

**PENGARUH PEMBERIAN GEL SEKRETOM
TERHADAP EKSPRESI MAKROFAG DAN PDGF PADA
TIKUS MODEL LUKA BAKAR DERAJAT TIGA**

Tesis



Magister Ilmu Biomedik

Syarifah Nur Aini

MBK. 20.15.01.0187

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2024**

PENELITIAN
PENGARUH PEMBERIAN GEL SEKRETOM
TERHADAP EKSPRESI MAKROFAG DAN PDGF PADA TIKUS
MODEL LUKA BAKAR DERAJAT TIGA

Disusun Oleh :

Syarifah Nur Aini

MBK. 20.15.01.0187

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji

Pada Februari 2024

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima,

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II



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

NIK 210199050

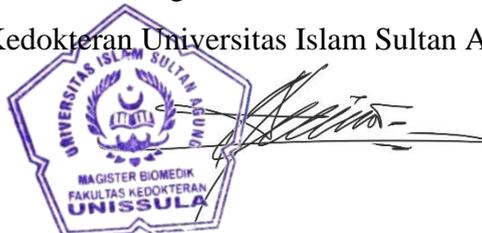
Dr. dr. Chodidjah, M.Kes

NIK 210186023

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang



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

NIK 210199050

SURAT PERNYATAAN

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

Semarang, Maret 2024



Syarifah Nur Aini



KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas perkenannya penelitian berjudul Pengaruh Pemberian Gel Secretome terhadap Ekspresi Makrofag dan PDGF pada Tikus Model Luka Bakar Derajat Tiga dapat diselesaikan. Penelitian ini merupakan bagian dari syarat menempuh Program Magister Biomedik di Unissula. Penelitian ini dapat direalisasikan berkat beasiswa dari Universitas Muhadi Setia Budi Brebes.

Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Pancasila yang telah mendanai dan mengakomodasi penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini dapat lebih bermanfaat.

Semarang, Maret 2024

Syarifah Nur Aini

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	II
SURAT PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
DAFTAR SINGKATAN	xi
Abstrak	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Makrofag Tipe 1.....	7
2.2 Platelet Derived Growth Factor (Pdgf)	12
2.3 Sekretom Mesenchymal Stem Cell	13
2.4 Luka Bakar	16

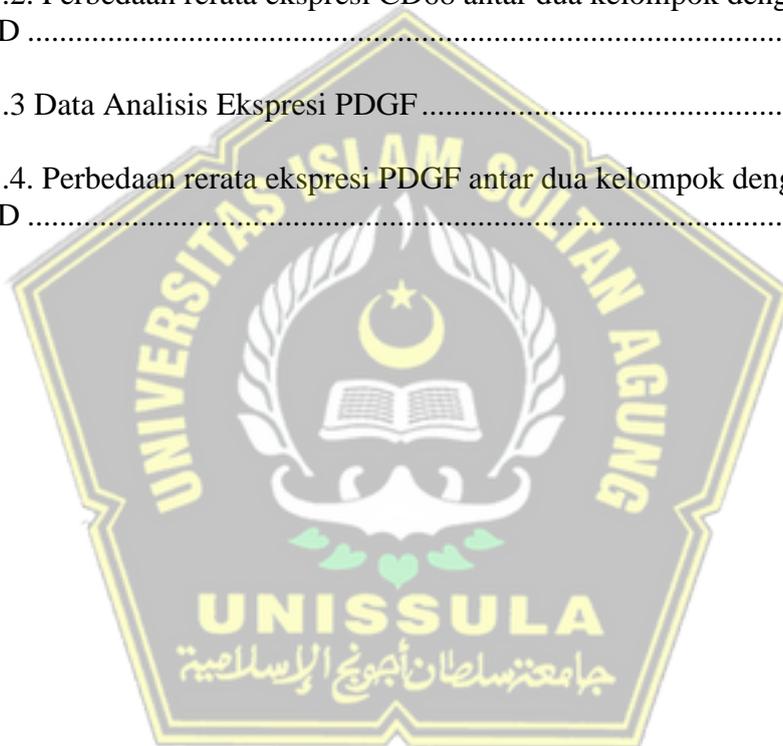
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	25
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	28
4.1. Jenis Penelitian	28
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	28
4.3. Subjek Penelitian	28
4.4. Sampel Penelitian	29
4.5. Besar Sampel	29
4.6. Teknik Sampling.....	30
4.7. Rancangan Penelitian.....	31
4.8. Identifikasi Variabel Penelitian	31
4.9. Definisi Operasional Variabel Penelitian	32
4.10. Alat dan Bahan Penelitian	33
4.11. Cara Kerja.....	33
4.12. Analisis Statistik.....	35
4.13. Alur Penelitian	37
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
5.1 Hasil Penelitian.....	38
5.2 Pembahasan Hasil Penelitian.....	46
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	50
6.1 Kesimpulan.....	50
6.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Faktor-faktor yang mempengaruhi polarisasi makrofag. ⁽²³⁾	8
Gambar 2.1. TNF- α PDGF Pathway	13
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	26
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	26
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	31
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	37
Gambar 5.1. (A) Sel terisolasi berbentuk spindle-like pada perbesaran 100x. (B) Droplet Lipid terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x. (C) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red.....	39
Gambar 5.2. Analisis flow cytometry terhadap marker penanda MSC CD90, CD29, CD45, dan CD31	39
Gambar 5.3. Pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan penurunan ekspresi CD68 yang signifikan.	43
Gambar 5.4. Pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan penurunan ekspresi PDGF yang signifikan	45
Gambar 5.5. Hasil Pengamatan Makroskopis Luka.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 2.1 Faktor parakrin dari sel punca mesenkim dan aksinya (6).....	14
Tabel 4.1 Definisi Operasional	32
Tabel 4.2 Alat dan Bahan.....	33
Tabel 5.1 Data Analisis Ekspresi CD68.....	41
Tabel 5.2. Perbedaan rerata ekspresi CD68 antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD	42
Tabel 5.3 Data Analisis Ekspresi PDGF	43
Tabel 5.4. Perbedaan rerata ekspresi PDGF antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Hasil Analisis Statistika Uji Normalitas.....	58
Lampiran Hasil Analisis Statistika Uji Homogenitas	59
Lampiran Hasil Analisis Statistika Uji Anova.....	60
Lampiran Hasil Analisis Statistika Uji Post Hoc Lsd Cd68	61
Lampiran Hasil Analisis Statistika Uji Post Hoc Lsd Pdgf	62
Lampiran Surat Bukti Penelitian.....	63



DAFTAR SINGKATAN

Asc	: <i>Adult stem cell/</i>
Akt	: <i>threonine kinase</i>
ASCs-Exos	: <i>Adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes</i>
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
Egr	: <i>Early Growth Response Gene</i>
Fpr	: <i>Formyl Peptide Receptor</i>
GM- CSF	: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HASC	: <i>Human aAdipose-Derived Mesenchymal Stem Cells</i>
HGF	: <i>Hepatocyte growth factor</i>
hMSC	: <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IPSC	: <i>Induce pluripotents stem cells</i>
JAK2/STAT3	: <i>Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
mRNA	: <i>messenger- ribonucleat acid</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	: <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
S-hMSCs	: <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
S-MSCs	: <i>Secretom Mesenchymal Stem Cells</i>
Th	: <i>Limfosit T-helper</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>

**PENGARUH PEMBERIAN GEL SEKRETOM
TERHADAP EKSPRESI MAKROFAG DAN PDGF PADA TIKUS
MODEL LUKA BAKAR DERAJAT TIGA**

Abstrak

Latar Belakang : Kejadian luka bakar paling umum terjadi dan dapat merusak jaringan kulit, otot, tulang bahkan berdampak buruk bagi organ, hingga kematian. Kerusakan dermis dari luka bakar derajat tiga dapat menghambat pembentukan kolagen dalam penyembuhan luka dan mengakibatkan komplikasi. Penggunaan stem sel sebagai terapi adjuvan memberikan hasil yang memuaskan melalui makrofag yang berperan dalam sekresi PDGF untuk menginduksi fibroblas dalam membentuk matriks ekstraseluler yang mendukung proses penyembuhan kulit. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian gel sekretom terhadap ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF pada tikus model luka bakar derajat tiga.

Metode : Penelitian eksperimental *Post Test Only Control Group Design*. Subyek penelitian 24 ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok. luka bakar dengan oles Bioplacenton (K1), base gel (K2), gel sekretom dosis 10% (K3), dan gel sekretom dosis 20% (K4). Parameter dianalisis dari sampel pada hari ke 14 pasca pembuatan luka bakar derajat tiga. Dilakukan uji *One Way Anova* dan *post hoc LSD* untuk melihat perbedaan dan dosis paling berpengaruh.

Hasil : Hasil rata-rata ekspresi makrofag yang diperoleh pada kelompok (K1) $1,09 \pm 0,29$, (K2) $1,76 \pm 0,288$, (K3) $1,12 \pm 0,23$ dan (K4) $0,80 \pm 0,12$. Sedangkan rata-rata ekspresi PDGF diperoleh hasil kelompok (K1) $1,2 \pm 0,79$, (K2) $0,68 \pm 0,89$, (K3) $1,12 \pm 0,23$ dan (K4) $1,19 \pm 0,42$. Uji Shapiro Wilk dan uji levene menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, kemudian dilanjutkan uji *One Way Anova* pada setiap kelompok. penelitian ini menunjukkan penurunan ekspresi makrofag (CD68) dan peningkatan ekspresi PDGF secara signifikan pada kelompok K4 ($p < 0.05$).

Kesimpulan : Gel sekretom dosis 20% mampu menurunkan ekspresi makrofag (CD68) dan meningkatkan ekspresi PDGF

Kata Kunci : Ekspresi PDGF, Gel sekretome, Makrofag, Luka Bakar

The Effect of Secretome Gel on Macrophage

Expression and PDGF in Third Degree Burn Rat Model

ABSTRACT

Background: Burns are the most common and can damage skin tissue, muscles, bones and even have a negative impact on organs, up to death. Damage to the dermis from third-degree burns can inhibit collagen formation in wound healing and result in complications. The use of stem cells as adjuvant therapy provides satisfactory results through macrophages which play an important role in the secretion of PDGF to induce fibroblasts to form an extracellular matrix that supports the skin healing process. The aim of this study was to determine the effect of administration of secretome gel on the expression of macrophages and PDGF in third-degree burn wound model mice.

Method: Experimental research Post Test Only Control Group Design. The research subjects were 24 mice divided into 4 groups. burn wounds with Bioplacenton topical (K1), base gel (K2), 10% dose of secretome gel (K3), and 20% dose of secretome gel (K4). Parameters were analyzed from samples on the 14th day after third degree burns. One Way Anova and posh hoc LSD tests were carried out to see the differences and the most influential dose.

Results: The average macrophage expression results obtained in groups (K1) were 1.09 ± 0.29 , (K2) 1.76 ± 0.288 , (K3) 1.12 ± 0.23 and (K4) 0.80 ± 0.12 . Meanwhile, the average PDGF expression obtained by groups (K1) was 1.2 ± 0.79 , (K2) 0.68 ± 0.89 , (K3) 1.12 ± 0.23 and (K4) 1.19 ± 0.42 . The Shapiro Wilk test and Levene test showed that the data was normally distributed and homogeneous, then the One Way Anova test was continued in each group. This study showed a significant decrease in macrophage expression and an increase in PDGF expression in the K4 group ($p < 0.05$).

Conclusion: 20% dose of secretome gel was able to reduce macrophage expression and increase PDGF expression

Keywords: PDGF Expression, Secretome Gel, Macrophage, Burn Injury

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kejadian luka bakar paling umum terjadi, dapat dialami siapa saja, kapan saja, dan dimana saja.⁽¹⁾ Berbagai aktivitas sehari-hari dapat menjadi penyebab terjadinya luka bakar misalnya luka bakar karena api, air panas, listrik, dan bahan kimia.^(2,3) Akibat dari luka bakar dapat merusak jaringan kulit, otot, tulang bahkan berdampak buruk bagi organ, hingga kematian.^(2,4) Hal ini tergantung dari derajat keparahan luka bakar. Terdapat tiga fase penyembuhan luka, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi. Pada luka bakar derajat tiga menimbulkan kerusakan pada lapisan epidermis, dermis, dan subkutis.⁽⁴⁾

Makrofag merupakan salah satu sel utama di lapisan dermis, lapisan ini juga mengandung pembuluh darah. Makrofag berperan pertama kali pada fase inflamasi, berfungsi mensekresi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi serta *growth factor*, yang kemudian akan menarik sel-sel yang berperan dalam fase proliferasi penyembuhan luka. Produksi *growth factor* seperti PDGF dan TGF- β yang akan menginduksi fibroblas untuk berproliferasi, bermigrasi dan membentuk matriks ekstraseluler. Diakhir penyembuhan luka, matriks ekstraseluler berperan untuk pembentukan kolagen sehingga terjadi pemulihan dari struktur kulit.^(4,5,6) Kerusakan dermis dari luka bakar derajat tiga mengakibatkan proses angiogenesis tidak adekuat, menyebabkan peningkatan apoptosis sel (kematian sel) sehingga menghambat pembentukan kolagen untuk penyembuhan luka. Hal tersebut menyebabkan penyembuhan luka menjadi tertunda sehingga proses inflamasi

menjadi lebih lama, akibat fase inflamasi yang terlalu lama dapat menimbulkan kecacatan dari luka yang tidak sembuh dengan sempurna dan komplikasi resiko infeksi.^(3,6,7) Kondisi ini menghambat pengobatan luka bakar baik secara operatif yang tidak menunjukkan hasil yang memuaskan maupun pengobatan non-operatif hanya mengurangi rasa nyeri.^(8,9) Ada teknologi terbaru menggunakan terapi sel punca yang membuat perbedaan besar dalam proses penyembuhan luka khususnya luka yang sulit sembuh, terapi sel punca ini bisa sebagai alternatif penyembuhan luka.⁽¹⁰⁾

Angka kematian akibat luka bakar menurut *World Health Organization* (WHO) dapat mencapai 195.000 per tahun di seluruh dunia, nilai tertinggi di Asia tenggara sebanyak 70% atau 11,6 per 100.000. Angka kejadian luka bakar di Indonesia cukup tinggi, kurang lebih 2,5 juta orang mengalami luka bakar setiap tahunnya dan lebih dari 250 jiwa per tahun sampai meninggal dunia akibat luka bakar. Insiden kematian akibat luka bakar bervariasi di setiap negara dan dipengaruhi karakteristik luka bakar.^(3,11) Maka dari itu, perlu diperhatikan cara penanganan luka bakar harus dengan pengobatan yang lebih baik.

Sejak tahun 2005, terapi stem cell pernah dilakukan di Amerika Serikat. Lalu tahun 2007, di Indonesia di RSCM terapi stem cell pertama kali pada penderita penyakit jantung. Tahun 2011, terapi stem cell untuk pengobatan kanker darah di Surabaya. Tahun 2019, stem cell sebagai alternatif terapi untuk pasien covid berat. Serta masih banyak manfaat pengobatan stem cell untuk terapi alternatif berbagai penyakit seperti stroke, penyakit ginjal, penyakit mata, kecantikan dan penyembuhan luka, serta luka bakar.^(12,13,14)

Menurut dr. Cosmos, *stem cell* di Indonesia biasanya dikenal sebagai sel

punca atau sel induk. Pada manusia, stem cell dapat ditemukan pada tali pusat, sumsum tulang, jaringan adiposa, tulang rawan, mulut, membran sinovial, cairan sinovial, otot, tendon, jaringan janin, plasenta, dan darah tali pusat. Untuk keperluan terapi menggunakan stem cellnya langsung atau secretome. Secretome adalah suatu zat yang dihasilkan oleh stem cell yang isinya growth factor, mRNA, exosome dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya, yang saat ini menjadi teknologi baru untuk pengobatan.^(8,14)

Growth factor yang terkandung di dalam stem cell adalah PDGF secara klinis terbukti efektif bila diaplikasikan secara topikal pada luka ulkus diabetik sama sulit sembuhnya seperti luka bakar, hal ini sesuai dengan yang disampaikan oleh Alinda.⁽¹⁰⁾ Menurut Miangyou,dkk dalam penelitian MSC secara in vitro bahwa stem cell dapat mensekresi TGF- β untuk memandu untuk berproliferasi pada fase penyembuhan luka menghasilkan fibroblas.⁽⁸⁾ MSC selama fase inflamasi ikut mempromosikan makrofag untuk mengurangi inflamasi, fungsi immunosupresif dan ekspresi sitokin anti-inflamasi.⁽¹⁵⁾

Penggunaan stem sel sebagai terapi adjuvan telah menunjukkan hasil yang memuaskan pada berbagai pengobatan penyakit karena memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri, potensi untuk berdiferensiasi, dan aktivitas immunomodulator.⁽⁹⁾ Oleh karena itu, peneliti ingin melakukan penelitian tentang efektivitas secretome pada luka bakar derajat tiga terhadap ekspresi makrofag, dan PDGF.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini “Bagaimana Pengaruh pemberian gel secretome terhadap ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF pada tikus model luka bakar derajat tiga?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui Pengaruh pemberian gel secretome terhadap ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF pada tikus model luka bakar derajat tiga

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui ekspresi makrofag (CD68) terhadap pemberian gel secretome pada tikus model luka bakar derajat tiga.
2. Mengetahui ekspresi PDGF terhadap pemberian gel secretome pada tikus model luka bakar derajat tiga yang diberi secretome
3. Mengetahui perbedaan ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF, kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang Pengaruh pemberian gel secretome terhadap ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF pada tikus model luka bakar derajat tiga

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi keilmuan medis tentang Pengaruh pemberian gel secretome terhadap ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF pada tikus model luka bakar derajat tiga

1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti,tahun	Judul	metode	Hasil
Hu L,et.al. 2016. ⁽¹⁵⁾	Exosomes derived from human adipose menseschymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts.	HASC media kultur dan eksosom secara in vivo pada tikus	Hasil eksperimen in vivo menunjukkan ASCs-Exos dapat direkrut ke area luka jaringan lunak dalam model sayatan kulit tikus dan penyembuhan luka kulit secara signifikan
Sholahuddin, Rhatomy;dkk. 2020. ⁽⁹⁾	Penggunaan Secretome sebagai Terapi Adjuvant dalam Penyembuhan Robekan Ligamen dan Tendon.	In vitro pada tikus	Hasil peningkatan viabilitas sel, proliferasi sel, migrasi sel yang signifikan, dan penurunan sel inflamasi.
Aisyah, Sitti. 2014. ⁽⁷⁾	Efek Pemberian Ekstrak Daun Cincau Hijau terhadap Peningkatan Ekspresi VEGF pada Luka bakar derajat IIB Tikus Galur Wistar.	Eksperimental	Memberikan hasil peningkatan VEGF yang sama dengan obat standar luka bakar.
Belda, Angela jane. 2022. ⁽⁴⁾	Efektivitas Gel Ekstrak Etanol Daun Pegagan (<i>Centella asiatica L.</i>) dan Daun Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i>) dapat Menurunkan Jumlah Sel Limfosit dan Sel Makrofag pada Luka Bakar Tikus Putih Jantan Galur Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).	Eksperimental	Gel ekstrak etanol daun <i>Centella asiatica L.</i> dan daun <i>Andrographis paniculata</i> efektif dalam menyembuhkan luka bakar karena tidak memberikan perbedaan bermakna dengan kontrol positif Bioplacenton®, namun berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif NaCl 0,9% dan kelompok kontrol negatif basis.

Hasil penelitian Li Hu, mengguakan perlakuan luka sayat pada tikus, dilihat penyembuhan lukanya dengan pengobatan MSC eksosom. Menurut Sholahuddin, MSC menurut dapat menunjukkan peningkatan viabilitas sel, proliferasi sel,

migrasi sel yang signifikan, dan penurunan sel inflamasi. Namun berbeda dengan Aisyah yang melakukan penelitian luka bakar menggunakan bahan alamiah daun cincau hijau memberikan hasil peningkatan VEGF yang sama dengan obat standar luka bakar yang pada umumnya dipakai. Penelitian Belda seperti penelitian Aisyah, menggunakan gel centella dan sambiloto pada luka bakar, yang berkhasiat untuk penyembuhan luka bakar, tetapi tidak bermakna signifikan dengan pengobatan Bioplacenton yang selama ini juga digunakan untuk pengobatan luka bakar.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 MAKROFAG TIPE 1

2.1.1. Definisi Makrofag

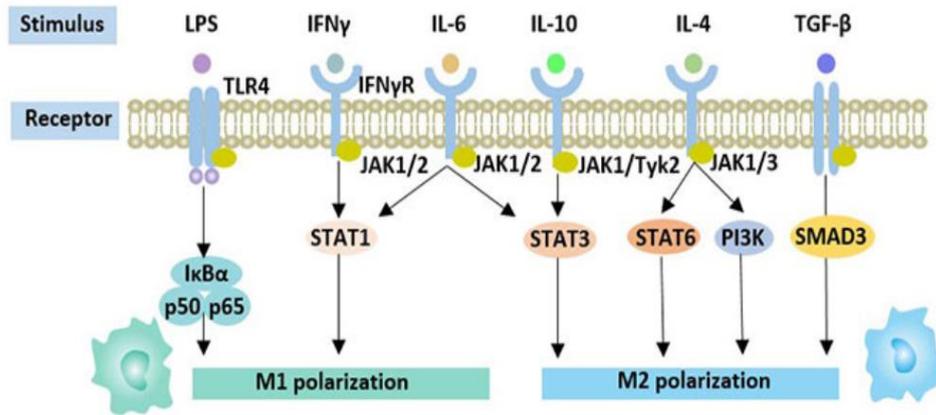
Makrofag adalah sel kekebalan tubuh yang berfungsi dalam sistem pertahanan. Sebagai jenis sel darah putih, makrofag bertanggung jawab untuk fagositosis mikroorganisme, sel mati, serta debris seluler, sehingga berperan penting dalam respon imun dan peradangan.

2.1.2. Jenis dan Fungsi Makrofag

Menurut keadaan aktivasi dan fungsi makrofag, makrofag dapat dibagi menjadi tipe yaitu M1 dan tipe M2⁽²²⁾ Fungsi makrofag secara umum untuk meningkatkan fagositosis dan menaikkan aktivitas *enzim lisosom*.⁽²¹⁾ Peran makrofag M1 adalah untuk mengeluarkan sitokin dan kemokin pro-inflamasi, menyajikan antigen, dan dengan demikian berpartisipasi dalam respon imun positif dan berfungsi sebagai monitor imun. Sitokin pro-inflamasi utama yang dihasilkannya adalah IL-6, IL-12, TNF- α . Sedangkan peran makrofag M2 berfungsi mengurangi peradangan dan berkontribusi terhadap pertumbuhan tumor dan fungsi immunosupresif. Ini memainkan peran penting dalam penyembuhan luka dan perbaikan jaringan.^(22,23)

2.1.3. Jalur Sinyal Makrofag

Jalur sinyal makrofag mempengaruhi polarisasi melalui jalur Notch dengan mengontrol ekspresi gen, sehingga memodulasi respon imun.⁽²³⁾



Gambar 2.1. Faktor-faktor yang mempengaruhi polarisasi makrofag.⁽²³⁾

Makrofag yang diturunkan dari myelo mengaktifkan Notch1 dan NF- κ B di bawah stimulasi LPS dan reseptornya sehingga makrofag tipe M1 terpolarisasi. Jalur pensinyalan JAK-STAT terkait erat dengan aktivitas fenotip makrofag, IFN- γ bekerja pada jalur ini, sehingga menginduksi polarisasi makrofag M1, dalam mekanisme meningkatkan efek anti-inflamasi dalam kondisi tertentu.

Jalur PI3K berperan penting dalam kelangsungan hidup makrofag. AKt kinase yang berbeda memiliki efek berbeda pada polarisasi makrofag. Diantaranya Akt1 dapat diaktifkan oleh PI3K, dan ablasi AKt1 menyebabkan polarisasi makrofag tipe M1, sedangkan ablasi AKt2 menyebabkan polarisasi makrofag tipe M2.

Selain jalur pensinyalan di atas, biosintesis mitokondria juga memainkan peran penting dalam polarisasi makrofag. Selain itu, HGF mempromosikan transformasi makrofag dari M1 ke M2 dengan mengaktifkan jalur pensinyalan JAK2/STAT3. Tetapi mekanisme molekulernya tidak jelas.^(23,24,25)

2.1.4. Penanda Makrofag

CD68 dan CD11b adalah penanda total makrofag. Untuk makrofag M1 dan M2, mereka memiliki penanda khusus.^(24,25) Jenis M1 memiliki penanda berupa CD80, CD86, CD64, CD16, dan CD32. Selain itu, ekspresi nitric oxide synthase (iNOS) pada M1 juga dapat berfungsi sebagai penanda fenotipik.

- a. CD80, juga dikenal sebagai B7, B7.1, atau BB1, adalah antigen yang diaktifkan oleh limfosit T. CD80 bersinergi dengan CD86 untuk mengaktifkan limfosit T dan memainkan peran penting dalam pemantauan autoimun, respons imun humoral, dan respons transplantasi.
- b. CD86, juga dikenal sebagai B7.2, adalah antigen aktivasi limfosit T dan dapat diekspresikan dalam sel dendritik, monosit, limfosit T, dan limfosit B. CD86 berinteraksi dengan ligannya CD28 dan CTLA4 untuk menginduksi proliferasi limfosit T dan menghasilkan IL-2.
- c. CD64, juga dikenal sebagai reseptor imunoglobulin gamma Fc afinitas tinggi I, memiliki fungsi respon imun bawaan dan respon imun adaptif.
- d. CD32 juga dikenal sebagai reseptor region immunoglobulin gamma Fc afinitas rendah II-b, yang terlibat dalam fagositosis kompleks imun dan regulasi sel b pada produksi antibodi.

CD163 dan CD206 merupakan penanda utama untuk identifikasi makrofag M2. Penanda permukaan terkait untuk sel tipe M2 juga mengandung CD68. Selain itu, arginase 1 (Arg1) dan DECTIN-1 juga merupakan indikator fenotipik yang ideal untuk identifikasi makrofag M2.

Studi lainnya, FIZZ1, Ym1 dan Ly6C juga digunakan sebagai penanda permukaan yang terkait dengan subpopulasi makrofag M1 atau M2.

- a. CD206, reseptor manosa 1, adalah lektin tipe-C yang terutama terdapat dalam makrofag dan sel DC yang belum matang. Ini mempromosikan aktivasi makrofag, presentasi antigen dan respon imun.
- b. CD163 adalah penanda makrofag terkait tumor tipe M2 yang sangat spesifik yang diekspresikan terutama pada permukaan monosit dan makrofag. CD163 kaya sistein reseptor sistein (SRCR), yang hanya diekspresikan dalam garis sel mononuklear-makrofag. CD163 tidak hanya dapat menahan peradangan, tetapi juga memainkan peran penting dalam proliferasi dan metastasis tumor sebagai anggota keluarga makrofag terkait tumor. Studi telah menunjukkan bahwa CD163 terkait erat dengan kanker payudara, kanker kandung kemih, kanker paru-paru, kanker kolorektal dan tumor ganas lainnya. Tingkat infiltrasi CD163 mempengaruhi proliferasi tumor, invasi, metastasis dan prognosis.
- c. CD68 terlibat dalam aktivitas fagositik makrofag. Resirkulasi cepat CD68 dari endosom dan lisosom ke membran plasma memungkinkan identifikasi atas substrat pembawa selectin atau sel lain.

Studi terbaru menunjukkan bahwa MS4A4A diekspresikan hanya dalam sel myeloid dan diatur secara berbeda dalam makrofag M1 dan M2 yang diturunkan dari monosit, yang dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan antara makrofag M1 dan M2. Sel CD38, Gpr18, dan Fpr2 adalah penanda M1, sedangkan Egr2 dan C-MYC adalah penanda M2. Flow cytometry berdasarkan CD38/Egr2 dapat membedakan makrofag M1 dan

M2, dan memiliki keunggulan dibandingkan penanda fenotipe iNOS, arginase-1 dan CD206 klasik.

2.1.5. Efek Sekretom terhadap Aktivitas Makrofag pada Proses Penyembuhan Luka

Awalnya peran makrofag sebagai fagositosis. Makrofag terdapat 2 jenis: M1 dan M2. Aktivasi makrofag proinflamasi M1 yang mensekresi sitokin dan kemokin inflamasi untuk penyembuhan luka, sedangkan makrofag M2 merupakan makrofag utama (residen) dalam mencegah inflamasi. Proses diferensiasi makrofag tergantung pada induksi sitokin yang diterimanya, umumnya dikategorikan menjadi dua himpunan bagian yaitu aktivasi secara klasik Makrofag M1 yang terekspresi pada marker CD68 dan aktivasi secara alternatif Makrofag M2 yang terekspresi pada marker CD163. Aktivasi M1 diinisiasi oleh PAMPs, IFN- γ yang dihasilkan oleh sel NK dan sel Th1, aktivasi Lipopolisakarida (LPS) bakteri dan stimulus dari *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) yang merangsang produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , TNF, IL-12, IL-18 dan IL-23 sehingga membantu untuk mendorong respons inflamasi sel Th1 dan Th17 spesifik antigen. Makrofag M2 bersifat anti-inflamasi yang diinduksi oleh infeksi jamur, infeksi cacing, komponen komplemen, sel apoptosis, hipersensitivitas kompleks imun, *macrophage colony stimulating factor* (MCSF), IL-4, IL-10, IL-13 dan TGF- β . Aktivasi ini menyebabkan sekresi IL-10 dalam jumlah banyak dan IL-12 dalam jumlah lebih sedikit.^(4,27,32)

2.2 PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR (PDGF)

2.2.1. Definisi

Platelet-derived growth factor (PDGF) merupakan salah satu *Growth Factor* diproduksi dari trombosit yang terlibat langsung dalam proses perkembangan dan fisiologis yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel. Selain itu, PDGF terlibat dalam aktivasi sel fibroblas yang berperan dalam produksi kolagen pada proses penyembuhan luka.

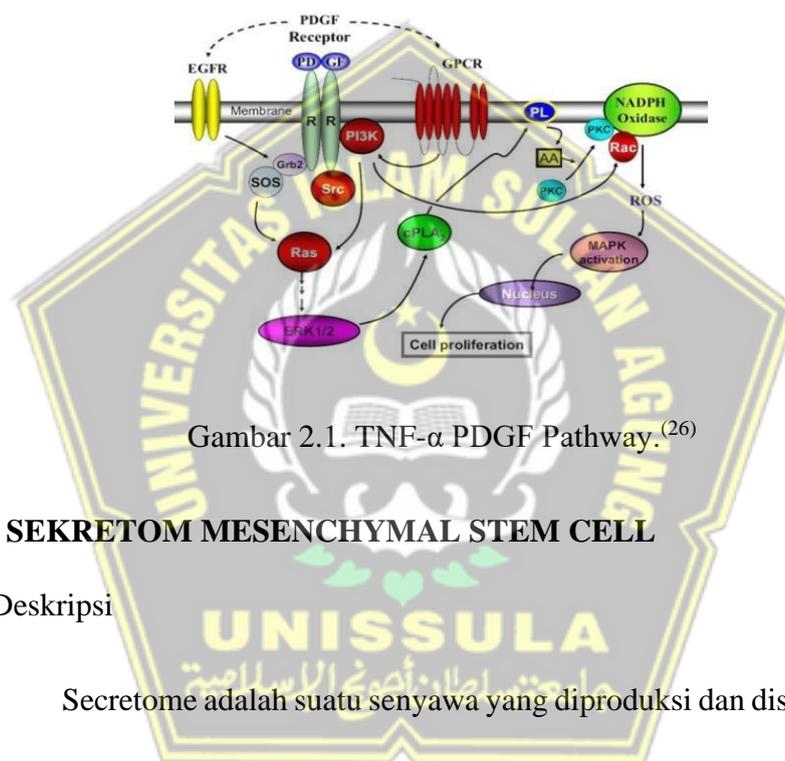
2.2.2. Jenis PDGF

Pada manusia, jaringan signaling PDGF terdiri dari empat ligan, yaitu : PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, yang secara selektif memberi sinyal melalui dua reseptor PDGF (PDGFR) untuk mengatur beragam fungsi seluler, terutama PDGF-A dan B adalah satu-satunya ligan yang diidentifikasi untuk PDGFR. PDGFR disimpan dalam alpha trombosit, dan dirilis oleh trombosit pada saat aktivasi, juga diproduksi oleh sejumlah besar sel termasuk sel otot polos, makrofag, dan sel-sel endotel.

2.2.3. Peranan PDGF

Secara khusus, PDGF memainkan peran penting dalam pembentukan pembuluh darah (angiogenesis), pertumbuhan pembuluh darah dari jaringan pembuluh darah yang sudah ada. PDGF adalah mitogen kuat untuk sel mesenchymal, termasuk sel-sel otot polos dan sel glial. PDGF berasal dari platelet dan makrofag merupakan sinyal utama ke fibroblast selanjutnya bermigrasi menuju tempat luka dari jaringan sekitarnya, kemudian mulai mensintesis kolagen dan berkembang biak. Respon PDGF, fibroblas

sementara mensintesis matriks yang terdiri dari kolagen tipe III, *glycosaminoglycans*, dan *fibronectin 1* yang menyediakan tempat untuk migrasi keratinosit. Secara singkat, peningkatan PDGF di jaringan mempercepat waktu untuk terjadinya proses penyembuhan luka. Aktivasi PDGF meningkat setelah terjadinya induksi dari TNF- α . PDGF ikut berpartisipasi dalam penyembuhan luka, pengaturan tonus pembuluh darah dan mempertahankan tekanan cairan interstisial.^(26,27,28)



Gambar 2.1. TNF- α PDGF Pathway.⁽²⁶⁾

2.3 SEKRETOM MESENCHYMAL STEM CELL

2.3.1. Deskripsi

Secretome adalah suatu senyawa yang diproduksi dan disekresikan oleh sel punca mesenkimal darah tali pusat manusia yang berisi *growth factor*, mRNA, exosome dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya, yang saat ini menjadi teknologi baru untuk pengobatan. Secretome atau dikenal dengan *stem cell conditioned medium* memiliki peran mekanisme parakrin. Sekretom juga telah terbukti potensial dalam mendukung neovaskularisasi dan angiogenesis.^(8,14)

2.3.2. Kandungan Protein dalam Secretome yang dihasilkan

Telah diketahui bahwa sel punca mesenkim mampu mengekspresikan dan memproduksi bermacam – macam growth factor dan sitokin yang aktif. Adapun beberapa secretome yang dimaksud adalah fibroblast growth factor, seperti IL-1, IL6, TGF- β , dan VEGF. Berdasarkan penelitian sel punca mesenkim asal sumsum tulang manusia, dapat diisolasi G-CSF, SCF, LIF, M-CSF, IL-6, dan IL-11 dari media yang dipakai untuk menumbuhkan sel punca secara in vitro.

Growth factor dan sitkoin mampu mempercepat perbaikan jaringan, termasuk didalamnya memodifikasi respon imun, anti-apoptosis, kemampuan bertahan hidup dari sel, metabolisme sel, proliferasi sel, diferensiasi sel, hematopoiesis, myogenesis, angiogenesis, pertumbuhan rambut, penyembuhan luka, perlindungan terhadap ginjal, dan fungsi lain yang masih dapat dieksplorasi (6).

Tabel 2.1 Faktor parakrin dari sel punca mesenkim dan aksinya (6).

<i>Paracrine factors</i>	<i>Action</i>
VEGF, HGF, STC-1, SFRP-2, SDF-1, TGF- β , IGF-1, bFGF, TB-4	<i>Cell survival</i>
VEGF, bFGF, IL-1, TNF- α , PDGF-BB, Ang-1, Ang-2, FGF-2, TGF- β , SDF-1, IGF-1, PIGF, MCP, HGF	<i>Angiogenesis</i>
VEGF, FGF-2, HGF, IGF-I, TB4	<i>Anti-apoptosis</i>
VEGF, HGF, IGF-I, TNF- α , TGF- β , G-CSF, SCF, LIF, M-CSF, IL-6, IL-11, Activin A	<i>Cell differentiation</i>
BDNF, NGF, neuregulin-1, BNP, IL-6, FGF-2, GDNF VEGF, HGF, FGF-20	<i>Neuroprotection and regeneration</i>
IL-1, IL-10, TB-4, MMP-2, MMP-9, MCP-1, TSP-1, TGF- β , TIMP-1, TIMP-2, TIMP-9, HGF, NGF, ErbB-2	<i>Tissue remodeling</i>
VEGF, bFGF, FGF-2, HGF, TB-4, IGFBP-7	<i>Cell contractility</i>
IL-6, IL-10, IL-1 β , TGF- β , INF- γ , GM-CSF, PGE-2,IDO, HGF, TNF- α , activin A	<i>Immunomodulatory effect</i>
VEGF, endothelin, Smad-4, Smad-5, glypican-3, FGF- 16	<i>Cell proliferation and migration</i>

2.3.2. Potensi Secretome dalam penyembuhan luka

Dalam proses penyembuhan luka, terlibat banyak sel maupun molekul seperti sitokin dan growth factor (15). Sel punca dalam perkembangannya secara *in vitro* akan mensekresikan berbagai molekul yang disebut secretome. Secretome sendiri terdiri dari growth factor dan sitokin seperti yang tertera pada tabel II.1 (6), dimana growth factor dan sitokin yang dihasilkan ini merupakan molekul yang berperan dalam penyembuhan luka seperti TNF- β , IL-6, dan molekul lainnya. Beberapa peranan dari secretome dalam proses penyembuhan luka adalah berperan dalam pembentukan myofibroblast dan matriks (16), dimana myofibroblast sendiri mampu menyebabkan kontraksi dari daerah sekitar luka sehingga mempersempit luas luka (15). Adapun fungsi lain dari secretome yaitu membantu migrasi fibroblas dan keratinosit yang berperan dalam penyembuhan luka, serta berkontribusi dalam pembentukan matriks ekstrasel (8).

Fungsi secretome tersebut meningkatkan dugaan bahwa conditioned medium sel punca yang berisi secretome mampu mempercepat penyembuhan luka. Dugaan ini diperkuat dengan percobaan penggunaan conditioned medium oleh Mishra P et al. dimana luka akibat sayatan dapat menutup dengan lebih cepat dengan penggunaan sel punca maupun conditioned medium sel punca manusia secara *in vivo* (16). Penelitian lain oleh Walter M. N. M. et al. juga membuktikan bahwa conditioned medium mampu mempercepat penyembuhan luka secara *in vitro* menggunakan sel line L929 fibroblast dan HaCaT keratinosit (8). Selain itu, sel punca tidak mengekspresikan MHC-II, CD40, CD80, dan CD86 (2), sehingga diduga pula

tidak terjadi reaksi penolakan oleh hewan coba, dalam hal ini tikus. Hal ini terbukti oleh pengujian in vivo menggunakan hewan coba berupa tikus ataupun babi oleh peneliti lain menggunakan conditioned medium sel punca manusia (17), dan in vitro menggunakan cell line tikus yaitu L929 fibroblas juga tidak terjadi respon penolakan (8).

2.4 LUKA BAKAR

2.4.1. Definisi umum

Luka bakar adalah suatu luka pada kulit atau jaringan lain terutama karena panas ataupun trauma akut lainnya. Luka bakar terjadi ketika sel pada kulit atau jaringan lain rusak akibat cairan panas, benda panas, api, radiasi, listrik, gesekan, ataupun karena terkena bahan kimia (11). Luka bakar berpotensi menghancurkan kulit dan jaringan lainnya seperti pembuluh darah, pembuluh saraf, tendon dan tulang, sehingga meningkatkan risiko terjadinya infeksi .

2.4.2. Klasifikasi luka bakar

a. Derajat satu (Superficial).

Luka bakar ini hanya mengenai epidermis. Luka tidak menyebabkan kulit melepuh, namun kulit dapat memerah dan agak sakit. Selama 2 sampai 3 hari kemerahan dan rasa sakit masih dapat teramati dan sekitar hari ke-4, epitel akan terkelupas dan digantikan dengan lapisan epidermis baru di bawahnya .

b. Derajat dua (Partial – thickness).

Terdiri dari 2 jenis, luka bakar derajat dua parsial superficial dan deep. Luka bakar ini mengenai epidermis dan sedikit bagian dermis. Luka bakar superficial menyebabkan kulit melepuh di antara epidermis dan dermis. Rata-rata luka bakar parsial superficial ini dapat sembuh secara alami kurang dari 3 minggu dan tanpa gangguan fungsi ataupun scarring. Luka bakar derajat dua sering menyebabkan penumpukan eksudat fibrin dan sisa-sisa nekrosis pada permukaan kulit yang dapat menyebabkan penumpukan bakteri dan menyebabkan penghambatan penyembuhan luka. Luka bakar parsial deep mencapai lapisan bawah dari dermis. Jika infeksi dicegah dan dibiarkan sembuh secara alami, maka luka akan sembuh dalam 3 sampai 9 minggu. Untuk luka bakar parsial deep dapat menyebabkan pembentukan bekas luka. Pembentukan bekas luka sering sekali ditemui dan dapat mengganggu pergerakan. Pengobatan terbaik adalah dengan pembedahan atau grafting

c. Derajat tiga (Full – thickness)

Luka bakar derajat tiga mengenai seluruh bagian dermis dan sering menyebabkan luka pada jaringan adiposa subkutan. Bila bekas luka didiamkan beberapa hari atau minggu, eschar dapat terpisah dari jaringan dan menyebabkan luka terbuka. Tanpa operasi, luka hanya dapat sembuh bila terjadi *wound contracture* dengan epitelisasi. Dapat pula dilakukan grafting

(11).

d. Derajat empat (Deep full – thickness)

Luka bakar derajat tiga yang menyebabkan kerusakan yang lebih dalam dan mengenai otot, tendon, ligamen, dan tulang. Luka bakar tipe ini biasanya membutuhkan amputasi atau teknik penutupan luka alternatif.

2.4.3 Proses penyembuhan luka

Penyembuhan luka berkaitan dengan komunikasi antar sel yang berbeda dan matriks ekstrasel. Dalam kondisi normal, penyembuhan luka berlangsung baik, dimana seiring bertambahnya usia menyebabkan penyembuhan luka memburuk dan dapat menyebabkan pembentukan bekas luka disertai perubahan struktur jaringan dan fungsi. Ketika penyembuhan luka secara alami kurang optimal, dapat menyebabkan terjadinya ulkus pada kulit ataupun pembentukan bekas luka atau keloid. Aliran darah yang buruk, diabetes melitus, dan tekanan merupakan penyebab utama dalam luka yang tidak dapat sembuh. Sedangkan faktor sistemik, seperti nutrisi dan sistem imun, usia, stress, dan faktor komorbid lain juga dapat memperburuk penyembuhan luka (9). Secara umum perbaikan luka terjadi melalui tahapan – tahapan antara lain :

a. Fase respon vaskular.

Merupakan fase pertama dalam proses penyembuhan luka, terjadi hemostasis dan pembentukan matriks, dan terjadi segera setelah luka yang kemudian akan selesai setelah beberapa jam. Fase ini juga merupakan awal dari proses inflamasi. Terkadang disebutkan juga sebagai fase lag, dimana terjadi rekrutmen sel dan faktor biologis ke daerah luka. Kemudian akan terjadi kaskade pembekuan darah oleh

faktor pembekuan darah dan trombosit teraktivasi. Pembuluh darah yang terluka akan mengalami vasokonstriksi selama 5 hingga 10 menit yang disebabkan oleh platelet untuk mengurangi hilangnya darah dan menutup luka dengan darah yang mengandung sitokin dan growth factor. Platelet dan leukosit akan mengeluarkan sitokin dan growth factor yang mengaktivasi proses inflamasi (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α), menstimulasi pembentukan kolagen (FGF-2, IGF-1, TGF- β), mengaktivasi perubahan fibroblas menjadi myofibroblast (TGF- β), memulai angiogenesis (FGF-2, VEGF-A, HIF-1 α , TGF- β), dan membantu proses reepitelisasi (EGF, FGF-2, IGF-1, TGF- α).

b. Fase inflamasi.

Fase inflamasi teraktivasi pada saat fase hemostasis dan koagulasi. Karena ada respon dari jalur komplemen yang aktif, degranulasi platelet, dan produk sampingan dari degradasi bakteri, neutrofil akan menuju ke lokasi luka dan menetap selama 2 sampai 5 hari kecuali adanya infeksi pada luka. Kerja dari neutrofil penting pada masa awal dari terjadinya luka karena kemampuan fagositosis dan sekresi protease yang mampu membunuh bakteri dan membantu menghancurkan jaringan yang mengalami nekrosis.

Selain itu, neutrofil juga merupakan chemoattractants untuk sel lain yang berperan dalam fase inflamasi. Neutrofil mensekresikan mediator seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 yang memperkuat respon inflamasi dan menstimulasi VEGF dan IL-8 untuk memberikan proses

penyembuhan yang baik. Neutrofil mampu menghilangkan jaringan yang mati dengan cara mengeluarkan senyawa antimikroba yang sangat aktif dan proteinase. Setelah 3 hari, makrofag akan masuk ke lokasi luka dan membantu proses penyembuhan dengan melakukan fagositosis terhadap patogen dan sisa sel, serta mensekresikan growth factor, kemokin dan sitokin dimana senyawa ini juga membantu pada fase proliferasi. Respon inflamasi penting sekali dalam penyembuhan luka untuk menghasilkan growth factor dan sinyal sitokin yang bertanggung jawab dalam mobilisasi sel dan jaringan.

Makrofag sendiri memiliki banyak fungsi termasuk dalam pertahanan, penghilangan sel yang mati, serta membantu proliferasi sel dan perbaikan jaringan. Makrofag juga berperan penting dalam kesuksesan penyembuhan luka melalui sintesis berbagai growth factor seperti TGF- α , TGF- β , FGF, PDGF, dan VEGF, yang menstimulasi proliferasi sel dan sintesis matriks ekstrasel .

c. Fase proliferasi dan perbaikan jaringan.

- Re Epitelisasi

Pada fase proliferasi, yang biasanya terjadi 3 sampai 10 hari setelah luka, tujuan utama dari proses penyembuhan adalah menutupi permukaan luka, pembentukan granulation tissue, dan memperbaiki aliran darah. Dibawah kendali sitokin seperti IFN- γ dan TGF- β , sintesis kolagen, fibronectin, dan substansi lain yang dibutuhkan dalam penyembuhan luka oleh fibroblas akan menjadi basis untuk

matriks baru dari jaringan konektif, berperan sebagai pengisi ruang diantara jaringan. Sintesis kolagen akan meningkat, sementara proliferasi dari fibroblas akan menurun sehingga terjadi keseimbangan antara sintesis dan degradasi matriks ekstrasel. Proses reepitelisasi dilakukan oleh keratinosit pada pinggiran luka dan oleh sel punca dari folikel rambut atau kelenjar keringat. Proses ini berlangsung karena adanya sinyal dari sel pada daerah di sekitar luka yang mensekresikan berbagai macam sitokin dan growth factor seperti EGF, KGF, IGF-1, dan NGF. Kemudian peniadaan inhibisi kontak pada desmosom dan hemidesmosom menghasilkan mediator lipid dan mengaktifasi membrane-associated kinase (SRC kinase) menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap ion. Tahap ini menjadi sinyal penguinisasi terhadap sel pada daerah sekitar luka. Oleh karena adanya peregangan desmosom intersel oleh kolagenase dan elastase, keratinosit bermigrasi menuju ke permukaan dari granulation tissue. Proses ini disebut juga sebagai keratinosit “shuffling” dan dideskripsikan sebagai kemampuan sel untuk bermigrasi secara kompetitif karena gradien konsentrasi yang disebabkan oleh mediator seperti IL-1, dan dari matriks yang kaya akan fibronectin menuju pusat luka. Pergerakan dari cytoskeletal diatur oleh RhoGTPase (Rho, Rac, Cdc42). GTPase kecil merupakan perubah susunan fiber intrasel dan penting dalam proses epitelisasi. Proses ini berlangsung hingga sel yang bermigrasi saling bersentuhan.

Kemudian GTPase akan menjadi tidak aktif dan mengakibatkan penyusunan ulang cytoskeleton.

- Angiogenesis

Perbaikan sistem vaskular dari kulit merupakan suatu kaskade yang kompleks antara seluler, humoral, dan molekuler dalam luka untuk menghubungkannya kembali dengan perfusi nutrisi. Diinisiasi oleh growth factor seperti VEGF, PDGF dan bFGF. Tahap pertama adalah pengikatan growth factor oleh reseptor pada sel endotel sehingga mengaktifasi kaskade sinyal intrasel. Sel endotel yang aktif akan mensekresikan enzim proteolitik yang mampu melarutkan lamina basal, sehingga sel endotel mampu berproliferasi dan bermigrasi ke luka, sebuah proses yang juga dikenal dengan sebutan “sprouting”. Kemudian sel endotel akan mengeluarkan matriks metalloproteinase yang menghancurkan jaringan disekitar jalur proliferasi endotel. Sprout baru membentuk sebuah pipa kecil yang menghubungkan sprout satu dengan lainnya. Kemudian sprout akan berdiferensiasi menjadi arteri dan venula yang akan menjadi dewasa ketika adanya rekrutmen pericytes dan sel otot polos pada dindingnya. Dan setelah itu, barulah aliran darah akan mengalir ke pembuluh yang baru terbentuk ini dan mengakhiri proses angiogenesis .

- Pembentukan granulation tissue

Tahap terakhir dari fase proliferasi adalah pembentukan granulation tissue. Pada waktu yang bersamaan, fase pemodelan ulang sudah

dimulai. Sebagai jaringan transisional, jaringan ini menggantikan lapisan fibrin – fibronektin. Jaringan ini memiliki ciri tingginya kandungan fibroblas, granulosit, makrofag, kapiler, dan susunan kolagen yang renggang. Pada akhir dari fase ini, jumlah fibroblas akan berkurang karena mengalami diferensiasi menjadi myofibroblast dan dihilangkan melalui apoptosis.

- Fase pemodelan ulang

Fase ini merupakan fase terakhir dalam penyembuhan luka, terjadi sekitar hari ke-21 hingga 1 tahun setelah terjadinya luka. Pembentukan granulation tissue terhenti karena apoptosis. Luka yang sudah dewasa memiliki ciri avaskular dan aselular. Selama maturasi luka, komponen matriks ekstrasel mengalami perubahan. Kolagen III yang diproduksi pada fase proliferasi digantikan dengan kolagen I yang lebih kuat. Setelah itu myofibroblast akan menyebabkan kontraksi daerah luka dan membantu dalam pengurangan ukuran luka. Proses angiogenesis juga akan terhenti, aliran darah ke luka akan menurun, dan aktivitas metabolisme akan menurun lalu berhenti. Folikel 15 rambut dan kelenjar keringat tidak memiliki kemampuan untuk tumbuh kembali setelah terjadinya luka serius .

G. GEL

Gel didefinisikan sebagai suatu sediaan semisolid yang mengandung agen pembentuk gel sehingga larutan berbentuk kaku atau berupa dispersi koloidal untuk aplikasi eksternal pada kulit. Pembawa gel sangat cocok untuk aplikasi pada

jaringan yang terkena luka bakar karena gel mengandung kadar air yang tinggi sehingga dapat mengurangi iritasi. Adapun beberapa sifat gel untuk penggunaan pada kulit sebaiknya memiliki sifat alir tiksotropik, mampu menyebar dengan baik, tidak berminyak, mudah dicuci, mengandung emolien, tidak berwarna, kompatibel dengan sejumlah eksipien, dan larut atau dapat bercampur dengan air. Salah satu bahan pembuat gel adalah hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), yang merupakan suatu senyawa turunan selulosa. HPMC sendiri larut dalam air dingin dan tidak rentan terhadap hidrolisis, serta stabil pada pH 3.

F.BIOPLACENTON

Bioplacenton merupakan salah satu bentuk obat topikal yang digunakan untuk mengobati luka bakar dalam bentuk gel yang diproduksi oleh Kalbe Farma. Gel Bioplacenton diindikasikan untuk mengobati luka bakar atau luka lain dengan infeksi. Kandungan aktif dalam gel bioplacenton yang digunakan sebagai regimen pengobatan luka bakar adalah ekstrak plasenta 10% dan neomisin sulfat 0,5%. Ekstrak plasenta dipercaya dapat membantu proses penyembuhan luka bakar dengan cara memicu pembentukan jaringan baru pada luka dan neomisin sulfat bekerja sebagai antibiotik untuk mencegah infeksi bakteri gram negatif pada area luka (MIMS, 2017).

BAB III

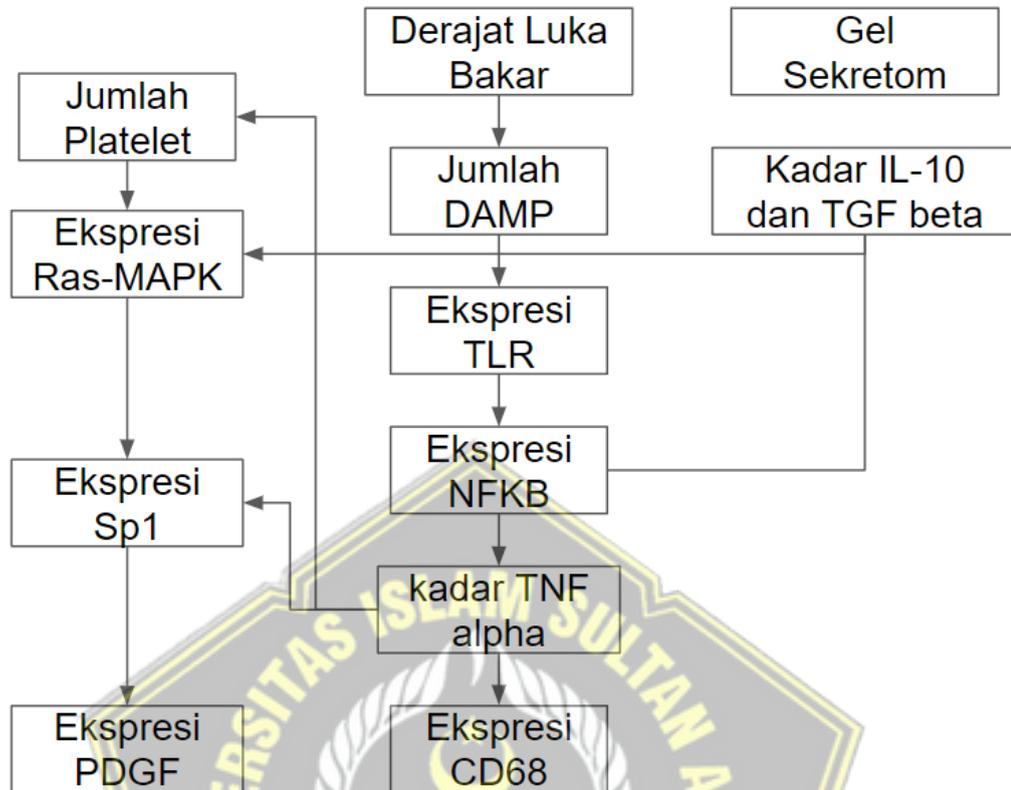
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Luka bakar derajat tiga kerusakan jaringannya meliputi epidermis dan dermis, bisa mencapai jaringan lemak subkutan, tendon, atau tulang. Biasanya disebabkan oleh karena api, zat kimia, listrik, ledakan.^(1,2) Dermis adalah lapisan jaringan ikat yang mengandung serat kolagen dan elastin, fibroblas, makrofag, dan adiposit, serta saraf, kelenjar, dan folikel rambut. Selain itu, lapisan dermis mengandung pembuluh darah dan sel limfatik. Akibat dari luka bakar derajat tiga menyebabkan fase inflamasi yang berkepanjangan dan angiogenesis yang tidak adekuat sehingga menghambat penyembuhan luka.^(1,2)

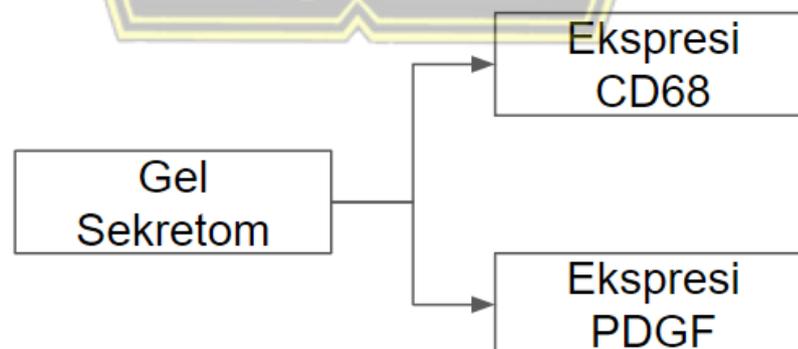
Namun, sekarang ini ditemukan teknologi baru menggunakan secretome stem cell digunakan untuk alternatif pengobatan di berbagai penyakit termasuk penyembuhan luka. Secretome mengandung *Growth factor* seperti PDGF. Pada fase penyembuhan luka, makrofag berperan sejak fase inflamasi, sekresi sitokin pro-inflamatori TGF- β lalu aktivasi PDGF membantu proliferasi sel pada fase penyembuhan luka menghasilkan fibroblast, selanjutnya meningkatkan ekspresi protein matriks ekstraseluler (ECM) merangsang pembentukan kolagen tipe 1 yang merupakan akhir dari proses penyembuhan luka fase maturasi.

3.2 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Teori.

3.3 2.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.4 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka di atas, hipotesis pada penelitian ini adalah :

H0: Tidak terdapat perbedaan peningkatan ekspresi Makrofag dan PDGF untuk penyembuhan luka bakar derajat III antara pemberian topikal sekretome dengan gel bioplacenton pada tikus putih jantan .

H1: Terdapat perbedaan peningkatan ekspresi Makrofag dan PDGF untuk penyembuhan luka bakar derajat III antara pemberian topikal sekretome dengan gel bioplacenton pada tikus putih jantan.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik untuk mengetahui perbedaan kecepatan penyembuhan luka bakar derajat III antara pemberian topikal Gel Sekretom dengan gel Bioplacenton pada tikus tikus jantan galur *Wistar*

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus-Oktober 2023. Perlakuan dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR) selama 5 hari dan pengamatan kecepatan penyembuhan luka bakar dilakukan laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang selama 28 hari.

4.3. Subjek Penelitian

4.3.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur

Wistar dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat dan tidak cacat.
3. Bobot badan 200-250 gram.

4.3.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat dan tidak cacat.
3. Bobot badan 200-250 gram.
4. Kriteria Drop Out
5. Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.4. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, dimana satu kelompok adalah *control groups* dan dua kelompok lainnya adalah *experimental groups*.

4.5. Besar Sampel

Pada penelitian ini besar sampel dihitung menggunakan rumus Federer untuk data homogen, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana t adalah banyaknya kelompok perlakuan dan n adalah jumlah sampel tiap kelompok.

Penelitian ini menggunakan 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari :

- (1) kelompok Bioplacenton (K1) luka bakar dengan gel Bioplacenton,
- (2) kelompok Kontrol Base Gel (K2) luka bakar dengan perlakuan pemberian base gel
- (3) kelompok Perlakuan 1 (K3) luka bakar yang diberi perlakuan Gel Sekretome dosis 10%, secara topikal 1x sehari

(4) kelompok Perlakuan 2 (K4) luka bakar yang diberi perlakuan Gel Sekretome dosis 20%, secara topikal 1x sehari sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah :

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

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan rumus tersebut, jumlah minimal sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok perlakuan pada penelitian ini adalah 6 ekor tikus sehingga jumlah sampel minimal yang dibutuhkan untuk 4 kelompok perlakuan adalah 24 ekor tikus. Kemudian untuk mengantisipasi adanya *drop out* saat penelitian dilakukan maka ditambahkan 10% ke dalam jumlah minimal sampel sehingga setiap kelompok perlakuan terdiri atas 7 ekor tikus. Pembagian sampel ke dalam tiga kelompok perlakuan dilakukan melalui mekanisme pemilihan secara acak.

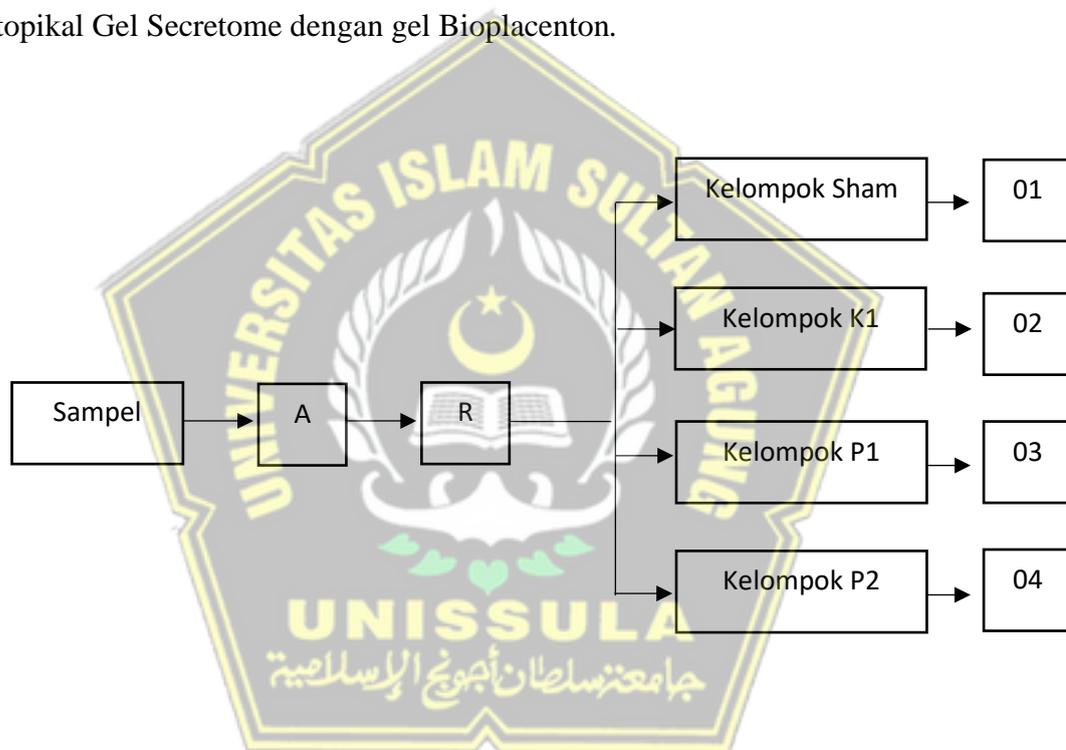
4.6. Teknik Sampling

Sampling adalah strategi yang digunakan untuk memilih elemen dari populasi untuk diteliti. Pada penelitian ini pengambilan sampel dari populasi dilakukan dengan teknik *probability sampling* dimana semua anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk dijadikan sampel. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling* dimana pengambilan sampel dilakukan

secara acak sederhana karena anggota populasi tikus putih jantan disediakan dengan cara yang sama dan memiliki karakteristik yang homogen.

4.7. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan coba tikus putih galur *Wistar* sebagai objek penelitian. Penelitian dilakukan dengan rancangan penelitian *randomize only control group*. Pada objek diamati perbedaan tanda klinis luka bakar derajat III antara pemberian topikal Gel Secretome dengan gel Bioplacenton.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

4.8. Identifikasi Variabel Penelitian

4.8.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sediaan topikal gel secretome

4.8.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi gen PDGF dan ekspresi makrofag (CD68)

4.9. Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas: Gel Sekretome	Gel Sekretome yang sudah jadi Pemakaian dengan cara dioleskan secara topikal 1 kali sehari sebanyak 20 persen	Hasil pengamatan dicatat dalam lembar observasi	Ordinal
Variabel Terikat: Ekspresi makrofag (CD68)	Adalah ekspresi gen protein membrane sel yang dimiliki oleh sel makrofag diukur dari jaringan kulit yang terpapar UVB	RT-PCR	Rasio
Variabel Terikat: Ekspresi PDGF	Adalah ekspresi gen protein PDGF yang disekresi oleh sel-sel kulit yang terpapar UVB pasca diberi sekretom	RT-PCR	Rasio
Variabel Prakondisi: Luka bakar derajat 3	Tikus yang telah diinduksi luka bakar dan tidak diberi perlakuan pengobatan sebagai kelompok kontrol negatif	Hasil pengamatan dicatat dalam lembar observasi	Nominal

4.10. Alat dan Bahan Penelitian

Tabel 4.2 Alat dan Bahan

Alat Penelitian :	Bahan Penelitian
Kandang hewan coba.	Pakan dan minum tikus.
Timbangan.	Larutan <i>polyvinylpyrrolidone iodine 1%</i> .
Pisau cukur.	Larutan anestesi <i>Lidokain 0,05%</i> .
Pisau scalpel sterile.	Gel Sekretome
Gelas beker.	Gel Bioplacenton.
Mikropipet dan tipnya.	
Inkubator.	
Kasa Steril.	
Sprit dan jarum.	
<i>Handschoen.</i>	

4.11. Cara Kerja

1. Aklimatisasi Hewan Uji

Aklimatisasi adalah suatu proses penyesuaian diri dengan iklim, lingkungan, kondisi, atau suasana baru. Sebelum diberi perlakuan pada tikus percobaan, dilakukan pengadaptasian pada semua tikus Scrcr selama satu minggu. Tikus diadaptasikan dengan tempat tinggal baru, lingkungan baru, serta makanan dan minuman yang sesuai dengan standar kebutuhannya.

2. Randomisasi Hewan Uji

Randomisasi hewan uji bertujuan untuk mengelompokkan hewan uji sesuai kelompok perlakuan. Selanjutnya pada bagian punggung dari masing-masing

hewan uji akan diberi nomor yang berbeda. Hal ini bertujuan untuk menghindari kesalahan pengukuran pada setiap hewan uji.

3. Pembuatan Luka Bakar

Sebelum pembuatan luka bakar pada tikus dilakukan, daerah yang akan dibuat perlukaan dibebaskan terlebih dahulu dari bulu menggunakan pisau cukur. Setelah itu, lakukan anestesi dengan menggunakan *Lidokain 0,5%* dengan dosis 7 mg/kgBB subkutan untuk mengurangi rasa sakit pada tikus dan menghindari gerakan tikus yang berlebihan. Setelah itu lakukan prosedur antiseptik dengan mengoleskan *polyvinylpyrrolidone iodine 1%* pada area yang akan dibuat perlukaan yaitu bagian proksimal punggung tikus. Luka bakar dibuat menggunakan batang logam aluminium dengan diameter 24 mm. Logam dipanaskan dalam air mendidih dengan suhu 100°C lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 15 detik.

4. Pemberian Treatment

Setelah luka bakar selesai dibuat pada bagian dorsar tikus, selanjutnya perawatan luka bakar disesuaikan dengan kelompok perlakuan yang sudah ditentukan. Luka bakar dengan bioplacenton (K1), luka bakar dengan base gel (K2), luka bakar dengan gel sekretom dosis 10% (K3), luka bakar dengan gel sekretom dosis 20% (K4) diberikan setiap hari selama 14 hari.

5. Koleksi Sampel dan Analisis PCR

Sampel kulit diambil pada hari ke-15 dan sampel dimasukkan ke dalam RNA later dan disimpan di -20 hingga proses analisis. Kemudian jaringan diambil 10 mg untuk proses ekstraksi RNA. Hasil RNA kemudian dibuat menjadi cDNA sintesis dan direplikasi menggunakan RT PCR. Hasil pembacaan

kemudian dibandingkan dengan hasil tikus sehat untuk menghitung Fold Change.

4.12. Analisis Statistik

Data yang didapatkan dari proses pengumpulan data akan diubah ke dalam bentuk tabel untuk kemudian diolah menggunakan program pengolahan data statistik. Proses pengolahan data menggunakan komputer ini terdiri dari beberapa langkah:

- *Editing*, pengecekan dan perbaikan isian formulir atau kuesioner.
- *Coding*, proses konversi data yang dikumpulkan selama penelitian ke dalam simbol yang sesuai untuk keperluan analisis.
- *Data entry*, memasukkan data ke dalam program komputer.
- *Cleaning*, pengecekan ulang data dari setiap sumber data atau responden untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, ketidaklengkapan, dan kemudian dilakukan koreksi.
- *Output computer*.

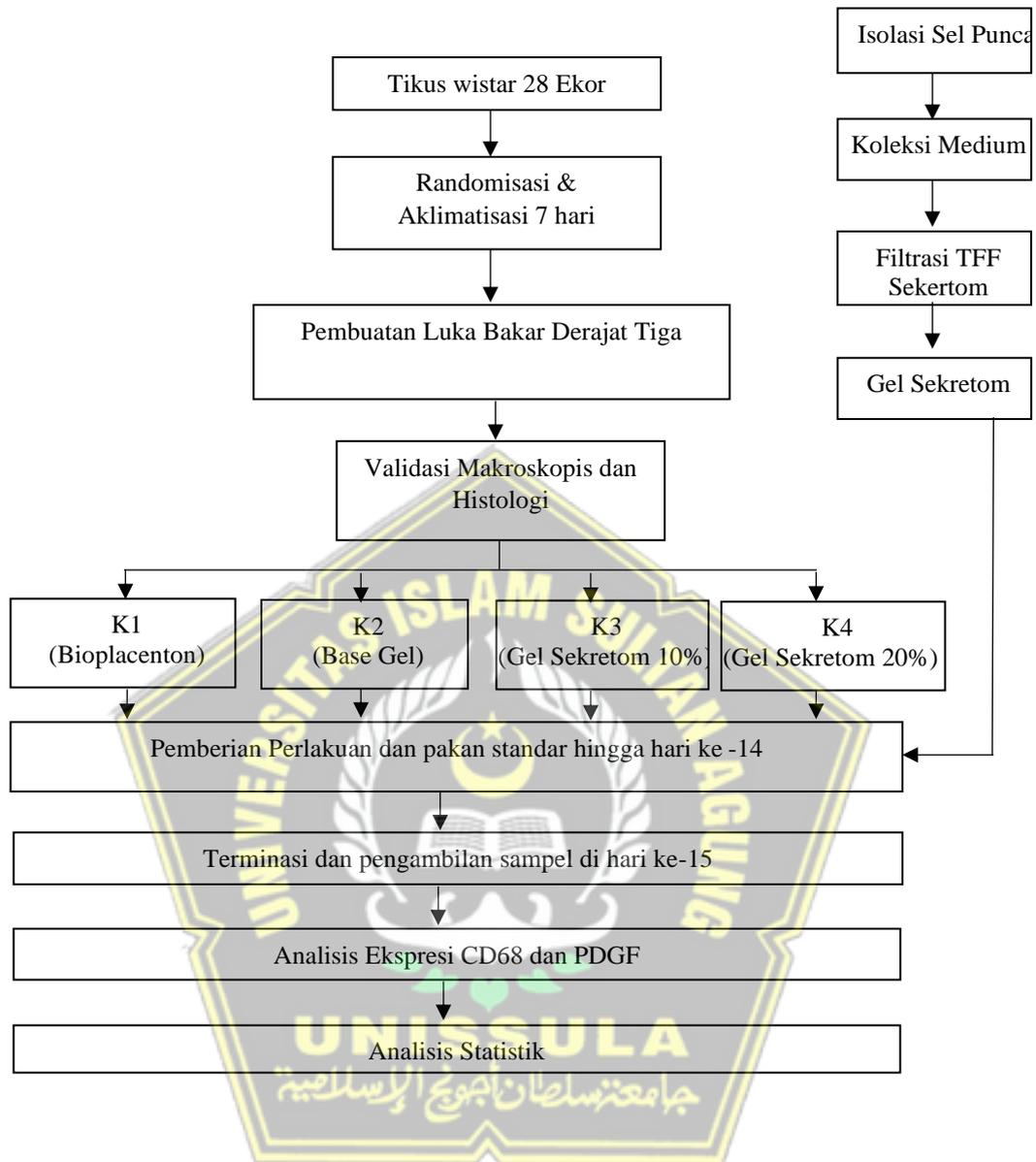
Pada penelitian ini akan dilakukan dua kali uji statistik yaitu analisis univariat untuk mengetahui karakteristik tiap variabel dan analisis bivariat untuk mengetahui hubungan antarvariabel penelitian.

Setelah data didapatkan dilakukan uji normalitas dan homogenitas data untuk melihat distribusi data penelitian. Dalam penelitian ini total sampel yang digunakan pada semua kelompok penelitian adalah 30 sampel, sehingga uji normalitas data yang digunakan adalah uji Saphiro Wilk dan uji homogenitas menggunakan Levene test.

Uji beda dilakukan dengan menggunakan uji Anova untuk mencari perbedaan rata-rata hasil pengukuran lebih dari dua kelompok kategori tidak berpasangan. Uji LSD digunakan untuk mengetahui hubungan antar perlakuan.



4.13. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB V

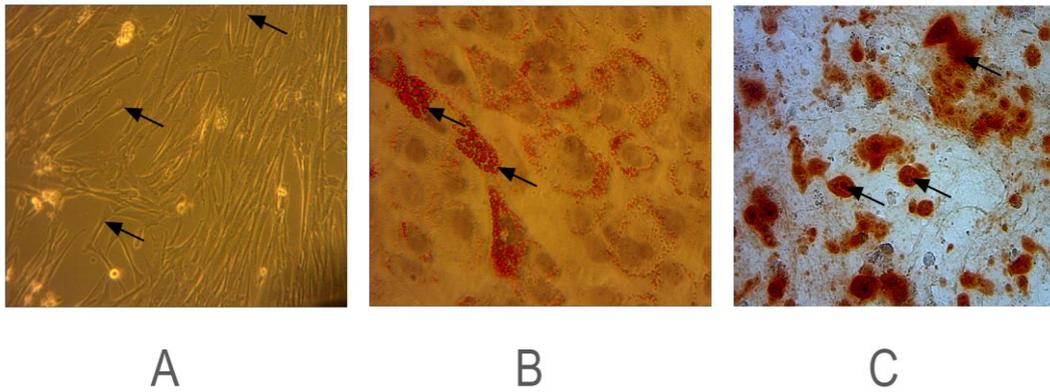
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi MSC

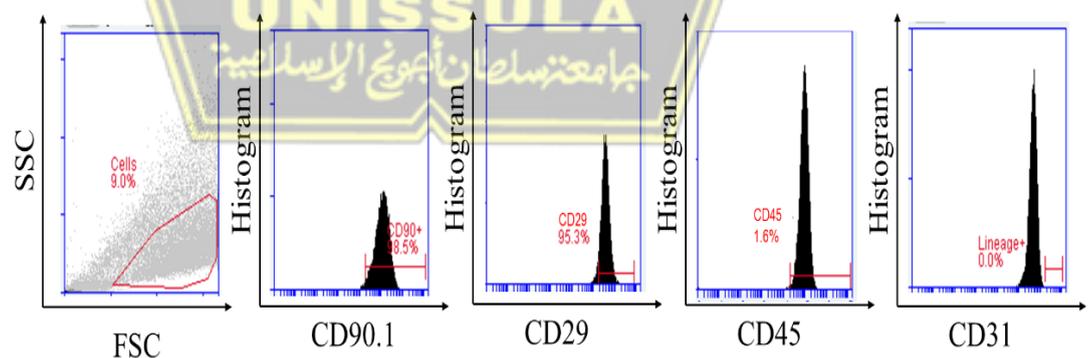
Isolasi MSC dari tali pusat tikus yang sedang bunting 21 hari dilakukan. Setelah diisolasi, hasilnya ditempatkan dalam kultur pada flask T75 yang steril, menggunakan medium khusus yang lengkap. MSCs yang melekat dan mencapai konfluensi lebih dari 80% menunjukkan morfologi sel berbentuk spindle-like saat diamati di bawah mikroskop (Gambar 5.1.A).

MSCs berkarakteristik dapat diferensiasi menjadi sel matur, termasuk osteosit dan adipogenik. Karakteristik ini dapat diamati setelah MSC diinkubasi dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik yang kemudian masing-masing diwarnai menggunakan Alizarin red untuk melihat deposisi kalsium dan Oil Red O untuk melihat droplet lipid yang terbentuk. Berdasarkan hasil pewarnaan, diketahui bahwa MSC mampu berdiferensiasi menjadi sel osteosit dan adipogenik (Gambar 5.1.B dan 5.1.C). Dengan hasil pengamatan ini, sel yang dihasilkan dari isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca, yaitu kemampuan untuk mengalami diferensiasi menjadi jenis sel lain serta memiliki potensi multipotensi.



Gambar 5.1. (A) Sel terisolasi berbentuk spindle-like pada perbesaran 100x. (B) Droplet Lipid terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x. (C) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red

Hasil isolasi sel yang diisolasi divalidasi menggunakan metode flowcytometry untuk menunjukkan marker penanda MSC. Hasil analisis menemukan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,5%), CD29 (95,3%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,6%) dan CD31 (0,0%) (Gambar 5.2)



Gambar 5.2. Analisis flow cytometry terhadap marker penanda MSC CD90, CD29, CD45, dan CD31

5.1.2. Isolasi Sekretom

Sel MSCs diinkubasi dalam kondisi hipoksia selama 24 jam pada suhu 37°C dan kadar oksigen 5%, kemudian medium kultur MSCs dikoleksi dan difiltrasi menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) hingga mendapatkan molekul dengan ukuran 10-50 kDa yang mengandung *interleukin-10* (IL-10) dan *transforming growth factor beta* (TGF-β). Hasil isolasi sekretom mendapatkan kadar IL-10 dan TGF beta masing-masing sebesar 467 ± 25.30 pg/mL dan 1865 ± 87 pg/mL.

5.1.3. Data Ekspresi CD68 dan PDGF

Penelitian eksperimental ini dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Semarang pada Desember 2023. Jaringan kulit tikus galur wistar bagian dorsal yang telah divalidasi mengalami luka bakar derajat tiga digunakan sebagai subjek penelitian ini. Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan yaitu K1 (tikus yang mendapatkan induksi luka bakar derajat tiga yang diberikan gel bioplacenton), K2 (tikus yang mendapatkan induksi luka bakar derajat tiga dengan diberikan base gel), P1 (tikus yang mendapatkan induksi luka bakar derajat tiga dan diterapi gel sekretom sekretom dosis 10%), kelompok P2 (tikus yang mendapatkan induksi luka bakar derajat tiga dan diterapi gel sekretom sekretom dosis 20%). Setelah 14 hari pemberian gel sekretom, tikus diterminasi dan jaringan kulit luka dipreservasi dalam RNA later untuk analisis RT-PCR. Jaringan kemudian diekstraksi RNA dan dilakukan analisis RT-PCR.

A. Ekspresi makrofag (CD68)

Hasil analisis ekspresi makrofag (CD68) ditampilkan pada tabel 5.1. Berdasarkan hasil analisis ditemukan bahwa ekspresi CD68 paling rendah berada pada perlakuan K4 ($0,80 \pm 0,12$) dan ekspresi paling tinggi berada pada perlakuan K2 ($1,76 \pm 0,288$), sedangkan perlakuan K1 ($1,09 \pm 0,299$) dan K3 ($1,12 \pm 0,23$) memiliki ekspresi diatas K4 namun di bawah K2. Normalitas data dianalisis menggunakan uji Shapiro wilk untuk mengevaluasi sebaran normalitas data dalam masing-masing kelompok ekspresi makrofag (CD68) dalam masing-masing kelompok. Hasil uji Shapiro wilk menunjukkan bahwa sebaran data ekspresi makrofag (CD68) dalam keempat kelompok tersebut normal ($P > 0,05$). Selain itu uji sebaran variasi homogenitas dianalisis menggunakan data Levene test dan menunjukkan nilai P lebih besar dari 0,05.

Tabel 5.1 Data Analisis Ekspresi CD68

VARIABEL	Kelompok				P
	K1	K3	K4	K5	
	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	
Makrofag (CD68)	$1,09 \pm 0,29$	$1,76 \pm 0,288$	$1,12 \pm 0,23$	$0,80 \pm 0,12$	
Shapiro wilk					$>0,05$
Lavene test					0,331
One Way Anova					$<0,00$

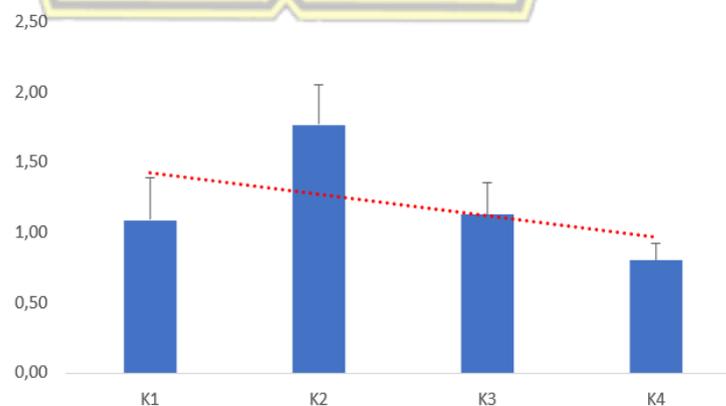
Berdasarkan data yang bersifat normal dan homogen, uji parametrik One Way Anova digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata ekspresi makrofag (CD68) di antara lima kelompok. Hasil uji tersebut menemukan bahwa data ekspresi CD68 berbeda secara signifikan ($P < 0,05$), hal ini

menunjukkan adanya perbedaan signifikan ekspresi makrofag (CD68) pada setidaknya satu kelompok. Hubungan data antar kelompok diuji menggunakan uji Post Hoc LSD, dan didapatkan data seperti yang ditampilkan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Perbedaan rerata ekspresi makrofag (CD68) antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD

	K1	K2	K3	K4
K1	-	0,000	0,799	0,047
K2	0,000	-	0,000	0,000
K3	0,799	0,000	-	0,034
K4	0,047	0,000	0,034	-

Hasil analisis menunjukkan bahwa K1 tidak berbeda dengan K3 ($P>0,05$), namun berbeda signifikan dibanding K4 ($P<0,05$) dan berbeda nyata dengan K2 ($P>0,05$). Selain itu K4 berbeda secara signifikan dibandingkan dengan seluruh perlakuan ($P<0,05$). Terdapat tren penurunan ekspresi makrofag (CD68) seiring dengan peningkatan kadar sekretom MSC seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 5.2



Gambar 5.3. Pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan penurunan ekspresi CD68 yang signifikan

B. Ekspresi PDGF

Hasil analisis ekspresi PDGF ditampilkan pada tabel 5.3. Kelompok K4 memiliki ekspresi PDGF tertinggi ($1,49 \pm 0,19$), diikuti oleh K1 ($1,2 \pm 0,79$) dan K3 ($1,08 \pm 0,24$) sedangkan kelompok dengan memiliki ekspresi PDGF terendah adalah K2 ($0,66 \pm 0,08$). Analisis sebaran data normal diketahui dari analisis statistika menggunakan uji Shapiro wilk dan diketahui ekspresi PDGF tersebar secara normal ($P > 0,05$). Uji sebaran data homogen menggunakan uji Levene test dilakukan untuk mengetahui persebaran data homogen dan hasil analisis menunjukkan nilai p sebesar 0,497 ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa varian data ekspresi PDGF bersifat homogen.

Tabel 5.3 Data Analisis Ekspresi PDGF

VARIABEL	Kelompok				P
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
PDGF	$1,2 \pm 0,79$	$0,68 \pm 0,89$	$1,12 \pm 0,23$	$1,19 \pm 0,42$	
Shapiro wilk					$> 0,05$
Lavene test					0,052
One Way Anova					0,031

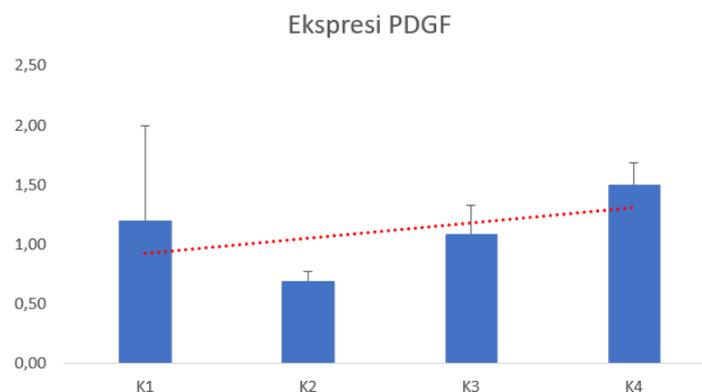
Hasil analisis sebaran data yang menunjukkan data bersifat normal dan homogen, maka dilakukan uji parametrik One Way Anova untuk mengetahui perbedaan rata-rata ekspresi PDGF di antara empat kelompok. Berdasarkan analisis menggunakan uji One Way Anova data ekspresi PDGF yang diperoleh berbeda nyata ($P < 0,05$), menunjukkan bahwa terdapat data

ekspresi PDGF yang berbeda nyata pada setidaknya satu kelompok. Hasil uji Post hoc LSD berikut menunjukkan perbedaan signifikan dalam ekspresi PDGF antar dua kelompok.

Tabel 5.4. Perbedaan rerata ekspresi PDGF antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD

	K1	K2	K3	K4
K1	-	0,042	0,644	0,249
K2	0,052	-	0,126	0,004
K3	0,644	0,126	-	0,113
K4	0,249	0,004	0,113	-

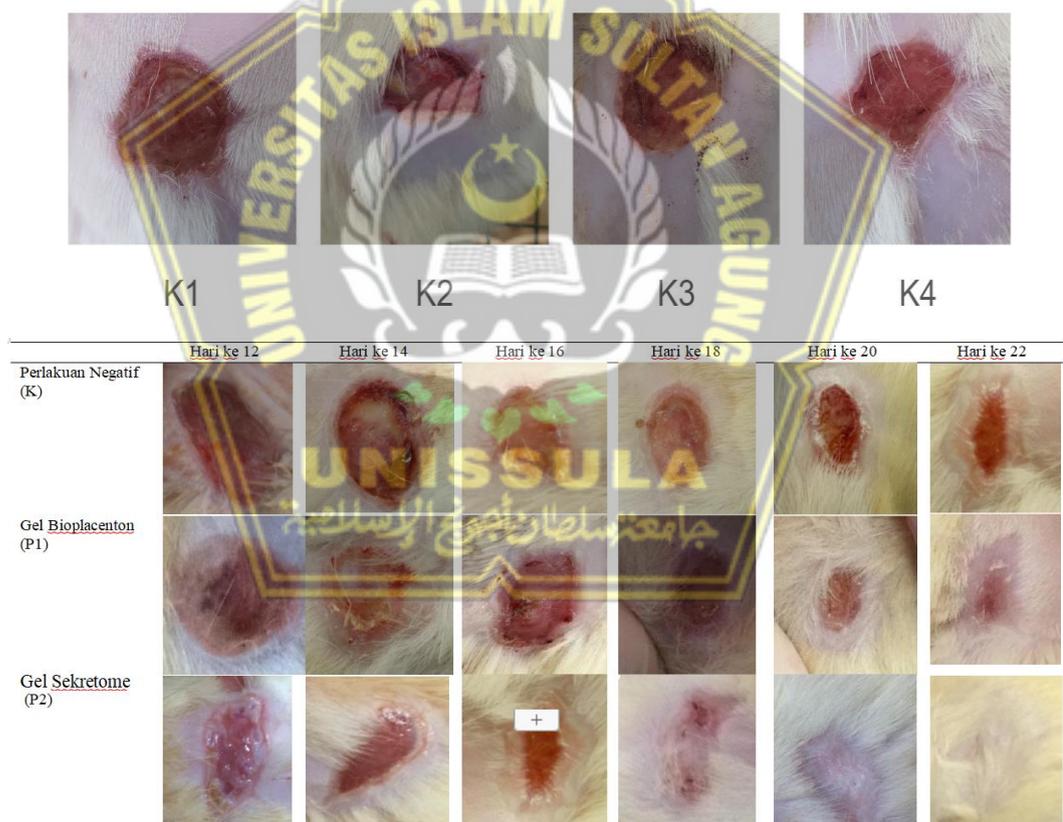
Hasil uji post hoc LSD terhadap ekspresi PDGF ditemukan bahwa perlakuan K1 berbeda nyata dibandingkan dengan K2, namun tidak berbeda nyata dibandingkan dengan K3 dan K4, sedangkan K3 tidak berbeda nyata dengan seluruh perlakuan dan Perlakuan K4 berbeda signifikan dibandingkan dengan K2, namun tidak berbeda signifikan apabila dibandingkan dengan perlakuan K1 dan K3. Berdasarkan gambar 5.2 dapat dilihat bahwa terdapat tren peningkatan ekspresi PDGF seiring dengan peningkatan dosis sekretom MSC.



Gambar 5.4. Pola penurunan yang ditunjukkan adalah dose dependent manner dimana dosis tertinggi menghasilkan penurunan ekspresi PDGF yang signifikan

C. Penutupan Luka

Pengamatan penutupan luka dilakukan secara makroskopis sebelum proses terminasi hewan coba. Didapatkan hasil seperti gambar 5.3. Berdasarkan pengamatan, didapatkan bahwa perkakuan K1, K3, dan K4 terjadi penutupan luka, sedangkan K2 luka masih terbuka. Pada gambar 5.5 tampak penutupan luka dengan kelompok pemberian gel sekrotem memberikan hasil yang lebih baik di banding kelompok lainnya.



Gambar 5.5. Hasil Pengamatan Makroskopis Luka

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terjadi penurunan ekspresi CD68 dan peningkatan ekspresi PDGF pada pemberian SH-MSD dengan variasi dosis 10% dan 20% pada tikus wistar jantan yang diinduksi luka bakar derajat 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa EH-MSD dosis 20% mampu menurunkan ekspresi CD68 dan meningkatkan ekspresi PDGF.

Luka bakar adalah cedera yang disebabkan oleh panas, bahan kimia, radiasi, atau gesekan yang mengakibatkan kerusakan pada jaringan kulit atau jaringan di bawahnya.¹ Penyembuhan luka bakar melibatkan serangkaian tahap fisiologis yang kompleks, termasuk peradangan, proliferasi, dan remodelling, yang bertujuan untuk memulihkan integritas kulit dan fungsi tubuh yang terganggu.² Tingkat kesembuhan luka bakar dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti tingkat keparahan dan proses fisiologis yang ada pada tubuh.^{1,2} Kondisi tubuh dengan inflamasi secara terus menerus yang ditandai dengan peningkatan makrofag dapat mengalami penundaan penyembuhan luka. Makrofag yang ditandai dengan CD68 berperan dalam proses fagositosis dan merangsang proses aktivasi sistem imun innate yang berujung pada proses inflamasi.³

Ketika luka bakar terjadi, makrofag merespons dengan menghasilkan dan merilis berbagai sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α .⁴⁻⁶ Sitokin-sitokin tersebut berperan dalam merangsang respon inflamasi dengan meningkatkan vasodilatasi, permeabilitas vaskular, produksi sitokin lain, aktivitas fagositosis, aktivasi endotel, dan ekspresi molekul adhesi, yang semuanya mendukung rekrutmen sel imun ke area luka.⁴⁻⁶ Hal ini menjadikan peran populasi makrofag menjadi sangat penting pada proses inflamasi, namun demikian populasi

makrofag akan mengalami penurunan seiring dengan berhentinya proses inflamasi. Penelitian terdahulu, melaporkan bahwa peningkatan populasi makrofag berkorelasi terhadap inflamasi yang berkepanjangan dan berujung pada proses penyembuhan luka yang lebih lama.^{4,7}

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi CD68 pada area sekitar jaringan luka bakar pada pemberian gel sekretom MSC dosis 20%. Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa sekretom MSC memiliki peran yang penting dalam menekan populasi sel makrofag pada luka bakar.⁸ Sejumlah faktor parakrin seperti IL-10 dan TGF-beta yang terkandung dalam sekretom dapat mengatur respons imun dengan menghambat aktivasi dan diferensiasi makrofag.^{9,10} Salah satu jalur yang dipengaruhi oleh sekretom MSC adalah jalur NF-kB yang merupakan jalur utama dalam sekresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β dapat ditekan.^{11,12} Selain itu, sekretom MSC juga dapat mempengaruhi jalur JAK-STAT dengan mengurangi aktivasi STAT1 dan STAT3, yang mengarah pada penekanan diferensiasi makrofag dan produksi sitokin pro-inflamasi.^{13,14} Penekanan ekspresi CD68 dapat berkorelasi dengan berhentinya fase inflamasi dan berpindah menjadi fase proliferasi.

Salah satu penanda proliferasi adalah terjadi peningkatan growth factor regenerasi, termasuk PDGF. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang menemukan adanya peningkatan ekspresi PDGF pada pemberian gel sekretom MSC dosis 20%. Salah satu kandungan protein yang berperan dalam meningkatkan ekspresi PDGF adalah hepatocyte growth factor (HGF), yang terkandung dalam sekretom MSC.¹⁵ Protein HGF telah terbukti meningkatkan produksi PDGF oleh

sel fibroblas, yang dapat mempercepat proliferasi sel-sel fibroblas dan pembentukan jaringan granulasi.¹⁶

Selain HGF, faktor pertumbuhan lain yang terkandung dalam sekretom MSC, seperti fibroblast growth factor-2 (FGF-2) dan VEGF, juga dapat berkontribusi pada peningkatan PDGF pada hari ke-14 penyembuhan luka bakar.¹⁷ Protein FGF-2 telah terbukti memperkuat sekresi PDGF yang berperan dalam proliferasi dan migrasi sel-sel fibroblas dalam pembentukan jaringan granulasi. Sementara itu, VEGF memiliki peran penting dalam angiogenesis, yang dapat meningkatkan pasokan darah ke area luka dan sehingga membantu metabolisme pembentukan PDGF.¹⁸

Protein-protein seperti HGF, FGF-2, dan vascular endothelial VEGF dalam sekretom MSC dapat mengaktifkan pathway dan transduksi sinyal yang mempromosikan transkripsi gen PDGF. Salah satu jalur transduksi sinyal yang terlibat adalah mitogen-activated protein kinase (MAPK), yang dapat diaktivasi HGF dan FGF-2.¹⁹⁻²² Aktivasi MAPK kemudian memicu kaskade reaksi yang melibatkan fosforilasi berbagai protein sinyal, termasuk faktor transkripsi aktivator protein 1 (AP-1), yang pada akhirnya mengarah pada peningkatan transkripsi gen PDGF.²³ Selain itu, faktor pertumbuhan seperti VEGF juga dapat mengaktifkan jalur phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, yang secara positif meregulasi transkripsi gen PDGF melalui berbagai mekanisme, termasuk stabilisasi faktor transkripsi yang terlibat dalam transkripsi ekspresi gen.²⁴

Selain pathway MAPK dan PI3K/Akt, beberapa faktor pertumbuhan dalam sekretom MSC juga dapat meregulasi jalur *janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) dalam meningkatkan transkripsi gen

PDGF.^{25,26} Melalui aktivasi reseptor seperti reseptor tyrosine kinase, HGF, FGF-2, dan VEGF dapat mengaktivasi jalur JAK-STAT yang melibatkan fosforilasi dan aktivasi protein *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT). Protein STAT yang teraktivasi kemudian akan bertranslokasi ke nukelus dan berperan sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen PDGF.

Penurunan ekspresi makrofag dan peningkatan ekspresi PDGF pasca pemberian gel sekretom MSC dosis 20% dapat menandakan proses inflamasi dalam penyembuhan luka sudah berhenti dan berpindah ke fase proliferasi. Hal ini dapat terlihat dari penutupan luka oleh jaringan baru yang dapat terlihat secara makroskopis.

Berbagai sinyal dapat berperan dalam regulasi ekspresi gen CD68 dan PDGF, namun demikian dalam penelitian ini tidak mengkaji jalur yang berperan dalam mekanisme tersebut. Hal ini menjadi keterbatasan dalam penelitian ini sehingga dapat menjadi dasar bagi penelitian lain untuk melakukan penelitian lanjutan.



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh gel sekretom MSC terhadap penurunan ekspresi CD68 dan PDGF pada tikus jantan galur Wistar dengan luka bakar derajat tiga, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian gel sekretome mempengaruhi ekspresi makrofag (CD68) pada tikus model luka bakar derajat tiga
2. Pemberian gel sekretom mempengaruhi ekspresi PDGF pada tikus model luka bakar derajat tiga
3. Terdapat perbedaan ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan

6.2 Saran

Studi yang akan datang diharapkan untuk mengkaji pathway yang berperan dalam penurunan ekspresi makrofag (CD68) dan PDGF serta eksplorasi dosis sekretom yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Darmaputra, IGN. 2022. Penanganan Awal Luka Bakar. Artikel edisi Selasa, 9 Agustus 2022. yankes.kemkes.go.id
2. Perdanakusuma, Ananda Rahmadanti. 2020. Profil Pasien Luka Bakar pada Anak di SMF Bedah Plastik RSUD DR. Soetomo Surabaya, Periode Januari-Desember 2018. Repository.unair.ac.id
3. Dinda, Rizki Andini. 2021. Studi Literatur : Asuhan Keperawatan pada Pasien Luka Bakar dengan Masalah Resiko Infeksi. Eprints.ump.ac.id
4. Belda, Angela jane. 2022. Efektivitas Gel Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica L.*) dan Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dapat Menurunkan Jumlah Sel Limfosit dan Sel Makrofag pada Luka Bakar Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Repository.wima.ac.id
5. Primadina, Nova; Basori, Achmad; Perdanakusuma, David S. 2019. Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekuler. *Qanun Medika*. Vol.3. No.1 . Hal : 31-43.
6. Swastini, Dewa Ayu; astuti, Ketut Widyani. 2012. Efek Hambatan Pembentukan Senyawa Oksigen Radikal oleh Vitaamin C terhadap Proses Penyembuhan Luka Bakar. simdos.unud.ac.id
7. Aisyah, Sitti. 2014. Efek Pemberian Ekstrak Daun Cincau Hijau terhadap Peningkatan Ekspresi VEGF pada Luka bakar derajat IIB Tikus Galur Wistar. Repository.ub.ac.id

8. Mingyao Wang; Xinxuan Xu; Xiongxin Lei; Jie Tan and Huiqi Xie. Review : *Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Burn Wound Healing*. *Burn&Trauma*, 2021, 9, tkab002. Doi: 10.1093/burnst/tkab002. P: 1-16.
9. Sholahuddin, Rhatomy;dkk. Penggunaan Secretome sebagai Terapi Adjuvant dalam Penyembuhan Robekan Ligamen dan Tendon. news.unair.ac.id. 30 November 2020.
10. Alinda, Medhi Denisa. 2021. Penggunaan Mesenchymal Stem-Cell conditioned Medium pada Penyembuhan Luka. 13 Desember 2021. news.unair.ac.id.
11. Christie, Cindy D;Dewi, Riamla; Pardede, Sudung O; Wardhana, Aditya. 2018. Luka Bakar pada Anak Karakteristik dan penyebab Kematian. *Majalah Kedokteran UKI* 2018. Vol XXXIV No.3. Juli-September. Hal 131-143.
12. Isprawiro. Terapi Stem Cell dan Keberadaannya di Indonesia. Medikanews.com. 27 Desember 2022
13. Brodjonegoro, Bambang PS. Menristek : Stem Cell, Alternatif Terapi untuk Pasien Covid Berat. Kompas.com. 5 Februari 2021.
14. Manunsong, Cosmos. Terapi Masa Depan Mesenchymal Stem Cell untuk Berbagai Penyakit Perlu Dikembangkan di Indonesia. *Majalah Farmasetika*. farmasetika.com. 20 September 2020
15. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, et al. 2016. *Exosomes Derived from Human Adipose Mensenchymal Stem Cells Accelerates Cutaneous Wound Healing via Optimizing The Characteristics of Fibroblasts*. *Sci Rep*. 2016;6:32993. doi: 10.1038/srep32993.

16. R Sjamsuhidajat, W Karnadihardja, TOH Prasetyo. Buku Ajar Ilmu Bedah - EGC. Jakarta, 2010.
17. Kementrian kesehatan RI. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tatalaksana Luka Bakar. 2019.
18. Santoso ZA. Peran terapi mesenchymal stem cell (MSC) dalam penatalaksanaan luka bakar: sebuah tinjauan sistematis. Intisari Sains Medis. 2021 Dec 28;12(3):927-33.
19. Żwieręto, W.; Piorun, K.; Skórka-Majewicz, M.; Maruszewska, A.; Antoniewski, J.; Gutowska, I. Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 3749. <https://doi.org/10.3390/ijms24043749>.
20. Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, K MS. Scan By Dr.Suvianto H.L 15-05-2009. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. 2009;1825–9.
21. Abbas A.K. Litchman. A.H. Pillai. S. 2016. Imunologi dasar Abbas. ELSEVIER
22. Germano G, Frapolli R, Belgiovine, dkk. Peran Penargetan Makrofag dalam Aktivitas Antitumor Trabectedin [J]. Sel kanker, 2013, 23(2): 249-262.
23. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, dkk . Penanda Novel untuk Menggambarkan Murine M1 dan M2 Makrofag [J]. PLOS SATU, 2015, 10(12): e0145342-.
24. Grohmann U, Belladonna ML, Vacca C, dkk . Peran Regulasi Positif IL-12 dalam Makrofag dan Modulasi oleh IFN- γ [J]. Jurnal Imunologi, 2001, 167(1): 221-227.

25. Dragomir ACD, Sun R, Choi H, *dkk* . Peran Galectin-3 dalam Aktivasi Makrofag Klasik dan Alternatif di Hati setelah Intoksikasi Acetaminophen [J]. *Jurnal Imunologi*, 2012, 189(12): 5934-5941.
26. Ibrahim, Ihdina Hanifa Hasanal. 2018. Pengaruh Pemberian TNF- α Dosis Rendah terhadap Kadar PDGF dalam Mesenchymal Stem Cell (Studi Eksperimental In Vitro Pemberian TNF- α dengan Dosis 10 η g/ml, 5 η g/ml dan 2,5 η g/ml terhadap Mesenchymalk Stem Cell. <http://repository.unissula.ac.id/id/eprint/11020>
1. Tiwari VK. Burn wound: How it differs from other wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012.
2. Kim H, Shin S, Han D. Review of History of Basic Principles of Burn Wound Management. *Medicina (Lithuania)*. 2022.
3. Van De Groot F, Krijnen PAJ, Begieneman MPV, Ulrich MMW, Middelkoop E, Niessen HWM. Acute inflammation is persistent locally in burn wounds: A pivotal role for complement and C-reactive protein. *J Burn Care Res*. 2009;
4. Burgess M, Valdera F, Varon D, Kankuri E, Nuutila K. The Immune and Regenerative Response to Burn Injury. *Cells*. 2022.
5. Sierawska O, Małkowska P, Taskin C, Hrynkiewicz R, Mertowska P, Grywalska E, et al. Innate Immune System Response to Burn Damage—Focus on Cytokine Alteration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022.
6. Mulder PPG, Koenen HJPM, Vlig M, Joosten I, de Vries RBM, Boekema BKHL. Burn-Induced Local and Systemic Immune Response: Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies. *J Invest Dermatol*. 2022;

7. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006.
8. Dinç E, Dursun Ö, Yılmaz G, Kurt AH, Ayaz L, Vatansever M, et al. Evaluation of Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Effects of Bone Marrow and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Alkaline Corneal Burn. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2021;
9. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 Triggers Changes in Macrophage Phenotype That Promote Muscle Growth and Regeneration. *J Immunol*. 2012;
10. Gao X, Lu C, Miao Y, Ren J, Cai X. Role of macrophage polarisation in skin wound healing. *Int Wound J*. 2023;
11. Ahmadi A, Niknahad H, Li H, Mobasheri A, Manthari RK, Azarpira N, et al. The inhibition of NFκB signaling and inflammatory response as a strategy for blunting bile acid-induced hepatic and renal toxicity. *Toxicol Lett*. 2021;
12. Santos ACA, Correia CA, de Oliveira DC, Nogueira-Pedro A, Borelli P, Fock RA. Intravenous Glutamine Administration Modulates TNF-α/IL-10 Ratio and Attenuates NFκB Phosphorylation in a Protein Malnutrition Model. *Inflammation*. 2016;
13. Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. *J Immunol*. 2000;
14. Sharma S, Yang B, Xi X, Grotta JC, Aronowski J, Savitz SI. IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res*. 2011;
15. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim IS, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and

- provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016;
16. Panganiban RAM, Day RM. Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011.
 17. McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron*. 1990;
 18. Certelli A, Valente P, Uccelli A, Grosso A, Di Maggio N, D'Amico R, et al. Robust Angiogenesis and Arteriogenesis in the Skin of Diabetic Mice by Transient Delivery of Engineered VEGF and PDGF-BB Proteins in Fibrin Hydrogels. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;
 19. Stuhlmiller TJ, García-Castro MI. FGF/MAPK signaling is required in the gastrula epiblast for avian neural crest induction. *Development*. 2012;
 20. Gantner CW, Hunt CPJ, Niclis JC, Penna V, McDougall SJ, Thompson LH, et al. FGF-MAPK signaling regulates human deep-layer corticogenesis. *Stem Cell Reports*. 2021;
 21. Schröter C, Rué P, Mackenzie JP, Arias AM. FGF/MAPK signaling sets the switching threshold of a bistable circuit controlling cell fate decisions in embryonic stem cells. *Dev*. 2015;
 22. McBain VA, Forrester J V., McCaig CD. HGF, MAPK, and a small physiological electric field interact during corneal epithelial cell migration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;
 23. Yan T, Huang L, Yan Y, Zhong Y, Xie H, Wang X. MAPK/AP-1 Signaling Pathway Is Involved in the Protection Mechanism of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes against Ultraviolet-Induced Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol*. 2023;

24. Halevy O, Cantley LC. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. *Exp Cell Res.* 2004;
25. Simon AR, Takahashi S, Severgnini M, Fanburg BL, Cochran BH. Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2002;
26. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2005;

