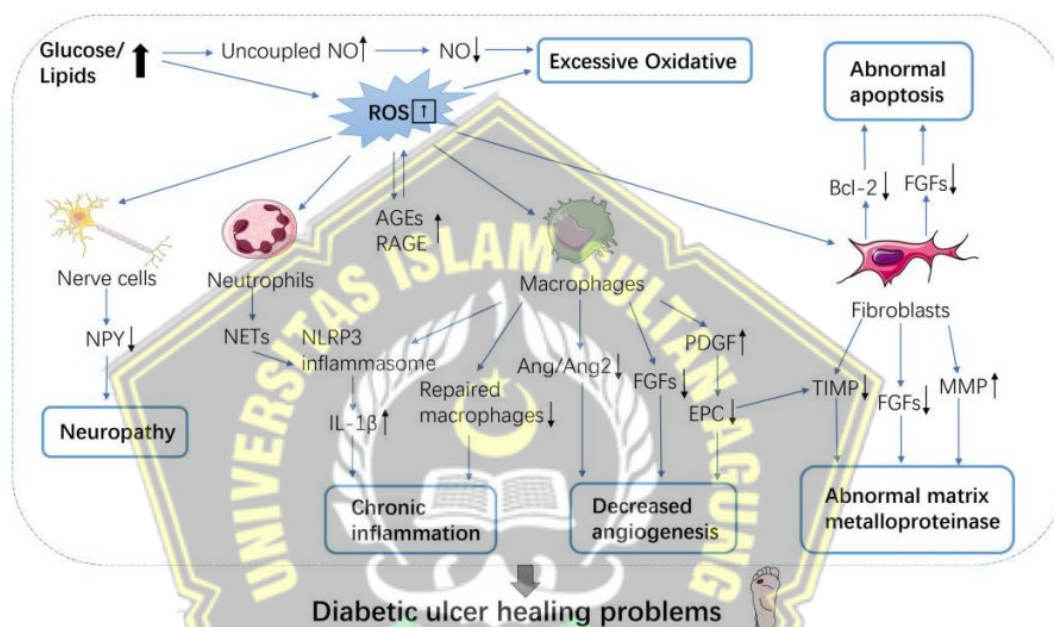
sangat penting untuk penyembuhan luka yang efektif. MMPs adalah protein remodeling ECM yang berperan penting dalam berbagai tahapan proses penyembuhan luka. Aktivasi metalloproteinase yang diatur oleh kaskade memicu penghambatan setelah cedera untuk penutupan luka. MMP terlibat dalam pengangkatan jaringan yang mati setelah itu selama fase perbaikan, MMP berkontribusi pada angiogenesis, kontraksi matriks luka, migrasi fibroblas dan keratinosit, dan epitelisasi. Akhirnya juga terlibat dalam remodeling jaringan ikat yang baru disintesis.<sup>28</sup> Aktivitas MMP diatur oleh protein penghambat TIMPs yang juga berkontribusi pada inisiasi pembelahan sel dan pengikatan ke ECM serta penghambatan angiogenesis dan induksi apoptosis.<sup>28</sup>



Gambar 2.3 Jalur IL-1b dalam gangguan penyembuhan luka.<sup>29</sup>

IL-1b dapat bertindak sebagai sinyal hulu (sinyal 1) untuk mempertahankan aktivitas inflamasi pada makrofag luka kronis dan bahwa ROS terlibat dalam

sinyal kedua (sinyal 2) yang diperlukan untuk aktivitas inflamasi. Karena inflamasi, pada gilirannya, mengaktifkan IL-1 $\beta$ , sitokin ini tampaknya menjadi bagian dari loop umpan balik positif proinflamasi yang mempromosikan bias terhadap fenotipe makrofag proinflamasi dan menghambat peningkatan regulasi fenotipe prohealing dan penyembuhan pada luka diabetes.<sup>29</sup>



Gambar 2.4 Mekanisme penyembuhan luka pasien diabetes.<sup>30</sup>

Ketika fase inflamasi jaringan yang terluka pada pasien diabetes berada pada tahap akhir, makrofag masih dalam keadaan inflamasi tidak dapat diubah menjadi fenotip untuk perbaikan, kemudian tidak dapat mengeluarkan media yang mendorong perbaikan jaringan dan luka tidak dapat bertransisi menjadi fase proliferasif yang menyebabkan peradangan kronis.<sup>31</sup>

Neutrofil yang berlebihan melepaskan perangkap ekstraseluler (NET) pada luka diabetes, mengaktifkan peradangan NLRP 3 di makrofag dan melepaskan IL-1 $\beta$  dan sitokin inflamasi pada luka diabetes untuk waktu yang lebih lama dari

biasanya, yang juga menjadi penyebab memperpanjang periode inflamasi dan menghambat pembentukan jaringan granulasi.<sup>32</sup>

### 2.3 Mesenchymal stem cells (MSC)

*Stem Cell* atau sel induk adalah sel khusus atau belum mengalami diferensiasi. Sel-sel ini dapat berkembang menjadi berbagai garis keturunan sel (*multi-lineage cell*), memiliki potensi yang bervariasi dan lebih terbatas serta memiliki kemampuan memperbaharui diri melalui pembelahan sel.<sup>33</sup> Tubuh manusia mengandung sel punca di berbagai jaringan dan organ, sebuah sel dapat diklasifikasikan sebagai sel punca jika memiliki dua kualitas unik yang membedakannya dari sel lain. Sifat-sifat tersebut adalah sebagai berikut: (1) Sel punca adalah sel yang tidak memiliki fungsi tertentu tetapi dapat terus merekonstruksi strukturnya melalui pembelahan sel. (2) Sel induk adalah sel yang tidak berdiferensiasi yang dapat dibuat menyerupai jenis sel atau jaringan lain. Oleh karena itu, sel punca dapat memiliki kemampuan regeneratif yang baik, terutama jika digunakan untuk membuat terapi regenerasi jaringan.<sup>34</sup>

Sel induk atau sel punca memiliki dua karakteristik antara lain mampu memperbanyak diri (*Self Renewal*), mempunyai kemampuan mereplikasi diri sendiri tanpa batas agar menghasilkan turunan sel-sel yang sama dengan sel induknya. Secara struktural dan fungsional sel punca belum memiliki kemampuan khusus, sel harus dapat berkembang menjadi jenis sel spesifik. Keistimewaan dalam berkembang menjadi lebih dari satu jenis sel tubuh/ berdiferensial (*Diffentiated*).<sup>35</sup>

Sel punca dikelompokkan berdasarkan sumbernya antara lain: *Embryonic*,

*Placental and Umbilical Cord Stems Cells, Adult Stem Cells* atau *Tissue-Specific Stem Cell, Totipotent, Pluripotent, Multipotent, dan Unipotent*. *Placental and Umbilical Cord Stems Cells* merupakan sumber terbaik sel punca hematopoietik (HSC) dan sel punca mesenkimal (MSC) adalah plasenta, darah tali pusat, dan tali pusat. Sel induk ini memiliki kapasitas untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel.<sup>36</sup>

MSC adalah sel multipotent dengan kapasitas untuk membelah menghasilkan sel dengan kapasitas berkembang menjadi sel lainnya. Banyak precursor jaringan mesenkim, termasuk osteosit, adiposit, dan kondrosit dapat dibentuk dari MSC.<sup>37</sup>

Menurut penelitian menggunakan *flow cytometry* oleh (Ghaneialvar *et al.*, 2018), penanda CD diekspresikan pada permukaan antigen, Sel punca mesenkim manusia dan tikus yang positif mengekspresikan CD44, CD166, CD105, dan CD90, sedangkan ekspresi CD34 dan CD45 negatif. Semua sel punca mesenkim menunjukkan plastisitas dan diferensiasi tri-garis keturunan, tidak semuanya menampilkan panel antigen permukaan yang sama seperti yang dijelaskan untuk sel punca mesenkim manusia. Untuk menggambarkan potensi regenerasi dan prospek penggunaan sel punca ini dalam implantologi dan kedokteran regeneratif, diperlukan panel penanda CD lebih lanjut.<sup>38</sup>

Sekretom MSC dapat menggantikan peran terapi MSC, pendekatan untuk memaksimalkan potensi efek parakrin MSC, salah satunya dengan melatih MSC dalam lingkungan hipoksia. Di lingkungan MSC, keadaan hipoksia dapat meningkatkan produksi faktor pertumbuhan dan sitokin anti inflamasi.<sup>39,40</sup>



Oksigen memiliki peran dalam kemampuan sel untuk bertahan hidup. Kaskade menyebabkan kematian sel ketika kadar oksigen dalam jaringan turun. Keberadaan HIF sebagai faktor transkripsi yang mengontrol ekspresi sejumlah gen yang memerangi hipoksia. HIF terdiri dari dua isoform yang berbeda: HIF 1 dan HIF 2. Dua struktur protein, alfa dan beta, digunakan untuk membuat HIF 1 dan 2. Keduanya merupakan protein konstitutif yang terus diproduksi.<sup>41</sup>

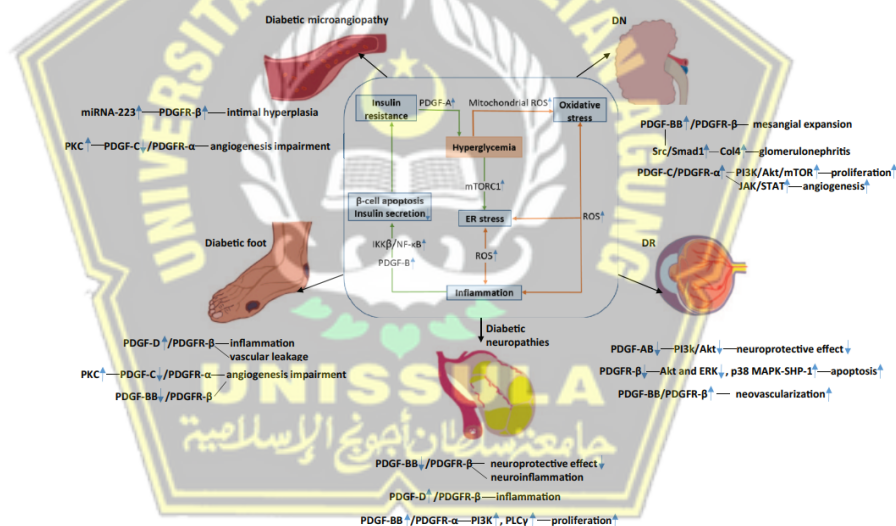
Jika terdapat cukup oksigen, HIF 1 alfa dan HIF 2 alfa akan mulai rusak dengan cepat, tidak seperti HIF beta yang tetap berada di sitoplasma. HIF 1 alfa dan HIF 2 alfa tidak rusak saat terjadi kekurangan oksigen, sebaliknya mereka digabungkan dengan HIF beta. Kedua zat ini kemudian bergerak ke dalam inti sel dan mengaktifkan promotor gen yang membantu tubuh mengatasi hipoksia.<sup>42</sup>

#### 2.4 Luka Hiperglikemi

Hiperglikemia menghasilkan stres oksidatif pada sel saraf dan menyebabkan neuropati, yang mempengaruhi saraf sensitif, motorik, dan otonom.<sup>43</sup> Peningkatan produksi beberapa enzim, seperti *aldosa reduktase* dan *sorbitol dehidrogenase*, melalui jalur metabolisme poliol yang mengkonsumsi *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) selanjutnya dikurangi dengan aktivasi jalur hexosamine yang membatasi konversi *nicotinamide adenine dinucleotide* menjadi NADPH dengan menghambat aktivitas glukosa - 6-fosfat dehidrogenase.<sup>44</sup>

Enzim mengubah glukosa menjadi sorbitol dan fruktosa, saat kadar gula meningkat, sintesis myoinositol sel saraf menurun dan menghasilkan konduksi saraf, antioksidan seperti *glutathione*, dan peningkatan produksi spesies oksigen

reaktif (ROS).<sup>45</sup> Disfungsi saraf akibat glikosilasi protein sel saraf, kelainan aktivasi metabolisme asam lemak protein kinase C, peningkatan fluks jalur heksosamin, dan jalur poliol serta perubahan produksi substansi P, faktor pertumbuhan saraf dan peptida terkait gen kalsitonin, menyebabkan iskemia lebih lanjut.<sup>43,46</sup> Ulkus kulit dapat disebabkan oleh kelainan anatomi, ketidakseimbangan fleksor dan ekstensor, serta kerusakan neuron motorik pada otot kaki. Fungsi kelenjar keringat terganggu bila terjadi kerusakan pada saraf otonom, dan kemampuan kaki dalam melembabkan kulit menurun sehingga menyebabkan kerusakan kulit dan keretakan epidermis.<sup>47</sup>



Gambar 2.5 Jalur pensinyalan yang menargetkan diabetes melitus terkait PDGF dan komplikasinya.<sup>5</sup>

Hiperglikemi dan AGEs menyebabkan memperpanjang kondisi hipoksia akibat stres oksidatif, mengurangi perfusi jaringan dan kurang merangsang angiogenesis. Faktor pertumbuhan yang berpengaruh seperti angiogenesis, aktivitas fagositik, deposisi kolagen, fungsi sawar epidermal, jaringan granulasi, migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas, remodeling oleh MMP, dan

matriks ekstraseluler (ECM).<sup>48</sup>

Penyembuhan luka menjadi sembuh lebih lama, disebabkan oleh fase inflamasi yang memanjang, adanya invasi bakteri dan jaringan nekrosis pada luka. Degradasi secara berlebihan pada jaringan kolagen. Pada kondisi Hiperglikemia dan AGEs menyebabkan kerusakan *signaling* sehingga terjadi penurunan faktor pertumbuhan seperti PDGF yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel menjadi terganggu, ketidak normalan *angiotensin converting enzyme (ACE)*, mengakibatkan vasokonstriksi kapiler yang dapat memperparah aliran pembuluh darah kecil. Peningkatan radikal bebas juga menyebabkan kerusakan pada pembuluh darah dan mengganggu penutupan luka karena perubahan struktural pada keratinosit.<sup>49,50</sup>

Luka merupakan hasil dari komorbiditas yang ada dan dampaknya semakin diperparah dengan meningkatnya prevalensi diabetes, Luka yang tidak sembuh adalah masalah kesehatan utama bagi pasien dengan diabetes dan penyakit pembuluh darah perifer. Terapi faktor pertumbuhan memiliki potensi untuk menyembuhkan luka kronis tetapi belum efektif untuk banyak pasien. PDGF-BB saat ini merupakan faktor pertumbuhan yang digunakan untuk meningkatkan penyembuhan luka. Ada sejumlah faktor yang diidentifikasi dalam luka diabetes yang berkontribusi terhadap penyembuhan luka berkurang pada pasien diabetes. Ini termasuk perubahan produksi faktor pertumbuhan termasuk VEGF-A, PDGF-BB, FGF-2 dan SDF-1a.<sup>51</sup>

Pasien dengan kaki diabetik mengalami tingkat pemulihan yang rendah dari penyembuhan luka dermal, respon angiogenik yang tidak mencukupi,

iskemia ekstremitas bawah dan kondisi hipoksia. Hingga 50% luka kronis >1 tahun menunjukkan resistensi terhadap pengobatan medis.<sup>52</sup> Penelitian Okonkwo *et. all.* (2017) menunjukkan bahwa PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  mendorong penyembuhan luka dengan menghasilkan migrasi kemotaktik yang diperkuat, mitosis dan proliferasi sel inflamasi dan fibroblas untuk mendorong pembentukan jaringan granulasi pada luka. Selain itu, neovaskularisasi juga berperan penting dalam penyembuhan luka, karena pasokan darah yang cukup sangat penting untuk penyembuhan luka. Sel-sel endotel vaskular bermigrasi ke luka di bawah stimulasi jalur PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  pada akhirnya mendorong neovaskularisasi.<sup>53</sup> PDGF-D/PDGFR- $\beta$  juga terlibat dalam respon angiogenik penyembuhan luka dengan merekrut makrofag dan menurunkan permeabilitas vaskular. Selain itu, PDGF-C telah dilaporkan mempromosikan angiogenesis independen dari faktor pertumbuhan endotel vaskular-A (VEGF-A).<sup>5</sup>

## **2.5 Pengaruh pemberian gel MSC *secretome hypoxia* terhadap ekspresi gen PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur Wistar model luka hiperglikemi.**

Sulitnya penyembuhan luka disebabkan oleh lingkungan glukosa yang tinggi dan berbagai faktor biologis. Luka mudah rusak, sulit sembuh, dan akhirnya berkembang menjadi luka kronis.<sup>1</sup> Terhambatnya penyembuhan luka akibat peningkatan sel inflamasi, penurunan proses angiogenesis, dan produksi growth faktor.<sup>3</sup> Hiperglikemia diketahui menginduksi ekspresi IL-1b di sejumlah tipe sel yang berbeda, jalur IL-1b dapat menjadi bagian dari loop umpan balik positif yang mempertahankan peradangan pada luka kronis dan

berkontribusi terhadap gangguan penyembuhan.<sup>4</sup>

*Secretome* MSC dapat menekan sekresi sitokin pro-inflamasi.<sup>54</sup> Pemberian MSC *secretome* mempercepat perbaikan kondisi luka pada tikus dengan menghambat respon inflamasi sehingga menurunkan kadar IL-6, IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-4.<sup>14</sup> MSC *secretome hypoxia* mensekresikan *growth faktor* yang mendukung regenerasi kulit, seperti PDGF mengatur aktivitas seluler pada proses penyembuhan luka, mendeteksi keberadaan molekul sinyal yang cedera, bermigrasi ke area cedera dan mempercepat penyembuhan luka.<sup>3,11</sup> Penggunaan MSC *secretome* prakondisi dapat menambah sifat regeneratif sekresi sel. Kondisi hipoksia sebagai sumber sekresi pelindung jaringan dan regeneratif dalam penyembuhan luka.<sup>15</sup>

Terapi faktor pertumbuhan adalah strategi yang menarik untuk mempercepat penutupan luka. *Platelet derived growth factor* (PDGF) berfungsi mengatur banyak aktivitas seluler yang terkait dengan proses penyembuhan luka termasuk mitogenesis fibroblas, angiogenesis dan kemosistesis.<sup>3</sup> PDGF mempercepat infiltrasi sel inflamasi dan fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler dan pembentukan kolagen, efeknya menghasilkan proses penyembuhan yang cepat dibandingkan dengan model yang tidak diobati.<sup>13</sup>

## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### PENELITIAN

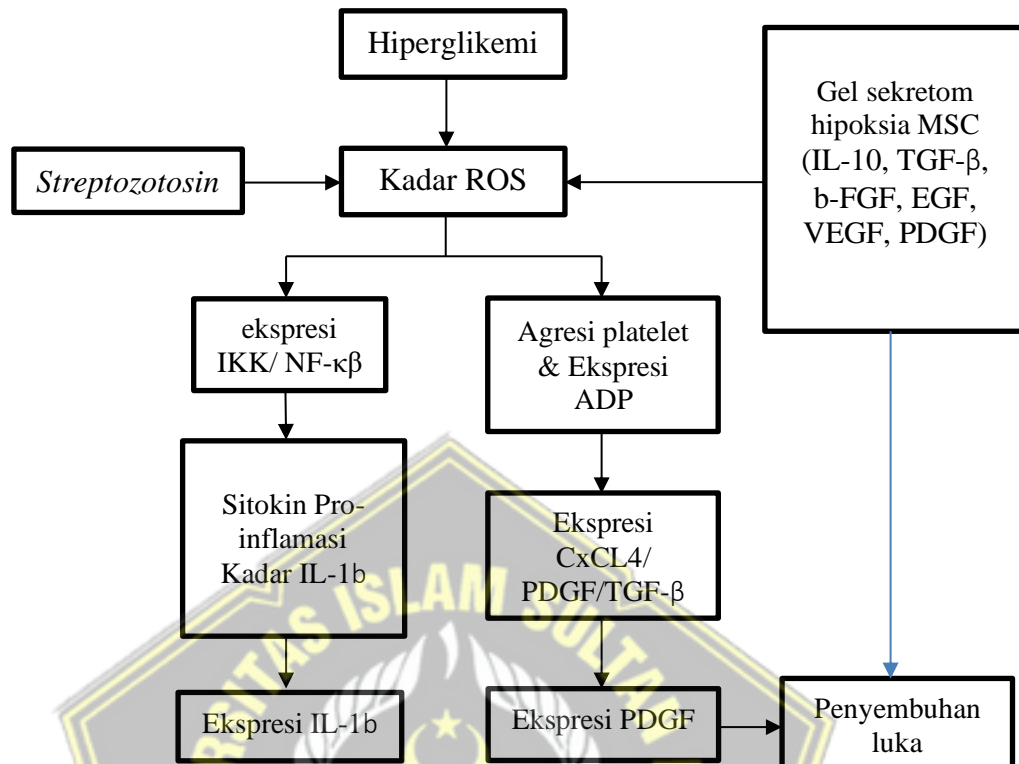
##### 3.1 Kerangka Teori

Luka pada kondisi hiperglikemi memiliki waktu penyembuhan yang lama.<sup>2</sup> Lamanya penyembuhan luka disebabkan oleh lingkungan glukosa yang tinggi dan berbagai faktor biologis. Luka mudah rusak, sulit sembuh, dan akhirnya berkembang menjadi luka kronis.<sup>1</sup> Pada saat luka terjadi agregasi platelet dan pelepasan ADP, PDGF, TGF- $\beta$ , dan CXCL4 yang mengaktifkan sel fibroblas dan keratinosit untuk memulai inflamasi. Keratinosit melepaskan sitokin proinflamasi, peptida dan AMP. Neutrofil serta makrofag mengaktifasi ROS, oksida nitrat (NO) dan AMP.<sup>55</sup>

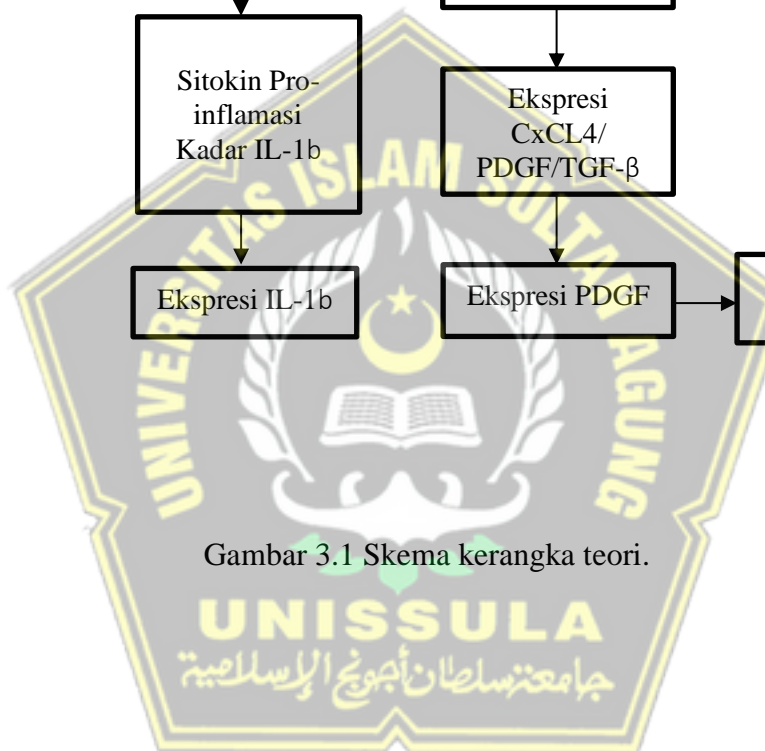
Pensinyalan intra seluler melibatkan p38 dan miR-21. miR-21 mempengaruhi beberapa aktor seluler dalam penyembuhan luka dengan *activator protein 1* (AP1), dan NF- $\kappa$ B. Di dalam makrofag, miR-21 memainkan peran kunci dalam transisi dari peradangan menjadi anti-inflamasi. Jalur p38/Jun diaktifkan oleh PAMPs dan DAMPs, menyebabkan sekresi sitokin inflamasi, seperti IL-1, TNF, dan IL-6.<sup>55</sup> Makrofag M1 dalam lingkungan mikro luka mengekspresikan mirRNA-21 secara berlebihan, yang menyebabkan peningkatan sekresi mediator inflamasi, seperti IL-1b, TNF $\alpha$ , iNOS, IL-6 dan IL-8, dan polarisasi lebih lanjut dari makrofag terhadap fenotipe M1. Makrofag M2 bertanggung jawab untuk perbaikan jaringan dan neovaskularisasi, yaitu dimediasi oleh PDGF, *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), VEGF dan TGF- $\beta$ 1.

Makrofag bisa mampu memperbarui diri. Ketika cedera akut terjadi, makrofag dermal adalah salah satunya IL-10 dan PDGF menginduksi perbaikan epitel dalam penyembuhan luka.<sup>56</sup>

*Secretome* MSC dapat menekan sekresi sitokin pro-inflamasi.<sup>54</sup> Pemberian MSC *secretome* mempercepat perbaikan kondisi luka pada tikus dengan menghambat respon inflamasi sehingga menurunkan kadar IL-6, IL-1b, TNF- $\alpha$ .<sup>14</sup> MSC *secretome hypoxia* mensekresikan *growth faktor* yang mendukung regenerasi kulit, seperti PDGF mengatur aktivitas seluler pada proses penyembuhan luka, mendeteksi keberadaan molekul sinyal yang cedera, bermigrasi ke area cedera dan mempercepat penyembuhan luka.<sup>3,11</sup> MSC *secretome hypoxia* mengandung sitokin dan mediator seperti IL-10, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, IGF-1, dan HGF.<sup>57</sup> Penggunaan MSC *secretome* prakondisi dapat menambah sifat regeneratif sekresi sel. Kondisi hipoksia sebagai sumber sekresi pelindung jaringan dan regeneratif dalam penyembuhan luka.<sup>15</sup> Dari uraian diatas, dapat disusunlah kerangka sebagai berikut:

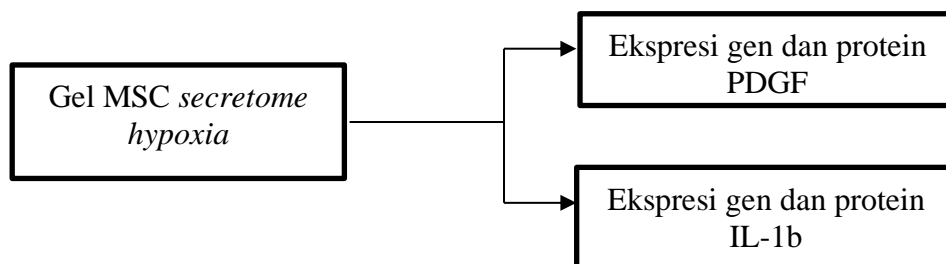


Gambar 3.1 Skema kerangka teori.





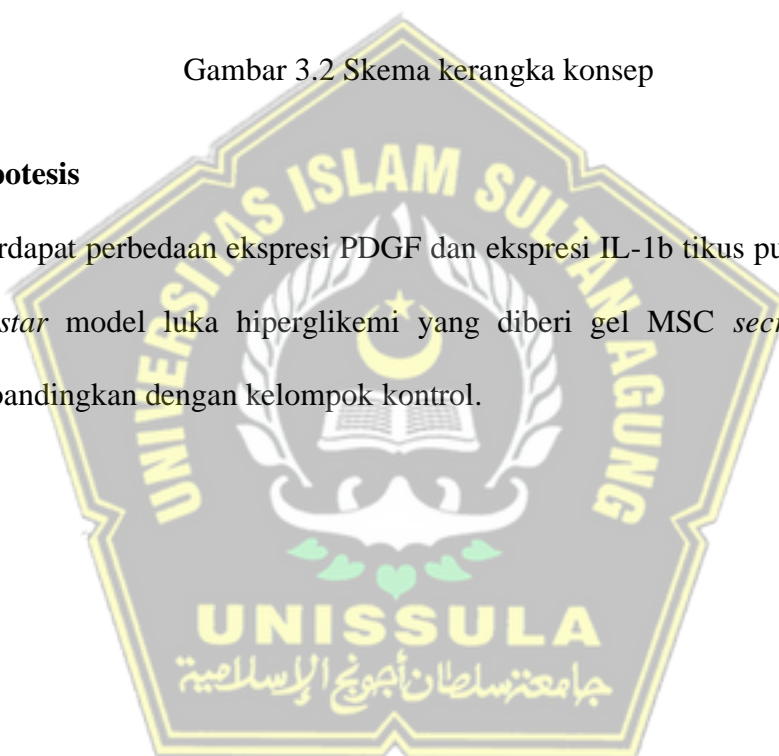
### 3.2 Kerangka konsep



Gambar 3.2 Skema kerangka konsep

### 3.3 Hipotesis

Terdapat perbedaan ekspresi PDGF dan ekspresi IL-1b tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi yang diberi gel MSC *secretome hypoxia* dibandingkan dengan kelompok kontrol.



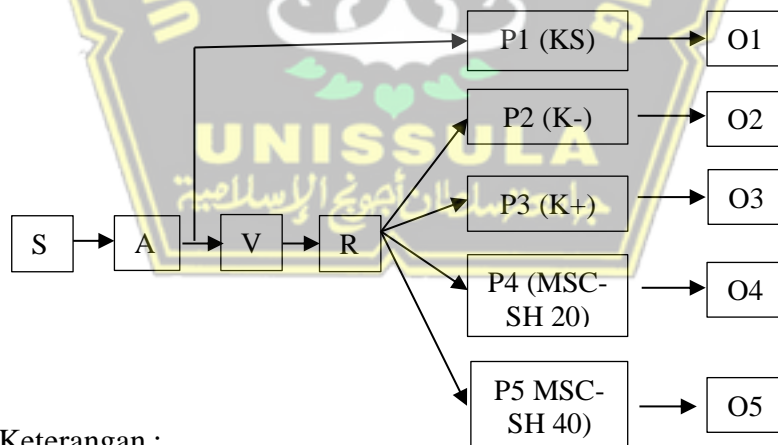
## BAB IV

### METODELOGI PENELITIAN

#### 4.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian

Riset ini menerapkan desain eksperimen laboratorium *in vivo* dengan kelompok kontrol yang hanya dipergunakan untuk *post-test*. Terbagi menjadi 5 kelompok riset, yakni:

- 1 kelompok tikus sehat,
- 1 kelompok perlakuan tikus luka hiperglikemi dengan base gel
- 1 kelompok perlakuan tikus yang mendapatkan intervensi standar (kontrol positif)
- 2 kelompok tikus perlakuan luka hiperglikemi dan intervensi, kemudian dilakukan analisis data sesudah intervensi.



Keterangan :

S: Subjek tikus *Wistar* sehat

A: Adaptasi selama 7 hari

V: Validasi

R: Randomisasi

Perlakuan (P1): Tikus sehat

Perlakuan (P2): Tikus kontrol negatif model luka hiperglikemi dengan pemberian base gel

Perlakuan (P3): Tikus kontrol positif model luka hiperglikemi dengan terapi standar menggunakan antibiotik gentamisin.

Perlakuan (P4): Tikus model luka hiperglikemi dengan pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dosis 20  $\mu$ L/tikus

Perlakuan (P5): Tikus model luka hiperglikemi dengan pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dosis 40  $\mu$ L/tikus.

O : Observasi

## 4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.2.1 Variabel Penelitian

#### 4.2.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini yaitu pemberian gel MSC *secretome hypoxia*

#### 4.2.1.2 Variabel terikat

Variabel terikat adalah ekspresi gen dan protein PDGF dan ekspresi gen dan protein IL-1b.

### 4.2.2 Definisi Operasional

#### a. Gel MSC *secretome hypoxia*

Gel MSC *secretome hypoxia* adalah gel yang memiliki molekul dan vesikel ekstraseluler faktor biologis antarlain sitokin, kemokin, dan *growth factor*.

*Secretome* hipoksia difiltrasi dengan *Tangential Flow Filtration* dicampur

dengan base gel sebanyak 200 mg gel ditambahkan 20  $\mu$ L NaCl untuk kelompok P4 dengan dosis 20  $\mu$ L/tikus dan sebanyak 200 mg gel ditambahkan 20  $\mu$ L NaCl untuk kelompok P5 diberikan dosis 40  $\mu$ L/tikus.

Unit : Milligram (mg)

Skala : Nominal

#### **b. Ekspresi gen dan protein PDGF**

PDGF adalah *growth factor* yang disekresikan karena peningkatan stress oksidatif pada jaringan, berperan mempercepat penyembuhan luka hiperglikemi untuk mengsekresikan sitokin inflamasi. Analisa ekspresi gen dan protein PDGF pada jaringan kulit luka hiperglikemi dengan ekstraksi RNA dan dianalisis menggunakan metode RTq-PCR.

Unit : Fold Changes

Skala : rasio

#### **c. Ekspresi gen dan protein IL-1b**

IL-1b merupakan sitokin proinflamasi yang disekresikan akibat peradangan berkepanjangan pada luka kronik dengan kondisi luka hiperglikemi. Analisa ekspresi gen dan protein IL-1b pada jaringan kulit luka hiperglikemi dengan ekstraksi RNA dan dianalisis menggunakan metode RTq-PCR dengan hasil dalam bentuk persentase.

Unit : Fold Changes

Skala : rasio

## 4.3 Subyek dan Sampel Penelitian

### 4.3.1 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus putih jantan galur *Wistar*, umur bekisar 2-3 bulan dengan berat antara 200-250gr sesuai kriteria untuk penelitian dari laboratorium hewan coba SCCR dan Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

### 4.3.2 Sampel Penelitian

#### 1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus putih jantan galur *Wistar* dengan klasifikasi sebagai berikut:

- Sehat dan tidak menunjukkan kelainan selama masa adaptasi
- Tikus terkondisi hiperglikemi yang diinduksi *streptozotosin* kemudian periksa kadar gula darah  $> 200$  mg/dl.
- Pembuatan luka hiperglikemi divalidasi dengan pemeriksaan mikroskopis.

#### 2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

- Tikus mengalami infeksi pada perlakuan luka hiperglikemi ditandai dengan pus

#### 3. Kriteria *Drop Out*

Tikus putih jantan galur *Wistar* mengalami infeksi ditandai dengan adanya pus pada luka, maupun mati selama penelitian berlangsung.

#### 4.4 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan teknik pengambilan randomisasi sampel, tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu perlakuan (P1) tikus *Wistar* sehat, (P2) tikus *Wistar* luka hiperglikemi dengan pemberian base gel, (P3) tikus *Wistar* luka hiperglikemi dengan pemberian terapi standar, (P4) tikus *Wistar* luka hiperglikemi dengan pemberian gel sekretom hipoksia MSC dosis 20  $\mu\text{L}$ /tikus dan (P5) tikus *Wistar* luka hiperglikemi dengan pemberian gel sekretom hipoksia MSC dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus.

#### 4.5 Besar Sampel

Besar sampel penelitian dari 5 kelompok dengan total berjumlah 30 ekor tikus putih jantan galur *Wistar*, berdasarkan rumus sampel eksperimen dari Federer.<sup>58</sup> dengan ketentuan sebagai berikut:

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$5n - 4 \geq 15$$

$$n \geq (15+5)/4$$

$$n \geq 20/4$$

$$n \geq 5$$

keterangan : t = Banyaknya kelompok perlakuan

n = Banyaknya sampel setiap kelompok perlakuan

#### 4.6 Alat dan Reagensia

##### 4.6.1 Alat

Penelitian ini memakai peralatan antara lain: Spuit injeksi 1 cc,

neraca, *handscoon*, *gluco test easy touch*, stemple cetakan luka 2x2 cm pinset, Gunting bedah *Handscoon*, steril swab, *biosafety Cabinet* (BSC), Oksigen meter, beaker glass, batang pengaduk, mikropipet, Inkubator CO<sub>2</sub>, *Dissecting kit*, Flask 75T, *Hypoxic chamber*.

#### 4.6.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: PBS, DMEM, FBS, *dinitrophenyl-bovine* serum albumin (DNP-BSA), gel aluminium hidroksida (Al(OH)), 2,4- *Dinitrochlorobenzene* 1,5% (DNCB), aseton-minyak zaitun NaCl 0.9%, Tali pusat tikus, *Streptozotosin*, Buffer sitrat, gel berbasis air, ketamin, *Xylasine*, fungizone, penstrep.

#### 4.7 Cara Penelitian

##### 4.7.1 Perolehan Ethical Clearance

Mengajukan *Ethical clearence* penelitian kepada komite etik untuk melakukan penelitian *In Vivo* menggunakan hewan coba ke Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

##### 4.7.2 Isolasi MSC dari *Umbilical Cord*

Tahapan isolasi di kerjakan pada *biosafety cabinet class 2*, dengan aseptis dan alat-alat terkondisi steril.

1. Kumpulkan *Umbilical cord* kemudian letakkan pada wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%.
2. *Umbilical cord* diletakkan pada *petri dish*, kemudian dicuci bersih dengan PBS menggunakan pinset.
3. Potong *Umbilical cord* pisahkan dari janin tikus dan buang pembuluh

darahnya.

4. Dicacah halus *Umbilical cord* lalu masukkan ke flask 25T kemudian di ratakan, diamkan selama 3 menit sampai jaringan menempel pada permukaan flask.
5. Media lengkap (DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambah perlahan sampai jaringan tertutupi media.
6. inkubasi dengan inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>.
7. Pertumbuhan sel terdeteksi sekitar 14 hari setelah proses kultur, kemudian tambah media setiap 3 hari dengan membuang separuh media dan menggantinya dengan media baru yang lengkap.
8. Penambahan sel di ulang sehingga sel mencapai konflensi 80%.

#### **4.7.3 Pembuatan Hipoksia dan TFF**

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambah media lengkap sampai dengan 10 mL
2. Flask berisi MSC dimasukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen di alirkan melewati katup inlet dan *oxygen* meter diletakkan pada lubang sensor untuk mengetahui konsentrasi oksigen.
4. Nitrogen lalu ditambahkan sampai konsentrasi oksigen 5%.
5. Setelah 24 jam, media kultur akan di keluarkan lalu disaring dengan menggunakan TFF untuk memperoleh MSC *secretome hypoxia* dan berikutnya akan digunakan pada P4 dan P5.

#### **4.7.4 Pembuatan Sediaan gel MSC *secretome hypoxia***

1. Sediaan gel MSC *secretome hypoxia* dibuat dengan mencampurkan



20  $\mu\text{L}$  *secretome* ditambahkan 20  $\mu\text{L}$  dalam 200mg gel sehingga mendapatkan konsentrasi 20  $\mu\text{L}$ /tikus (P4). Sediaan gel MSC *secretome hypoxia* untuk (P5) dibuat dengan mencampurkan 40  $\mu\text{L}$  *secretome* ditambahkan 20  $\mu\text{L}$  dalam 200 mg gel sehingga mendapatkan konsentrasi 40  $\mu\text{L}$ /tikus.

2. Secara aseptis campurkan hingga homogen berdasarkan sifat fisik yang diamati menggunakan mikroskop.

#### 4.7.5 Pembuatan Model Tikus Hiperglikemi

1. Setelah tujuh hari aklimatisasi, tikus dipuasakan selama 8-12 jam, kemudian ditidurkan dengan suntikan *streptozotocin intraperitoneal* (65 mg/kgBB/hari) yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,0 selama tiga puluh hari . Tikus dianestesi dengan kombinasi ketamine (60 mg/kgBB) dan xylazine (20 mg/kgBB). Pada hari ketujuh setelah inisiasi, tes glukosa darah dijalankan. Ketika kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dl, didiagnosis hiperglikemia.
2. Setelah 30 hari penyuntikkan *Streptozotosin*, bulu tikus dicukur dibagian punggung. Pembuatan luka menggunakan *punch biopsy* melingkar diameter 6 mm dengan kedalaman 2 mm.<sup>59</sup>

#### 4.7.6 Validasi pemeriksaan luka hiperglikemi.

Pewarnaan hematoxylin-eosin (HE) dipergunakan membuat sediaan histopatologi dengan menggunakan sampel kulit yang diperoleh di bawah mikroskop dari tiap kelompok.

1. Larutan NBF 10% dipergunakan dalam memfiksasi sampel kulit yang

diperoleh dari mencit pada tiap kelompok. Bilas dengan alkohol 70% sampai semua residu fiksatif hilang.

2. Masing-masing selama 30 menit, sampel kulit didehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan absolut.
3. Selama satu jam, sampel direndam dalam toluol hingga menjadi bening atau bening.
4. Prosedur infiltrasi parafin dilakukan dalam oven bersuhu 56–60°C dengan cara merendam sampel kulit selama 30 menit dalam campuran toluol dan parafin dengan perbandingan 3:1, 1:1, atau 1:3. Selama tiga puluh menit, sampel kulit direndam dalam parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III.
5. Sampel kulit parafin murni dimasukkan ke dalam cetakan blok parafin yang diisi parafin cair. Setelah mengeras, balok diiris dengan mikrotom setebal 6  $\mu\text{m}$ .
6. Untuk menempelkan irisan sampel jaringan kulit dengan kuat pada benda kaca, albumin Mayer dioleskan, dilanjutkan dengan meneteskan sedikit air suling dan memanaskannya di atas *hot plate*.
7. Sediaan histologis direndam selama 24 jam dalam xylol guna menjalankan deparaffinisasi.
8. Lanjutkan dengan pewarnaan HE. Dengan memakai kertas saring, jumlah xylol diukur. Kemudian ditambahkan ke air suling, alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%, dan dibiarkan selama satu hingga dua menit. Setelah direndam dalam pewarna HE selama

lima sampai sepuluh detik, sediaan dibilas dengan air mengalir selama sepuluh menit. Sediaan kemudian direndam dalam alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, atau 70% selama tiga sampai lima menit. Setelah direndam dalam eosin selama lima sampai sepuluh menit, sediaan direndam dalam alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96% selama tiga sampai lima menit, dan digunakan kertas saring untuk mengeringkannya. Setelah 15 menit perendaman dalam xylol, setetes balsam Kanada ditambahkan ke dalam sediaan histologis.

9. Kaca penutup diletakkan di atas sediaan, diberi label, dan disimpan dalam kotak sediaan.<sup>60</sup>

#### **4.7.7 Perawatan Luka hiperglikemi**

Luka hiperglikemi yang terbentuk pada hari keenam, berikutnya tikus diberi perawatan selama 10 hari dengan pemberian gel MSC *secretome hypoxia* setiap hari, dengan komposisi gel MSC *secretome hypoxia* dosis 20  $\mu\text{L}$ /tikus (P4) dan dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus (P5). Tikus kontrol positif (P3) menerima terapi antibiotik standar yaitu gentamisin, dan tikus kontrol negatif menerima pengobatan base gel (P2).

#### 4.7.8 Proses isolasi RNA dan sintesis cDNA

1. Tabung RNA *Iso Plus* 0,5 mL diisi dengan 100 mg sampel jaringan kulit yang telah dipotong kecil-kecil.
2. Setelah potongan sampel kulit dihaluskan menggunakan *micropestle*, ditambahkan 0,5 mL RNA *Iso Plus* yang mengandung DNA bebas RNase, dan campuran didiamkan pada suhu kamar selama lima menit. Dengan menggunakan mixer pusran, tambahkan 2 mL kloroform dan aduk campuran hingga menjadi putih susu.
3. Inkubasi 2-3 menit pada suhu kamar dan sentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4° C dengan kecepatan 15.000 rpm sampai didapatkan tiga lapisan.
4. Lapisan paling atas yang terdapat mRNA dipindahkan ke dalam micro tube dan ditambahkan isopropanol dengan perbandingan yang sama.
5. *Centrifuge mikrotube* selama 10 menit pada suhu 4° C dan kecepatan 15.000 rpm setelah dikocok hingga mulai terlihat serat putih. Sisa pelet putih terlihat di dasar tabung setelah supernatan dibuang. Setelah kering, campurkan 100 mL etanol 70% dengan larutan DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*), balikkan beberapa kali, lalu sentrifugasi sekali lagi selama lima menit pada suhu 4° C dan 15.000 rpm.
6. Setelah supernatan dibuang, tambahkan 30–50 µL DEPC. Selanjutnya, 5 µL sampel RNA diukur dengan Nanodrop dengan panjang gelombang 260 nm. Akan ditentukan bahwa hasil kuantifikasi

sama dengan 3000 ng.

7. Proses Sintesis cDNA dengan mencampurkan sebanyak 1  $\mu$ L sampel RNA yang telah dihitung sebelumnya dengan 1  $\mu$ L primer OligoDT dan *Nuclease Free Water* (NFW) hingga mencapai volume 10  $\mu$ L, selanjutnya dimasukkan dalam thermal cycler selama 5 menit pada suhu 70°C.
8. Tambahkan 5X buffer 4  $\mu$ L, DEPC-Treated H<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L, ReverTraAce 1  $\mu$ L.
9. Campuran diinkubasi pada suhu 45-50°C selama 30 menit.<sup>61</sup>

#### 4.7.9 Diagnosis Ekspresi gen PDGF dan IL-1b metode RTq-PCR

1. Ekspresi gen PDGF dan IL-1b dianalisa menggunakan RTq-PCR dengan campuran masing-masing dari 1  $\mu$ L cDNA sampel, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix sebanyak 10  $\mu$ L, *primer forward* dan *reverse* masing – masing sebanyak 1 $\mu$ L dan *nuclease free water* hingga total 20  $\mu$ L.
2. PCR ekspresi gen dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine dengan profil suhu predenaturasi sebesar 95° C selama 2 menit, denaturasi sebesar 95° C selama 30 detik, selanjutnya di aneling selama 20 detik pada suhu 61° C dengan siklus sebanyak 50 kali.
3. Dengan memakai perangkat lunak *EcoStudy*, peningkatan ekspresi gen dianalisis sehubungan dengan gen *housekeeping*.<sup>62</sup>

## 4.8 Tempat dan Waktu Penelitian

### 4.8.1 Tempat Penelitian

Riset dijalankan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) dan FK Unissula Semarang.

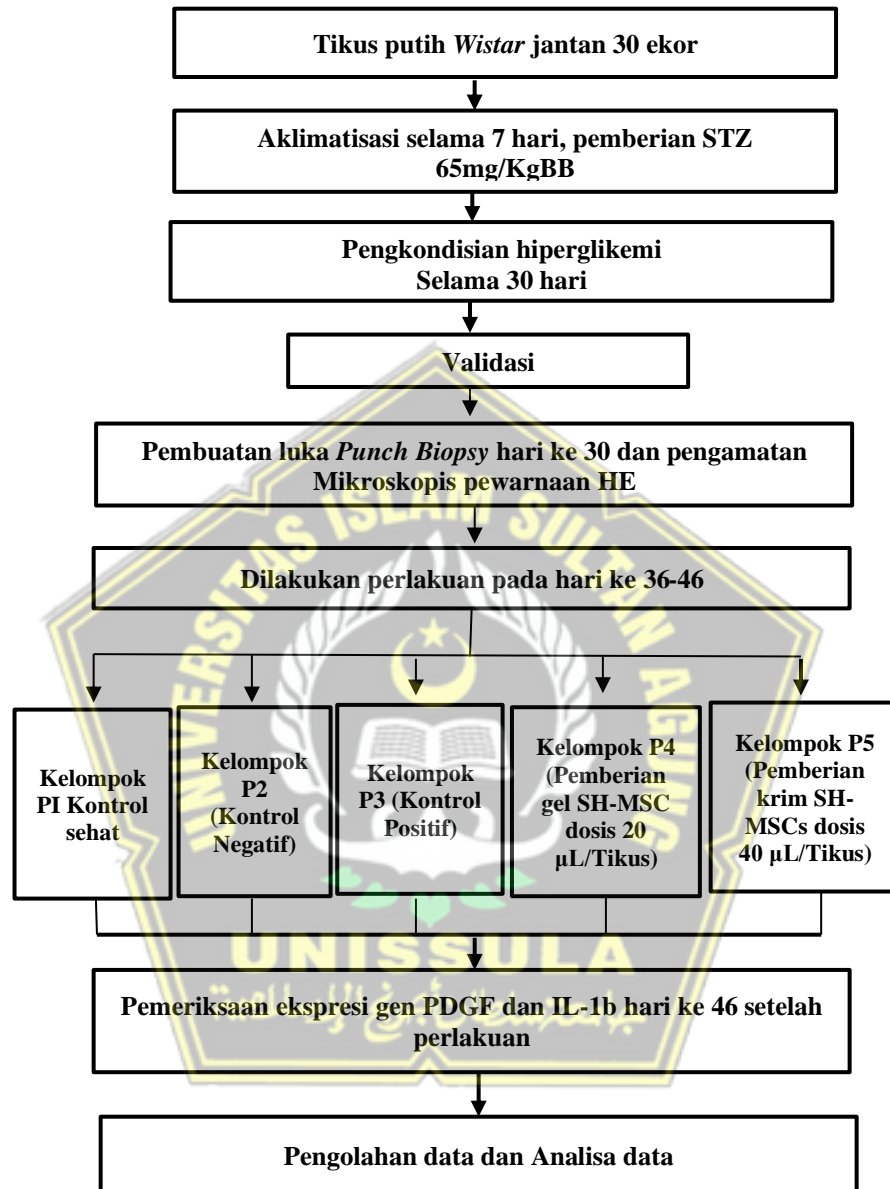
### 4.8.2 Waktu Penelitian

Riset dijalankan di bulan Juli-Agustus 2023.

## 4.9 Analisa Data

Dengan menerapkan uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene*, data riset ditinjau normalitas dan homogenitasnya. Temuan riset memperlihatkan bahwasanya varian dan sebaran data normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ). Sesudah diketahui bahwasanya hasil distribusi data tidak normal ( $p < 0,05$ ), perbedaan antar kelompok riset dinilai memakai uji *Mann Whitney* (nilai signifikansi  $p < 0,05$ ) dan uji *Kruskal Wallis* (nilai signifikansi  $p < 0,05$ ). Program SPSS versi 26 dipergunakan sebagai alat pengolahan data.

#### 4.10 Alur penelitian



Gambar 4.1 Skema alur penelitian.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Riset ini tujuannya guna mencari tahu dampak pengaruh sekretom hipoksia MSC terhadap ekspresi gen PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi. Riset dijalankan di bulan Agustus-September 2023 di Laboratorium SCCR dan FK Unissula Semarang. Penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* sebagai subjek penelitian yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu perlakuan tikus sehat (P1), tikus dengan pemberian *base gel* (P2), tikus dengan pemberian terapi standar *gentamicin* (P3), tikus dengan pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dosis 20  $\mu\text{L}$ /tikus (P4), dan tikus dengan pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus (P5).

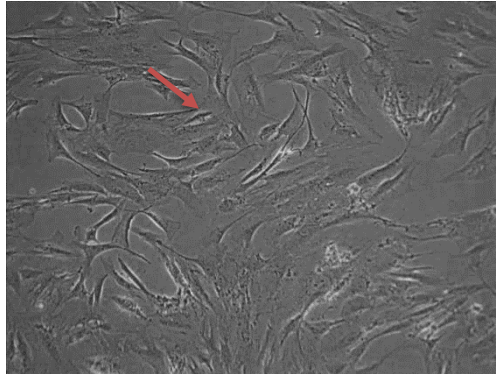
#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Isolasi MSC *secretome* dari *Umbilical Cord*

MSC *secretome hypoxia* yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil filtrasi medium kultur MSC dalam kondisi hipoksia 5% menggunakan *Tangential Flow Filtration (TFF)* selama 24 jam kemudian MSC diisolasi dari *umbilical cord* tikus *Wistar* dalam keadaan bunting 19 hari, penambahan media yang terdiri dari DMEM (*Dulbeccos's modified eagle medium*), fungizone, penstrep dan FBS, hasil isolasi kemudian dilakukan kultur dalam *flask* plastik. Validasi MSC dilakukan setelah pasase ke-4. Pemeriksaan mikroskopis hasil kultur MSC pada konfluensi 80% menunjukkan sel-sel menempel pada dasar labu dengan bentuk sel

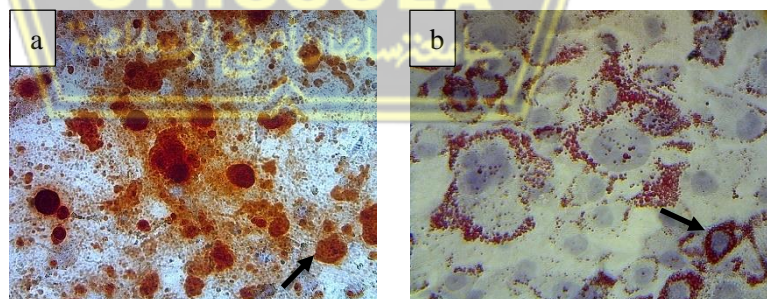


seperti *spindle-like* (Gambar 5.1).



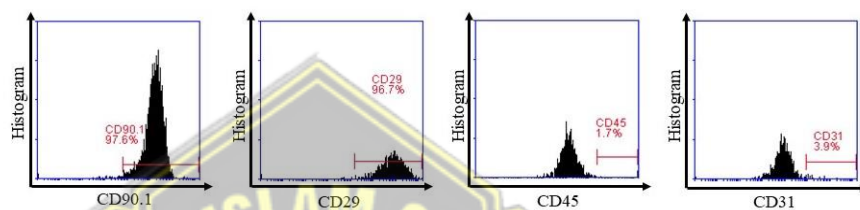
Gambar 5.1 Isolasi MSC dengan sel berbentuk *spindle-like*.

Pemeriksaan kapasitas MSC untuk berdiferensiasi menjadi sel osteogenik dan adipogenik berfungsi untuk memvalidasi hasil prosedur isolasi sel MSC. Pembentukan tetesan lipid merah ditunjukkan dengan pewarnaan *oil red O* pada uji diferensiasi adipogenik (Gambar 5.2.a). Uji diferensiasi osteogenik dengan pewarnaan alizarin merah memperlihatkan terbentuknya endapan kalsium yang terlihat pada warna merah (Gambar 5.2.b).



Gambar 5.2 (a) MSC berdiferensiasi menjadi osteosit dan (b) MSC berdiferensiasi menjadi Adiposit

Validasi dengan *flow cytometry*, hasil isolasi MSC *secretome hypoxia* menunjukkan kapasitas mengekspresikan berbagai penanda permukaan khusus (*surface marker*). MSC mengekspresikan CD90(97,6%), CD29(96,4%) dan mengekspresikan CD45 (1,7%) dan CD31 (3,9%), hasil analisis *Flow cytometry* ditunjukkan pada gambar 5.3:



Gambar 5.3 Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

MSC *secretome hypoxia* diduga mengandung sitokin anti-inflamasi dan *growth factor*, oleh karena itu, setelah proses filtrasi dilakukan analisis kandungan sitokin anti-inflamasi dan *growth factor*, pengukuran kandungan *growth factor* dalam MSC *secretome hypoxia* dilakukan menggunakan uji ELISA. MSC *secretome hypoxia* diketahui menghasilkan kadar PDGF sebesar  $947.26 \pm 34.93$  pg/mL, kadar VEGF sebesar  $1137.56 \pm 37.51$  pg/mL, kadar bFGF sebesar  $1175.54 \pm 38.82$  pg/mL, kadar IL-10 sebesar  $525.12 \pm 10.24$  pg/mL, dan kadar TGF- $\beta$  sebesar  $372.53 \pm 9.18$  pg/mL.

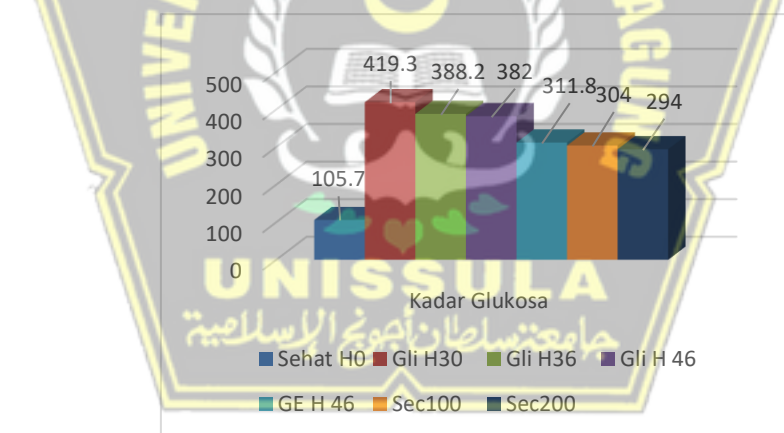
### 5.1.2 Validasi kadar gula darah pada tikus model hiperglikemi

Pemeriksaan validasi kadar glukosa pada subjek penelitian pada hari ke 30, hari ke 36 dan hari ke 46, untuk memastikan kondisi hiperglikemi pada setiap subjek penelitian sesuai kriteria inklusi untuk dibuat model luka hiperglikemi. Hasil pemeriksaan kadar glukosa dijelaskan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil validasi kadar glukosa pada tikus kelompok hiperglikemi

Kelompok	P1 H0	P1 H30	P1 H36	P1 H 46	P3 46	P4	P5
Mean	105.7	419.3	388.2	382	311.8	304	294
SD	6.19	90.28	74.41	57.48	45.2	29.19	51.11

Kadar glukosa rerata pada kelompok perlakuan hiperglikemi hari ke 30 menunjukkan hasil peningkatan signifikan dari kelompok sehat yaitu  $105,7 \pm 6,19$  meningkat signifikan menjadi  $419,3 \pm 90,28$ , kadar rerata kelompok hiperglikemi hari ke 36 didapatkan hasil  $388,2 \pm 74,41$ , kadar rerata pada kelompok hiperglikemi hari ke 46 didapatkan hasil yaitu  $382 \pm 57,48$ , dibandingkan dengan kelompok *gentamicin*  $311,8 \pm 45,2$ , kelompok sekretom  $20 \mu\text{L}$   $304 \pm 29,2$  dan kelompok sekretom  $40 \mu\text{L}$   $294 \pm 51,1$ .



Gambar 5.4 Hasil validasi kadar glukosa pada tikus kelompok perlakuan

Hasil kadar glukosa menunjukkan peningkatan secara signifikan kelompok hiperglikemi pada hari ke 30, hari ke 36, dan hari ke 46 sehingga kondisi hiperglikemi ini dapat dibuat model luka hiperglikemi.

### 5.1.3 Gambaran makroskopis luka hiperglikemi

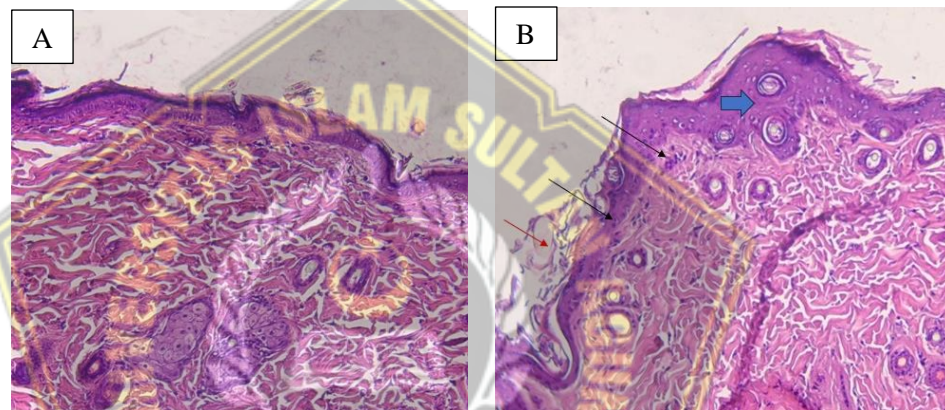
asil penelitian pengamatan secara makroskopis pada luka hiperglikemi pada hari ke 36, hari ke 43 dan hari ke 46, menunjukkan percepatan penyembuhan luka menggunakan *secretome*. Menggunakan *secretome* 40  $\mu$ L/tikus paling signifikan secara makroskopis, pada hari ke 46 penyembuhan luka sudah terlihat tersamarkan dan tertutup bulu yang tumbuh, menunjukkan bahwa penggunaan *secretome* efektif dalam percepatan penyembuhan luka, hasil analisis penutupan luka secara makroskopis ditunjukkan pada gambar 5.5:



Gambar 5.5 Makroskopis luka hiperglikemi

#### 5.1.4 Hasil histopatologi pewarnaan HE

Hasil pembacaan preparat histopatologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE) menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diinduksi STZ 65 mg/kgBB terdapat penebalan pada epitel, terjadinya nekrosis pada sel epitel dan inflamasi pada sel imun dibandingkan dengan kelompok tikus sehat. Hasil analisis preparat histopatologi HE ditunjukkan pada gambar 5.6.



Gambar 5.6 Histopatologi pewarnaan HE

Keterangan

A = Kelompok tikus sehat

B = Kelompok tikus hiperglikemi

Pewarnaan HE pada kelompok hiperglikemi menunjukkan penebalan pada epitel (panah biru), terjadinya inflamasi pada sel imun (panah hitam) dan terjadinya nekrosis pada sel epitel (panah merah).

### 5.1.5 Efek pemberian MSC *secretome hypoxia* terhadap ekspresi gen PDGF.

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa MSC *secretome hypoxia* mampu meningkatkan ekspresi gen PDGF pada tikus model luka hiperglikemi. Hasil analisa ekspresi gen PDGF menggunakan metode RTq-PCR menggunakan alat *Eco Real-Time PCR Illumina* dijelaskan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Ekspresi rerata, normalitas dan homogenitas PDGF antar kelompok perlakuan

Kelompok	Base gel (P2)	Gentamicin (P3)	Sec 20 $\mu$ L (P4)	Sec 40 $\mu$ L (P5)	<i>p value</i>
Tikus 1	0,35	0,18	0,66	0,79	
Tikus 2	0,25	0,27	0,34	0,27	
Tikus 3	0,40	0,12	0,26	0,77	
Tikus 4	0,30	0,21	0,66	0,69	
Tikus 5	0,25	0,42	0,34	0,35	
Tikus 6	0,43	0,13	0,26	0,77	
Mean	0,33	0,22	0,42	0,61	
SD	0,08	0,11	0,19	0,23	
<i>Shapiro wilk</i>	0,42*	0,29*	0,03	0,03	
<i>Levene test</i>					0,007
<i>Kruskal Wallis</i>					*0,018

Keterangan :

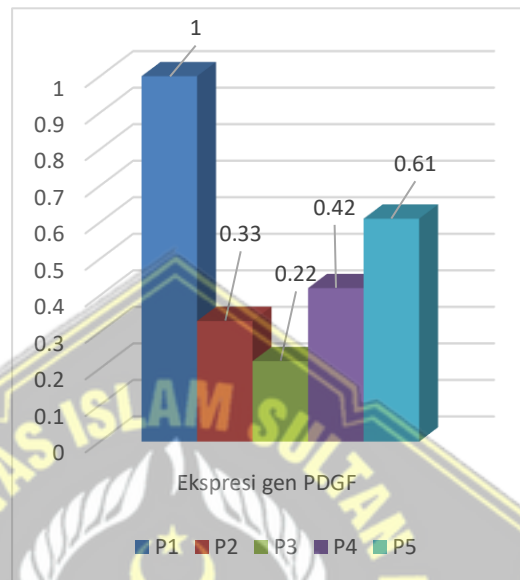
\**Uji Saphiro Wilk* ( $p > 0,05$  = normal)

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

\* *Kruskal Wallis* ( $p < 0,05$ ) = perbedaan signifikan)

Didasarkan atas tabel 5.2, temuan rerata ekspresi gen PDGF pada kelompok base gel (P2) adalah  $0,33 \pm 0,08$ , rerata kelompok *gentamicin* (P3)  $0,22 \pm 0,11$ , rerata kelompok *secretome* 20  $\mu$ L (P4)  $0,42 \pm 0,19$  dan rerata kelompok *secretome* 40  $\mu$ L (P5)  $0,61 \pm 0,23$  (Gambar 5.6). Rerata hasil ekspresi gen PDGF terdistribusi normal dengan nilai uji *Shapiro Wilk*

pada kelompok P2=0,42 dan P3=0,29 ( $p>0,05$ ), sedangkan didapat data tidak terdistribusi normal pada kelompok P4=0,03 dan P5=0,03 dengan nilai normal  $p>0,05$  dan varian data tidak homogen dengan hasil uji *Levene's Test*



Gambar 5.7 Rerata Ekspresi gen PDGF antar kelompok perlakuan

dengan nilai  $p=0,007$  dengan nilai homogen ( $p>0,05$ ). Simpulannya ialah data hasil ekspresi gen PDGF kelompok P4 dan P5 tidak berdistribusi normal dan tidak homogen.

Dengan hasil sebesar 0,018 ( $p<0,05$ ) dari analisis statistik non parametrik menerapkan uji *Kruskal Wallis* diketahui ada gap ekspresi PDGF yang signifikan antar kelompok perlakuan.

#### 5.1.6 Efek pemberian MSC *secretome hypoxia* terhadap ekspresi gen IL-1b

Menurut temuan riset, hipoksia sekretom MSC bisa menurunkan ekspresi gen IL-1b pada tikus yang dipergunakan sebagai model luka hiperglikemik. Tabel 5.3 menyajikan temuan analisis RTq-PCR terhadap ekspresi gen IL-1b memakai alat *Eco Real-Time PCR Illumina*.

Tabel 5.3 Ekspresi rerata, normalitas dan homogenitas ekspresi gen IL-1b antar kelompok perlakuan

Kelompok	Base gel (P2)	Gentamicin (P3)	Sec 20 $\mu$ L (P4)	Sec 40 $\mu$ L (P5)	<i>p value</i>
Tikus 1	2,14	0,26	0,25	0,34	
Tikus 2	1,72	0,41	0,20	0,29	
Tikus 3	3,66	0,55	0,26	0,18	
Tikus 4	1,39	0,23	0,25	0,10	
Tikus 5	2,14	0,41	0,20	0,14	
Tikus 6	3,92	0,51	0,26	0,30	
Mean	2,49	0,39	0,24	0,22	
SD	1,04	0,13	0,03	0,09	
<i>Shapiro wilk</i>	0,20*	0,47*	0,17	0,44*	
<i>Levene test</i>					0,000
<i>Kruskal Wallis</i>					*0,001
<i>Mann whitney</i>					*0,004

Keterangan :

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

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

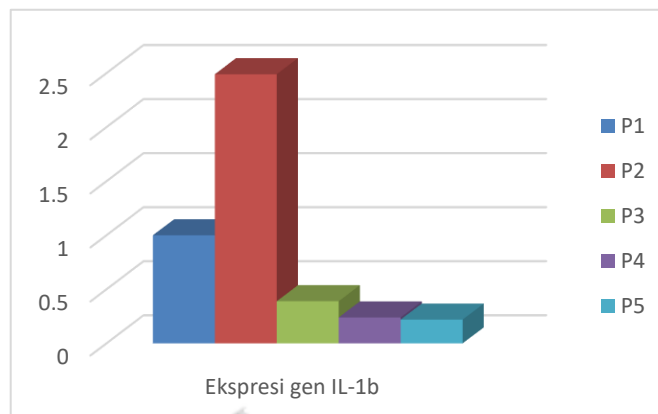
\**Kruskal Wallis* ( $p < 0,05$ ) = perbedaan signifikan)

\**Mann Whitney* ( $p < 0,05$ ) = beda bermakna)

Berdasarkan tabel 5.3 rerata hasil ekspresi gen IL-1b pada kelompok base gel (P2) sebesar  $2,49 \pm 1,04$ , rerata kelompok *gentamicin* (P3) sebesar  $0,39 \pm 0,13$ , rerata kelompok sekretom 20  $\mu$ L (P4) sebesar  $0,24 \pm 0,03$  dan rata rata kelompok sekretom 40  $\mu$ L (P5) sebesar  $0,22 \pm 0,09$ .

Gambaran Ekspresi gen IL-1b tertinggi pada kelompok base gel (P2) dan terendah pada kelompok *secretome* 40  $\mu$ L, menunjukkan bahwa *secretome* 40  $\mu$ L efektif dapat menurunkan ekspresi gen IL-1b pada tikus dengan model luka hiperglikemi.





Gambar 5.8 Ekspresi rerata, ekspresi gen IL-1b antar kelompok perlakuan

Pada kelompok P2 = 0,20, P3 = 0,47, dan P5 = 0,44, data ekspresi gen IL-1b berdistribusi normal dengan nilai uji *Shapiro Wilk*. Namun pada kelompok P4 datanya tidak berdistribusi normal dengan nilai  $p = 0,03$  ( $p > 0,05$ ) dan mempunyai varian data yang tidak homogen dengan hasil *Levene's Test* pada  $p = 0,000$  ( $p > 0,05$ ). Data ekspresi gen IL-1b ditemukan memiliki distribusi dan varian yang tidak normal, serta tidak homogen. Setelah diperoleh hasil  $p=0,001$  ( $p < 0,05$ ) untuk uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dan hasil 0,004 ( $p < 0,05$ ) untuk uji *Mann-Whitney*, maka ditetapkan adanya perbedaan ekspresi yang signifikan antara gen IL-1b pada tikus dengan model cedera hiperglikemik.

## 5.2 Pembahasan

Sebagai reaksi lokal terhadap sel inflamasi yang berbeda, inflamasi berfungsi untuk menghancurkan, memurnikan, merekonstruksi, dan melestarikan sistem homeostasis jaringan. Sel inflamasi memicu proses inflamasi dengan menstimulasi molekul yang dikenal sebagai sinyal bahaya, yang dilepaskan ketika bakteri patogen melukai bahan atau jaringan tertentu.<sup>63</sup>

Gangguan penyembuhan luka akibat hiperglikemia mengubah aktivitas sel endotel dan menyebabkan disfungsi pembuluh darah pada luka, meningkatkan risiko infeksi sampai dengan amputasi. Perubahan sejumlah faktor endogen, termasuk penurunan produksi faktor pertumbuhan, mediator respon angiogenik, aktivitas makrofag, sintesis kolagen, migrasi keratinosit dan proliferasi fibroblas menyebabkan tertundanya penyembuhan luka.<sup>59</sup> Penelitian Ormazabal *et al*, 2022 menggunakan *secretome* hipoksia MSC-EC atau kombinasi protein spesifik yang diperkaya dalam *secretome* hipoksia MSC-EC meningkatkan proses penyembuhan luka dalam kondisi hiperglikemik.<sup>57</sup> Kelompok yang menerima perawatan *secretome* menunjukkan penyembuhan luka yang cepat dan jaringan parut yang lebih sedikit. Selain itu, penelitian lebih lanjut menggunakan fibroblas manusia *secretome* berfungsi sebagai kontrol protein manusia. Ketika luka diobati dengan sekresi sel punca, ketebalan epidermal dan dermal meningkat secara nyata lebih cepat.<sup>17</sup>

Melalui pelepasan molekul pro-angiogenik parakrin, interaksi kontak sel dengan garis keturunan sel endotel, dan diferensiasi langsung, MSC secara aktif berkontribusi terhadap angiogenesis. Dengan mengaktifkan dan menarik sel induk dan sel progenitor, faktor parakrin dapat meningkatkan aliran darah ke jaringan yang terluka.<sup>66</sup>

Hasil penelitian ekspresi gen PDGF pada kelompok base gel (P2) adalah  $0,33 \pm 0,08$ , menunjukkan peningkatan rerata kelompok *gentamicin* (P3)  $0,22 \pm 0,11$ , rerata kelompok *secretome* 20  $\mu\text{L}$  (P4)  $0,42 \pm 0,19$  menunjukkan peningkatan dari kelompok P3 dan rerata kelompok *secretome* 40  $\mu\text{L}$  (P5)

menunjukkan peningkatan paling tinggi yaitu  $0,61 \pm 0,23$ , Dapat disimpulkan pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus signifikan terhadap peningkatan ekspresi gen PDGF pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi. Sejalan dengan penelitian oleh *Chen et al*, 2020 menggunakan *rutin* dapat meningkatkan produksi enzim antioksidan yang diinduksi oleh faktor nuklir *erythroid 2-related factor 2* (NRF2), menghambat ekspresi *matrix metalloproteinases* (MMPs) diatur oleh NF- $\kappa$ B, dan menurunkan ekspresi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF). Hal ini juga mempromosikan ekspresi terkait neurogenic protein (UCH-L1). *Rutin* mengurangi stres oksidatif dan respon inflamasi pada tikus hiperglikemik, mempromosikan penyembuhan luka dan mengurangi risiko luka borok.<sup>1</sup> Khususnya selama tahap angiogenesis dan pembentukan pembuluh darah dari jaringan pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya, PDGF berfungsi sebagai faktor pertumbuhan dan pembelahan. Proses diferensiasi dan vaskularisasi yang melibatkan pelepasan PDGF adalah bagaimana fungsi MSC di area luka.<sup>61</sup>

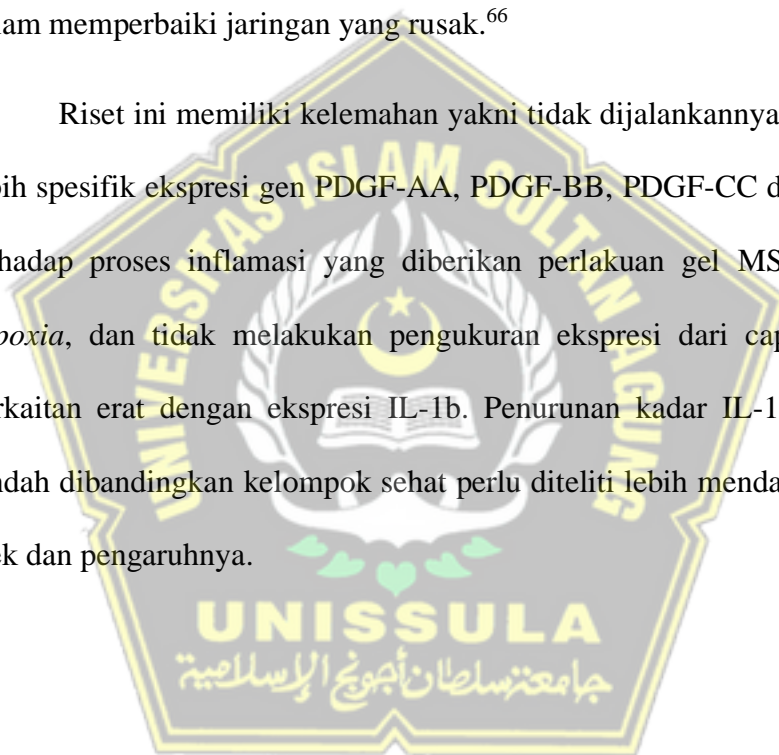
Penelitian lainya oleh *Das et al*, 2016. melaporkan peningkatan yang signifikan dalam aktivitas penyembuhan luka dengan pemberian bersama PDGF-BB dengan *proteoliposomes syndecan-4* (S4PL). potensi translasi yang signifikan dalam meningkatkan efek PDGF-BB untuk penyembuhan luka diabetik. Penambahan pengobatan bersama syndecan-4 dapat meningkatkan migrasi keratinosit dan penutupan luka dalam konteks diabetes S4PL memiliki efek imunomodulator pada makrofag luka, mengurangi peradangan dan meningkatkan penanda fenotipik makrofag M2.<sup>51</sup>

Hasil penelitian ekspresi gen IL-1b pada kelompok base gel (P2) sebesar  $2,49 \pm 1,04$ , mengalami penurunan rerata pada kelompok *gentamicin* (P3) sebesar  $0,39 \pm 0,13$ , rerata pada kelompok sekretom 20  $\mu\text{L}$  (P4) mengalami penurunan dari kelompok P3 menjadi  $0,24 \pm 0,03$  dan rerata terendah ekspresi gen IL-1b pada kelompok sekretom 40  $\mu\text{L}$  (P5) sebesar  $0,22 \pm 0,09$ . Menunjukkan bahwa pemberian gel MSC *secretome hypoxia* dosis 40  $\mu\text{L}$ /tikus efektif menurunkan ekspresi gen IL-1b pada tikus dengan model luka hiperglikemi. Sejalan dengan penelitian oleh Shiddiqi *et al*, 2017. Ekspresi IL-1 dan Caspase-1 dapat diturunkan pada tikus dengan lupus yang diinduksi pristane dengan pemberian MSC *secretome*. Hal ini ditunjukkan oleh fakta bahwa IL-1 $\beta$  dan Caspase-1 diekspresikan pada tingkat yang lebih rendah pada kelompok pristane + *secretome* dibandingkan dengan kelompok pristane.<sup>67</sup>

Penghambatan aktivasi inflamasiom NLRP3 mencegah aktivasi caspase-1, yang pada gilirannya mencegah pembentukan IL-1b, dan ini menyebabkan penurunan ekspresi caspase-1 dan IL-1b. *Stanniocalcin-1* (STC-1) yang ditemukan dalam sekretom MSC menghambat aktivasi inflamasiom NLRP3 dan juga berkontribusi terhadap penghambatan produksi ROS.<sup>68</sup> Dengan menurunkan jumlah ROS di mitokondria, pemberian sekretom MSC menghambat inflamasiom NLRP3. ROS sangat penting dalam aktivasi inflamasiom NLRP3. Aktivasi caspase-1 oleh inflamasiom NLRP3 menghasilkan konversi pro-IL-1b menjadi IL-1b aktif, yang terlibat dalam mekanisme inflamasi.<sup>67</sup> Melalui aktivasi jalur pensinyalan VEGF-A oleh berbagai faktor seperti *endothelin-1*, *IL-8*, *platelet-derived growth factor-AA*

(*PDGF-AA*), dan *IGF-2*, *MSC angiokrin* darah tepi dapat menstimulasi karakteristik fungsional dari sel-sel tersebut. Jika dibandingkan dengan normoksia, MSC hipoksia mengekspresikan tingkat molekul *Heat Shock Protein* (HSP) yang jauh lebih tinggi. Molekul HSP ini mampu melipat protein, sehingga menghasilkan fungsi protein intraseluler yang lebih baik, termasuk VEGF dan PDGF. Dibandingkan dengan MSC normoksia, MSC hipoksia lebih efisien dalam memperbaiki jaringan yang rusak.<sup>66</sup>

Riset ini memiliki kelemahan yakni tidak dijalankannya pemeriksaan lebih spesifik ekspresi gen *PDGF-AA*, *PDGF-BB*, *PDGF-CC* dan *PDGFDD* terhadap proses inflamasi yang diberikan perlakuan gel MSC *secretome hypoxia*, dan tidak melakukan pengukuran ekspresi dari *capcase-1* yang berkaitan erat dengan ekspresi *IL-1b*. Penurunan kadar *IL-1b* yang lebih rendah dibandingkan kelompok sehat perlu diteliti lebih mendalam terhadap efek dan pengaruhnya.



## BAB VI

### KESIMPULAN

#### 6.1 Kesimpulan

Didasarkan atas temuan riset, didapat simpulan yang meliputi:

Pemberian gel MSC *secretome hypoxia* berpengaruh secara signifikan atas ekspresi gen PDGF dan IL-1b pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi.

#### 6.2 Saran

Rekomendasi bagi riset berikutnya antara lain:

**6.2.1** Melakukan penelitian lebih lanjut terhadap ekspresi gen PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC dan PDGFDD terhadap proses inflamasi yang diberikan perlakuan gel MSC *secretome hypoxia* pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi.

**6.2.2** Melakukan pemeriksaan kadar capcase-1 yang diberikan perlakuan gel MSC *secretome hypoxia* pada tikus putih jantan galur *Wistar* model luka hiperglikemi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Chen LY, Huang CN, Liao CK, et al. Effects of rutin on wound healing in hyperglycemic rats. *Antioxidants*. 2020;9(11):1-13. doi:10.3390/antiox9111122
2. Rahmadani S. *Aplikasi Topikal Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona Muricata L.) Pada Luka Tikus Hiperglikemia Setelah Diberi Pakan Lemak Tinggi*. <http://etd.repository.ugm.ac.id/>
3. Wang L, Wang HL, Liu TT, Lan HY. TGF-beta as a master regulator of diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15). doi:10.3390/ijms22157881
4. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Kohl TJ. Blocking interleukin-1 $\beta$  induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(7):2579-2587. doi:10.2337/db12-1450
5. Shen S, Wang F, Fernandez A, Hu W. Role of platelet-derived growth factor in type II diabetes mellitus and its complications. *Diab Vasc Dis Res*. 2020;17(7). doi:10.1177/1479164120942119
6. Dan P, Diabetes P, Tipe M. *Perkumpulan Endokrinologi Indonesia*.; 2011.
7. Kuntardjo N, Dharmana E, Chodidjah C, Nasihun TR, Putra A. TNF- $\alpha$ -Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level, Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination. *Majalah Kedokteran Bandung*. 2019;51(1):1-6. doi:10.15395/mkb.v51n1.1479
8. HS Z, Putra A. Peran Mesenchymal Stem Cells dalam Regulasi PDGF dan Sel Islet pada Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2018;30(2):98-102. doi:10.21776/ub.jkb.2018.030.02.4
9. Badr G, Badr BM, Mahmoud MH, Mohany M, Rabah DM, Garraud O. Treatment of diabetic mice with undenatured whey protein accelerates the wound healing process by enhancing the expression of MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, KC, CX3CL1 and TGF- $\beta$  in wounded tissue. *BMC Immunol*. 2012;13. doi:10.1186/1471-2172-13-32
10. Kulkarni M, O'Loughlin A, Vazquez R, et al. Use of a fibrin-based system for enhancing angiogenesis and modulating inflammation in the treatment of hyperglycemic wounds. *Biomaterials*. 2014;35(6):2001-2010.

doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.003

11. Regmi S, Pathak S, Kim JO, Yong CS, Jeong JH. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur J Cell Biol.* 2019;98(5-8). doi:10.1016/j.ejcb.2019.04.002
12. Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy.* 2018;26(2):606-617. doi:10.1016/j.ymthe.2017.09.023
13. Vaidyanathan L. Growth factors in wound healing ↓ a review. *Biomedical and Pharmacology Journal.* 2021;14(3):1469-1480. doi:10.13005/bpj/2249
14. 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(2):845-857. doi:10.21873/INVIVO.12325
15. Bormann D, Gugerell A, Ankersmit HJ, Mildner M. Therapeutic Application of Cell Secretomes in Cutaneous Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology.* 2023;143(6):893-912. doi:10.1016/j.jid.2023.02.019
16. Karuniawan A, Andrie M, Riza H, Studi Farmasi P, Kedokteran F, Tanjungpura Pontianak U. *Uji Efek Penyembuhan Luka Sayat Salep Ekstrak Ikan Toman (Channa Micropeltes) Secara Topikal Pada Tikus Yang Diinduksi Streptozotocin.*; 2016.
17. Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy.* 2018;26(2):606-617. doi:10.1016/j.ymthe.2017.09.023
18. Ahmadi H, Amini A, Fadaei Fathabady F, et al. Transplantation of photobiomodulation-preconditioned diabetic stem cells accelerates ischemic wound healing in diabetic rats. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-020-01967-2
19. Hu W, Zhang Y, Wang L, et al. Bone morphogenic protein 4-smad-induced upregulation of platelet-derived growth Factor AA impairs endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(3):553-560. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306302



20. Mulholland EJ. Electrospun Biomaterials in the Treatment and Prevention of Scars in Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. doi:10.3389/fbioe.2020.00481
21. Manzat Saplacan RM, Balacescu L, Gherman C, et al. The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/4708076
22. Farooqi AA, Siddik ZH. Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: Rapidly emerging signalling landscape. *Cell Biochem Funct.* 2015;33(5):257-265. doi:10.1002/cbf.3120
23. Folestad E, Kunath A, Wågsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Mol Aspects Med.* 2018;62:1-11. doi:10.1016/j.mam.2018.01.005
24. Tan JL, Lash B, Karami R, et al. Restoration of the healing microenvironment in diabetic wounds with matrix-binding IL-1 receptor antagonist. *Commun Biol.* 2021;4(1). doi:10.1038/s42003-021-01913-9
25. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2018;7(7):209-231. doi:10.1089/wound.2017.0761
26. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Denis Alexander H, Ross OA. Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol.* 2018;9(APR). doi:10.3389/fimmu.2018.00586
27. Zhang X, Dai J, Li L, Chen H, Chai Y. NLRP3 Inflammasome Expression and Signaling in Human Diabetic Wounds and in High Glucose Induced Macrophages. *J Diabetes Res.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/5281358
28. Dai J, Shen J, Chai Y, Chen H. IL-1  $\beta$  Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. *Mediators Inflamm.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/6645766
29. Mirza RE, Fang MM, Weinheimer-Haus EM, Ennis WJ, Koh TJ. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes.* 2014;63(3):1103-1114. doi:10.2337/db13-0927
30. Liu Y, Liu Y, Deng J, Li W, Nie X. Fibroblast Growth Factor in Diabetic Foot

- Ulcer: Progress and Therapeutic Prospects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12. doi:10.3389/fendo.2021.744868
31. Boniakowski AE, Kimball AS, Joshi A, et al. Murine macrophage chemokine receptor CCR2 plays a crucial role in macrophage recruitment and regulated inflammation in wound healing. *Eur J Immunol*. 2018;48(9):1445-1455. doi:10.1002/eji.201747400
  32. Liu D, Yang P, Gao M, et al. NLRP3 activation induced by neutrophil extracellular traps sustains inflammatory response in the diabetic wound. *Clin Sci*. 2019;133(4):565-582. doi:10.1042/CS20180600
  33. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, et al. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049
  34. Vasanthan J, Gurusamy N, Rajasingh S, et al. Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy. *Cells*. 2021;10(1):1-14. doi:10.3390/cells10010054
  35. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1165-5
  36. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The role of tnf- $\alpha$  induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- $\beta$  and il-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783. doi:10.3889/oamjms.2018.404
  37. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. doi:10.1016/j.isci
  38. Ghaneialvar H, Soltani L, Rahmani HR, Lotfi AS, Soleimani M. Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2018;33(1):46-52. doi:10.1007/s12291-017-0641-x
  39. Lotfinia M, Lak S, Ghahhari NM, et al. Full Length Iranian Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomed J*. 2017;21(1):24-

31. doi:10.6091/.21.1.24
40. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;12(1). doi:10.1186/s12967-014-0260-8
41. Drawina P, Putra A, Nasihun T, Prajoko YW, Dirja BT, Amalina ND. Increased serial levels of platelet-derived growth factor using hypoxic mesenchymal stem cell-conditioned medium to promote closure acceleration in a full-thickness wound. *Indones J Biotechnol.* 2022;27(1):36-42. doi:10.22146/ijbiotech.64021
42. Meng X, Grötsch B, Luo Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-017-02683-x
43. Syafril S. Pathophysiology diabetic foot ulcer. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* Vol 125. Institute of Physics Publishing; 2018. doi:10.1088/1755-1315/125/1/012161
44. Alavi A, Sibbald RG, Mayer D, et al. Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(1):1.e1-1.e18. doi:10.1016/j.jaad.2013.06.055
45. Aumiller WD, Dollahite HA. Pathogenesis and management of diabetic foot ulcers. *J Am Acad Physician Assist.* 2015;28(5):28-34. doi:10.1097/01.JAA.0000464276.44117.b1
46. Noor S, Zubair M, Ahmad J. Diabetic foot ulcer - A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews.* 2015;9(3):192-199. doi:10.1016/j.dsx.2015.04.007
47. Chantelau EA. Nociception at the diabetic foot, an uncharted territory. *World J Diabetes.* 2015;6(3):391. doi:10.4239/wjd.v6.i3.391
48. Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. *J Tissue Viability.* 2016;25(4):229-236. doi:10.1016/j.jtv.2016.06.005
49. Wang CJ, Ko JY, Kuo YR, Yang YJ. Molecular changes in diabetic foot ulcers.

- Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(1):105-110.  
doi:10.1016/j.diabres.2011.06.016
50. Blakytny R, Jude EB. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds.* 2009;8(2):95-104. doi:10.1177/1534734609337151
  51. Das S, Majid M, Baker AB. Syndecan-4 enhances PDGF-BB activity in diabetic wound healing. *Acta Biomater.* 2016;42:56-65. doi:10.1016/j.actbio.2016.07.001
  52. Wang L, Wang F, Zhao L, et al. Mesenchymal stem cells coated by the extracellular matrix promote wound healing in diabetic rats. *Stem Cells Int.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/9564869
  53. Okonkwo UA, Dipietro LA. Diabetes and wound angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7). doi:10.3390/ijms18071419
  54. Kartika RW, Alwi I, Suyatna FD, et al. The Role Of Vegf, Pdgf And Il-6 On Diabetic Foot Ulcer After Platelet Rich Fibrin P Hyaluronic Therapy. *Heliyon.* 2021;7(9). doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07934
  55. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(2):65-78. doi:10.1089/wound.2014.0608
  56. Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules.* 2021;11(5). doi:10.3390/biom11050700
  57. Ormazabal V, Nova-Lampeti E, Rojas D, et al. Secretome from Human Mesenchymal Stem Cells-Derived Endothelial Cells Promotes Wound Healing in a Type-2 Diabetes Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2). doi:10.3390/ijms23020941
  58. Federer WT. *Experimental Design Theory And Application, Third Edition., Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi Bombay Calcuta.* Published online 1977.
  59. Beserra FP, Vieira AJ, Gushiken LFS, et al. Lupeol, a dietary triterpene, enhances wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats with

- modulatory effects on inflammation, oxidative stress, and angiogenesis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/3182627
60. Widyaningsih W. *Pengaruh Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Kadar C-Peptide, IL-6, Dan Polarisasi Makrofag Tipe-2 (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Obesitas Diabetes Melitus Tipe 2) (Doctoral Dissertation, Universitas Islam Sultan Agung (Indonesia))*.; 2022.
  61. HS Z, Putra A. Peran Mesenchymal Stem Cells dalam Regulasi PDGF dan Sel Islet pada Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2018;30(2):98-102. doi:10.21776/ub.jkb.2018.030.02.4
  62. Muhar AM, Putra A, Warli SM, Munir D. Hypoxia-mesenchymal stem cells inhibit intra-peritoneal adhesions formation by upregulation of the il-10 expression. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(23):3937-3943. doi:10.3889/oamjms.2019.713
  63. Putra A. *Basic Molecular Stem Cell Semarang: Unisulla Press*.; 2019.
  64. Matluobi D, Araghi A, Maragheh BFA, et al. Carvacrol promotes angiogenic paracrine potential and endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells at low concentrations. *Microvasc Res*. 2018;115:20-27. doi:10.1016/j.mvr.2017.08.003
  65. Kehl D, Generali M, Mallone A, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *NPJ Regen Med*. 2019;4(1). doi:10.1038/s41536-019-0070-y
  66. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, et al. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049
  67. Shiddiqi T, Arifin Adnan Z, Nurudhin Sub Bagian Reumatologi A, Ilmu Penyakit Dalam B. *Pengaruh Secretome Sel Punca Mesenkimal Terhadap Ekspresi Interleukin-1 $\beta$  Dan Capcase-1*. Vol 9.; 2017.
  68. Oh JY, Ko JH, Lee HJ, et al. Mesenchymal stem/stromal cells inhibit the NLRP3 Inflammasome by Decreasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Stem*

*Cells.* 2014;32(6):1553-1563. doi:10.1002/stem.1608

