

**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI MAKROFAG  
M2 (CD163)**

**(Studi In Vivo Pada Tikus Model Luka Diabetik)**

**Skripsi**

Untuk memenuhi persyaratan  
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Diajukan Oleh:

**ARIQ FALAH**

**30102100028**

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2025

**SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL*  
*STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI MAKROFAG M2 (CD163)  
Studi In Vivo Pada Tikus Model Luka Diabetik**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

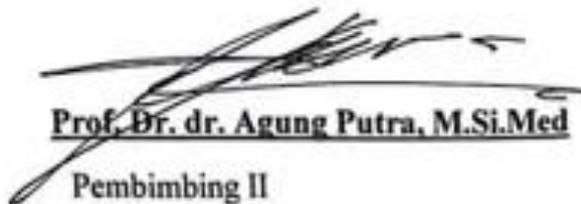
**Ariq Falah**

**30102100028**

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji pada tanggal 18 Februari 2025 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Susunan Tim Penguji**

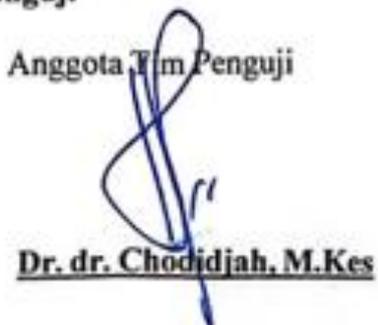
Pembimbing I

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

Pembimbing II

  
**Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B.FINACS**

Anggota Tim Penguji

  
**Dr. dr. Chodidjah, M.Kes**

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

Semarang, 18 Februari 2025

Fakultas Kedokteran  
Universitas Islam Sultan Agung  
Dekan,



**Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., SH.**

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ariq Falah

Nim : 30102100028

Dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI MAKROFAG  
M2 (CD163)**

**Studi In Vivo Pada Tikus Model Luka Diabetik”**

Adalah benar hasil karya saya penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar skripsi orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 15 Februari 2025

Yang menyatakan,



**Ariq Falah**

## PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim, Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh. Pertama-tama dan yang terutama penulis ingin mengucapkan Alhamdulillahirrabbi lalamin puji syukur atas kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan nikmat dan karunianya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan penelitian yang berjudul “Pengaruh Pemberian *Gel Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* Terhadap Ekspresi Makrofag M2 (CD163) (Studi In Vivo Pada Tikus Model Luka Diabetik)” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh kelulusan sarjana kedokteran program studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Dalam proses penyusunan dan penulisan skripsi ini, penulis telah menerima banyak saran dan masukan, motivasi, dan bantuan baik moril dan materil dari berbagai pihak. Mulai dari pemilihan judul skripsi hingga selesai penulisan hasil skripsi. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati dan penghargaan yang tulus, penulis menyampaikan rasa syukur dan terimakasih yang tidak terhingga kepada :

1. Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa. Karena berkat rahmat dan karunia-Nya, penyusunan dan penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Yang terhormat Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.
3. Yang terhormat Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si Med selaku Pembimbing I yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan arahan, koreksi dan panduan kepada penulis.
4. Yang terhormat Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Pembimbing II yang juga telah meluangkan waktunya dalam memberikan saran-saran perbaikan kepada penulis.
5. Yang terhormat Dr.dr.Chodidjah, M.Kes. selaku Penguji I yang telah memberikan saran, masukan, dan petunjuk dalam penyempurnaan

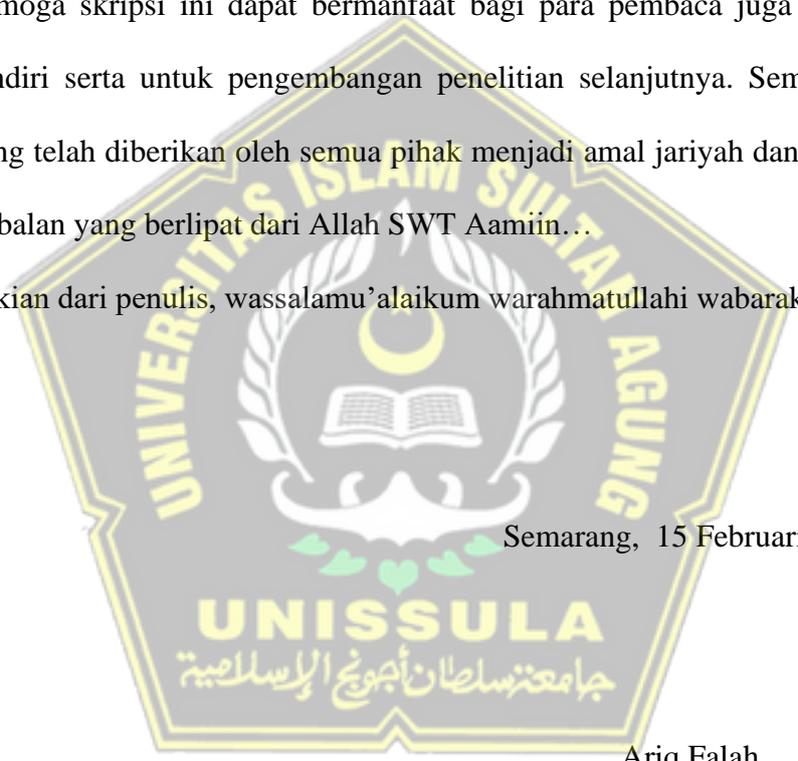
penelitian ini.

6. Yang terhormat Dr.dr. Hadi Sarosa, M.Kes. selaku Penguji II yang telah memberikan saran, masukan, dan petunjuk dalam penyempurnaan penelitian ini.
7. Segenap Dosen Fakultas Kedokteran Unissula Semarang yang telah mengajarkan ilmunya kepada penulis.
8. Segenap Dosen Fakultas Kedokteran Unissula Semarang yang telah mengajarkan ilmunya kepada penulis.
9. Para staf laboratorium SCCR atas bantuan, saran, masukan dan dukungannya kepada penulis saat melakukan eksperimen.
10. Yang penulis hormati dan sayangi, Ayahanda Eko Hidayanto dan Ibunda Rita Agustina atas doa, dukungan, dan kasih sayang yang tiada henti serta motivasi dan nasihat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini.
11. Yang penulis sayangi, Kakak Hana Shafiya Eka Putri yang telah memberikan semangat, doa, dan dukungan selama proses dan penulisan penelitian ini.
12. Yang penulis hormati dan Selaku sahabat Respati Mulihmulyo yang berjasa dan berkontribusi kepada penulis selama berkuliah di Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.
13. Terima kasih kepada orang terdekat penulis Ranti Pebriyani Tiara Hayat yang telah memberikan semangat, doa dan dukungannya selama proses penulisan penelitian ini
14. Sahabat - sahabat penulis dan warga kos agusta yang telah menemani dan memberikan dukungan kepada penulis selama proses penelitian ; Naufal Faiz Arganta, Wisnu Aditya Nugroho, Rafif Aufada, Rizky Ginandi, Farhan arifendy, Mukholid Wildan, Duta Trio Adiputra, Brenico Danendra

15. Semua pihak yang penulis tidak dapat sebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuannya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Penulis tidak memungkiri bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, sehingga syarat dan kritik dengan senang hati akan penulis terima. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca juga bagi penulis sendiri serta untuk pengembangan penelitian selanjutnya. Semoga bantuan yang telah diberikan oleh semua pihak menjadi amal jariyah dan memperoleh imbalan yang berlipat dari Allah SWT Aamiin...

Sekian dari penulis, wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.



Semarang, 15 Februari 2025

Ariq Falah

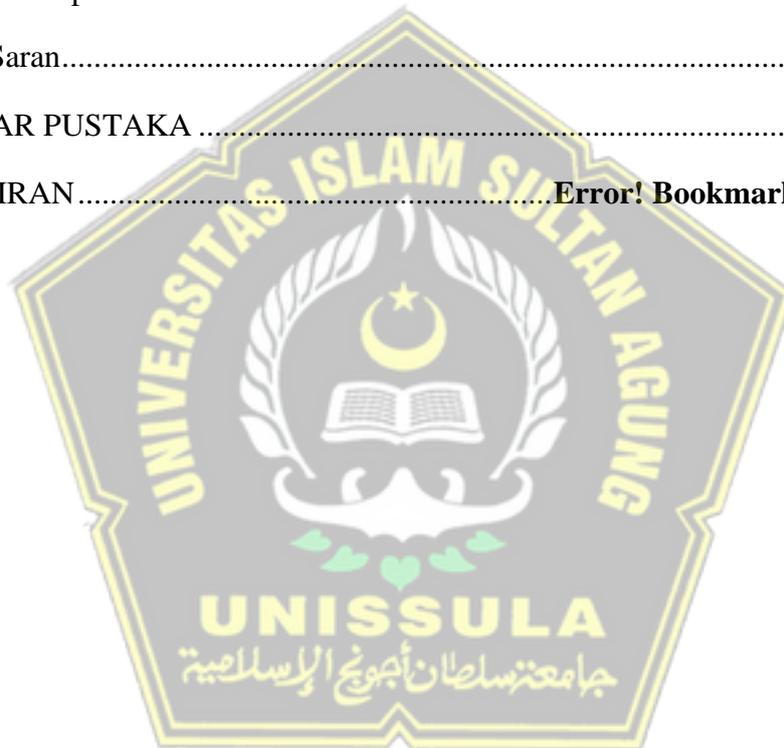
## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
HALAMAN PENGESAHAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
SURAT PERNYATAAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
PRAKATA.....	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Diabetes Melitus (DM).....	5
2.1.1 Definisi.....	5
2.1.2 Klasifikasi dan Etiologi.....	5
2.1.3 Manifestasi Klinis.....	9

2.1.4	Diagnosis.....	10
2.1.5	Komplikasi.....	11
2.2	Luka Diabetik.....	13
2.2.1	Definisi.....	13
2.2.2	Patofisiologi.....	13
2.2.3	Diagnosis.....	17
2.2.4	Tatalaksana.....	18
2.3	Makrofag.....	20
2.3.1	Definisi.....	20
2.3.2	Klasifikasi.....	21
2.3.3	Polarisasi Makrofag M2.....	22
2.3.4	Makrofag M2 Pada Luka Diabetik.....	23
2.4	Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs).....	23
2.4.1	<i>Stem Cells</i> .....	23
2.4.2	Hypoxic Mesenchymal Stem Cells (H-MSCs).....	25
2.4.3	Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs).....	26
2.5	Pengaruh Gel Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH- MSCs) Terhadap Ekspresi Makrofag Tipe-2 pada Tikus Model Luka Diabetik.....	27
2.6	Kerangka Teori.....	29
2.7	Kerangka Konsep.....	30
2.8	Hipotesis.....	30
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>		<b>31</b>
3.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	31
3.2	Variable dan Definisi Operasional.....	32
3.2.1	Variable.....	32

3.2.2 Definisi Operasional .....	32
3.3 Subjek Peneliatan dan Sampel Penelitian .....	33
3.3.1 Subjek Penelitian .....	33
3.3.2 Sampel Penelitian .....	33
3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel .....	33
3.3.4 Besar Sampel .....	33
3.4 Alat dan Bahan Penelitian .....	34
3.4.1 Alat .....	34
3.4.2 Bahan .....	34
3.5 Cara Penelitian .....	35
3.5.1 Prosedur Isolasi Mesenymal Stem Cell dari Umbilical Cord .....	35
3.5.2 Proses Hipoksia .....	35
3.5.3 Pembuatan Sediaan Gel .....	36
3.5.4 Pembuatan Tikus Model Luka Diabetikum .....	36
3.5.5 Perlakuan Pada Hewan Coba .....	37
3.5.6 Pengambilan Sampel Jaringan .....	37
3.5.7 Ekstrasi RNA dan Sintesis Cdna .....	37
3.5.8 Pembacaan Ekspresi CD163 dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (qRT-PCR) .....	38
3.6 Alur Penelitian .....	40
3.7 Tempat dan Waktu Penelitian .....	41
3.7.1 Tempat Penelitian .....	41
3.7.2 Waktu Penelitian .....	41
3.8 Analisa Hasil .....	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	42

4.1 Hasil Penelitian .....	42
4.1.1 Isolasi Secretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs) .....	42
4.1.2 Hasil Validasi Diabetes .....	44
4.1.3 Hasil Analisis CD 163 .....	45
4.2 Pembahasan.....	46
BAB V.....	51
5.1 Kesimpulan .....	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA .....	52
LAMPIRAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Hematopoetic <i>Stem Cell</i> .....	21
Gambar 2. 2 pembelahan pada stem cell.....	24
Gambar 2. 3 Klasifikasi stem cell berdasarkan potensi .....	25
Gambar 2. 4 Ilustrasi Secretome dan aktivitasnya .....	27
Gambar 4. 1 Isolasi MSCs (sel yang berbentuk spindle-like).....	42
Gambar 4. 2 Analisis Flowcytometry, validasi MSCs.....	42
Gambar 4. 3 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit .....	42



## DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Definisi Operasional .....	32
Tabel 4. 1 Hasil Validasi Gula Darah .....	44
Tabel 4. 2 Hasil Ekspresi CD 163 .....	45
Tabel 4. 3 Uji Post Hoc Lsd .....	46

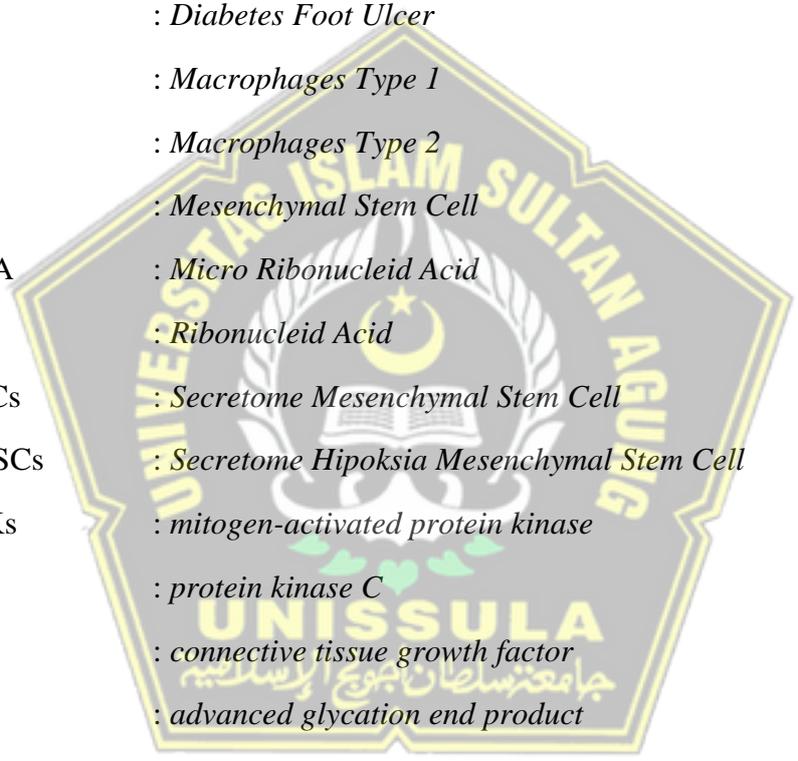


## DAFTAR BAGAN

Bagan 2. 1 Kerangka Teori .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Bagan 2. 2 Kerangka Konsep.....	30
Bagan 3. 1 Rancangan Penelitian.....	31
Bagan 3. 2 Alur Penelitian .....	40



## DAFTAR SINGKATAN



ABI	: <i>Ankle Brachial Index</i>
ADA	: <i>American Diabetes Association</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
IDF	: <i>International Diabetes Association</i>
DFU	: <i>Diabetes Foot Ulcer</i>
M1	: <i>Macrophages Type 1</i>
M2	: <i>Macrophages Type 2</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
miRNA	: <i>Micro Ribonucleid Acid</i>
RNA	: <i>Ribonucleid Acid</i>
S-MSCs	: <i>Secretome Mesenchymal Stem Cell</i>
SH-MSCs	: <i>Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cell</i>
MAPKs	: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
PKC	: <i>protein kinase C</i>
CTGF	: <i>connective tissue growth factor</i>
AGE	: <i>advanced glycation end product</i>
TGF- $\beta$ 1	: <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i>
NKT	: <i>Secretome Hipoksia Mesenchymal Stem Cell</i>
NPWT	: <i>Negative Pressure Wound Therapy</i>
PAD	: <i>Peripheral Artery Disease</i>
PAI	: <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>

qRT-PCR	: <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TREG	: <i>Regulatory T cells</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMT1	: <i>Diabetes Melitus Tipe 1</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNCB	: <i>Dinitrochlorobenzene</i>
ESCs	: <i>Embryonic Stem Cells</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
GABA	: <i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>
JAK	: <i>Janus kinase</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>



## INTISARI

**Latar belakang:** Luka diabetik merupakan salah satu komplikasi tersering pada pasien diabetes mellitus. Proses penyembuhan luka pada pasien diabetes terganggu karena tidak dapat beralihnya fase inflamasi ke proliferasi. Makrofag M2 adalah sel imun yang berperan dalam proses anti-inflamasi, dan dapat memodulasi sitokin inflamasi. Terapi berbasis sel punca semakin diperkenalkan ke dalam pendekatan terapeutik karena dapat memperbaiki jaringan, mempromosikan angiogenesis dan *remodelling*.

**Metode:** Studi eksperimental menggunakan *posttest only control group design*. Tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 25 ekor diberi luka s dan dibagi 5 kelompok secara acak. SH: kelompok tikus sehat diberi luka, K-: kontrol negatif diberi *Base gel*, K+: kontrol positif diberi gentamycin 200mg, P1: perlakuan 1 tikus model luka diabetik dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 200  $\mu$ L dalam 200 mg gel P2: perlakuan 2 tikus model luka diabetik dengan pemberian gel SH-MSCs dosis 400  $\mu$ L dalam 200mg gel

**Hasil:** Penelitian ini menunjukkan peningkatan ekspresi CD163 yang signifikan  $p=0,002$ ; *Uji post hoc LSD* didapatkan nilai  $P<0,05$  pada kelompok P2 dibandingkan dengan K+, sedangkan didapatkan nilai  $P>0,05$  antara kelompok P1 dibandingkan K+ dan P1 dibandingkan P2

**Kesimpulan:** Gel SH-MSCs pada kedua dosis berpengaruh secara signifikan terhadap kadar M2 pada tikus model luka diabetik.

**Kata kunci:** Makrofag M2, luka diabetik, gel, SH-MSCs

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah salah satu penyakit metabolik paling umum yang dicirikan dengan gula darah yang tinggi hasil dari penurunan produksi insulin atau aktivitas dari insulin. Orang yang menderita diabetes memiliki resiko mengembangkan macam-macam penyakit serius yang dapat membahayakan nyawa sehingga dapat mengakibatkan meningkatnya biaya perawatan, penurunan kualitas hidup dan meningkatnya angka kematian (Holt and Flyvbjerg, 2023)

Menurut Atlas International Diabetes Federation (IDF) edisi ke-10, setidaknya 1 dari 10 orang di seluruh dunia, atau 537 juta orang saat ini hidup dengan diabetes. jumlah ini diperkirakan akan menjadi 643 juta pada tahun 2030 dan 783 juta pada tahun 2045. Selain itu, pada tahun 2021 dilaporkan terdapat total 4.5 juta orang di dunia meninggal yang disebabkan diabetes. Pada tahun 2021 indonesia menempati urutan ke-5 dunia dengan jumlah diabetes terbanyak setelah China, India, Pakistan, dan Amerika Serikat. (*IDF Diabetes Atlas IDF Diabetes Atlas*, 2021).

Penderita DM rentan mengalami berbagai jenis komplikasi. Diabetic foot ulcer (DFU) adalah salah satu komplikasi paling umum pada pasien DM yang tidak terkontrol (Oliver and Mutluoglu, 2019).

Pasien diabetes dapat mengalami luka yang ditandai dengan gangguan penyembuhan, inflamasi yang berkepanjangan, dan penurunan kemampuan epitelisasi. Pada 15% penderita T2DM timbul luka diabetik yang biasanya terlokalisasi di ekstremitas bawah. Luka diabetes paling parah dapat menyebabkan amputasi ekstremitas bawah, bahkan kematian. Faktanya 84 persen amputasi yang terjadi pada ekstremitas bawah disebabkan oleh luka diabetik (Bar-Meir, Mendes and Winkler, 2006).

Luka diabetik memiliki ciri utama luka kronis yang tidak dapat sembuh. Dalam keadaan normal, proses penyembuhan luka terdiri dari 4 fase yang berlangsung dan tumpang tindih, termasuk hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Namun pada hiperglikemia kronis proses

penyembuhan dapat terhambat, bahkan dapat tidak terjadi. Pada luka diabetes kronis makrofag memiliki peran penting dalam fase inflamasi, gagal berubahnya fenotip dari makrofag M1 pro inflamasi ke fenotip makrofag M2 Anti inflamasi sehingga hasilnya inflamasi di lokasi luka masih belum terselesaikan, yang kemudian menghalangi kemajuan ke fase penyembuhan selanjutnya. (Arumugam, Looi and Kuppusamy, 2021)

Dalam beberapa dekade terakhir, aplikasi *mesenchymal stem cell* (MSCs) semakin menarik perhatian, MSC mudah ditraksi dari sumsum tulang, lemak, sinovium, dan tali pusat dapat berdiferensiasi menjadi berbagai garis keturunan sel sesuai dengan perlakuan biomedik yang spesifik. Karena MSC tidak menunjukkan kompleks histokompatibilitas dan molekul perangsang imun yang signifikan, MSC tidak terdeteksi oleh sistem imun dan tidak menyebabkan penolakan setelah transplantasi. Sifat-sifat ini menjadikannya kandidat biomedis yang kompeten, khususnya dalam rekayasa jaringan. (Murphy *et al.*, 2012).

Sel-sel MSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai sel seperti sel neuron, adiposit, sel otot, dan osteoblas, sehingga sangat penting dalam terapi sel serta perbaikan jaringan. (Wang *et al.*, 2021).

Eksosom yang diturunkan dari MSC telah terbukti meningkatkan penyembuhan luka. Eksosom adalah vesikel ekstraseluler yang berasal dari berbagai endosome sel, termasuk SC. Mereka mengerahkan efek penyembuhannya dengan berperan di hampir setiap tahap proses penyembuhan luka. MSC bermigrasi ke area cedera dan menjadi komponen alami di area cedera. Mereka mengeluarkan sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang mendorong regenerasi jaringan. Transplantasi MSC menginduksi polarisasi makrofag M2 dan meningkatkan proses penyembuhan luka. Kapasitas imunomodulasi eksosom seharusnya sama dengan MSC, karena MSC mengatur sel kekebalan melalui sintesis sitokin, sedangkan eksosom memainkan perannya melalui mikro asam ribonukleat (miRNA). Eksosom yang berasal dari SC dapat berperan pada proses penyembuhan luka dengan memicu diferensiasi dan proliferasi sel, serta meningkatkan angiogenesis di area yang rusak. Penerapan vesikel ekstraseluler dari SC

adiposa dan MSC sumsum tulang telah menghasilkan re-epitelisasi luka secara lengkap pada kelinci. (Mahmoudvand *et al.*, 2023)

Secretome MSC (MSC-S) adalah Kumpulan berbagai molekul bioaktif, termasuk protein, asam nukleat, proteasome, eksosom, dan miRNA yang dikeluarkan MSC sebagai respon terhadap kondisi sekitar. MSC dapat berasal dari beberapa organ yang berbeda, tetapi memiliki karakteristik fenotip dan regeneratif yang sama, Namun pada secretome berbeda tergantung pada asal usulnya, yang akibatnya dapat menimbulkan potensi terapi yang bervariasi. Pada penerapan secretome yang berasal dari umbilical cord MSC (UC-MSC) pada luka diabetik menghasilkan kenaikan kepadatan pembuluh darah, peningkatan penyembuhan, tingkat ekspresi PDGF, VEGF dan KGF yang lebih tinggi. (Ahangar, Mills and Cowin, 2020). Hipoksia *precondition* pada MSCs (H-MSCs) dapat meningkatkan kemampuan pada MSC, seperti antiinflamasi dan kemampuan regenerasi pembuluh darah melalui mekanisme parakrin, seperti ekspresi *interleukin-10* (IL-10) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF), yang penting dalam menurunkan inflamasi dan meningkatkan angiogenesis. (Sazli *et al.*, 2023). SH-MSCs atau *secretome hypoxia mesenchymal stem cell* adalah secretome yang mengandung molekul aktif biologis dan vesikel ekstraseluler yang berasal dari H-MSCs mampu menginduksi anti-inflamasi dan regenerasi pembuluh darah (Sazli *et al.*, 2023)

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh (Mahmoudvand *et al.*, 2023) Menunjukkan bahwa pemberian MSCs memiliki pengaruh dalam semua tahap penyembuhan Luka diabetik termasuk fase Homeostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Ma *et al.*, 2021) menunjukkan bahwa pemberian *secretome* memiliki hasil terapeutik yang lebih baik di fase awal pada luka eksisi dibandingkan dengan pemberian MSCs. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh (Dias *et al.*, 2021) pemberian injeksi secretome dengan dosis 200 $\mu$ L dan 400 $\mu$ L pada tikus model diabetik tipe 1 menurunkan kadar gula darah dan meningkatkan faktor transkripsi PDX-1 yang berarti adanya regenerasi pancreas.

Pemaparan di atas memberikan peneliti alasan mengapa *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) mempunyai potensi sebagai

pengobatan pada luka diabetik. Hal ini memberikan dasar untuk melakukan penelitian tentang efek pemberian gel berbasis SH-MSCs terhadap ekspresi makrofag M2 pada tikus model luka diabetik.

### **1.1 Rumusan Masalah**

Mengetahui apakah terdapat pengaruh pemberian gel berbasis SH- MSCs terhadap ekspresi makrofag M2 pada tikus model luka diabetik ?

### **1.2 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian gel berbasis SH- MSCs terhadap ekspresi makrofag M2 pada tikus model luka diabetik.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Membuktikan pengaruh pemberian gel berbasis SH- MSCs pada dosis 200  $\mu$ L dalam 200 mg gel terhadap peningkatan ekspresi CD163 dibanding kontrol.
2. Membuktikan pengaruh pemberian gel berbasis SH- MSCs pada dosis 400  $\mu$ L dalam 200 mg gel terhadap peningkatan ekspresi CD163 dibanding kontrol.

### **1.3 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah Informasi dan wawasan terhadap peneliti dan Masyarakat dunia mengenai peran dan pengaruh gel SH- MSCs terhadap pasien dengan luka diabetik.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi kepada dokter atau klinisi untuk dapat memberikan gel berbasis SH- MSCs sebagai terapi kepada pasien dengan luka diabetik

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Diabetes Melitus (DM)**

##### **2.1.1. Definisi**

Diabetes adalah sekelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat kelainan sekresi insulin, aktivitas, atau keduanya. Hiperglikemia kronis pada diabetes dikaitkan dengan berbagai kerusakan, disfungsi, dan kegagalan organ jangka panjang, terutama mata, pembuluh darah, jantung, saraf, dan ginjal. (Diabetes, 2010)

Diabetes ditandai dengan gangguan karbohidrat, lemak, dan metabolisme protein. Gejala klinisnya meliputi poliuria, polidipsia, polifagia, penurunan berat badan, dan penglihatan kabur biasanya terjadi bila hiperglikemia berkepanjangan parah. Hal ini memperparah diabetes yang tidak terkontrol berupa ketoasidosis atau koma hiperosmolar non-ketotik. Hiperglikemia kronis dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan meningkatkan kerentanan terhadap infeksi tertentu pada beberapa penderita diabetes. Selain itu gejala klasik, penderita diabetes dapat menunjukkan gejala yang tidak jelas, seperti penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan, kelelahan, kegelisahan, dan nyeri tubuh. Beberapa orang dalam tahap awal hiperglikemia hadir dengan gejala hipoglikemia reaktif. (Holt and Flyvbjerg, 2023)

##### **2.1.2. Klasifikasi dan Etiologi**

###### **1. Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT 1)**

###### **a. Diabetes Yang Dimediasi Sistem Imun.**

Diabetes jenis ini, yang sebelumnya disebut sebagai diabetes juvenile-onset, diabetes tergantung insulin, atau diabetes tipe 1, hanya menyerang 5–10% penderita diabetes. Hal ini disebabkan oleh kematian sel  $\beta$  pankreas yang dimediasi seluler secara autoimun. Autoantibodi sel pulau, autoantibodi insulin, autoantibodi GAD

(GAD65), dan autoantibodi terhadap tirosin fosfatase IA-2 dan IA-2 $\beta$  merupakan indikator kerusakan imunologis sel  $\beta$ . Saat hiperglikemia puasa pertama kali teridentifikasi, 85–90% orang memiliki satu atau lebih autoantibodi ini. Selain itu, penyakit ini terkait dengan gen DQA dan DQB, memiliki koneksi HLA yang besar, dan dipengaruhi oleh gen DRB. Alel HLA-DR/DQ ini berpotensi bersifat protektif atau predisposisi.

#### b. Idiopathic Diabetes.

Pada beberapa bentuk diabetes tipe 1, penyebabnya tidak diketahui, Beberapa dari pasien ini mengalami insulinopenia persisten dan rentan terhadap ketoasidosis namun tidak menunjukkan tanda-tanda autoimunitas. Meski hanya sebagian kecil penderita diabetes tipe 1 yang masuk dalam kategori ini, namun sebagian besar pasien yang masuk dalam kategori ini adalah keturunan Afrika atau Asia. Orang dengan diabetes jenis ini menderita ketoasidosis episodik dan memiliki tingkat defisiensi insulin yang berbeda-beda pada setiap episodenya. Bentuk diabetes ini sangat diwariskan, tidak ada bukti imunologis autoimunitas sel  $\beta$ , dan tidak ada hubungan HLA. Kebutuhan mutlak akan terapi penggantian insulin pada pasien yang terkena dampak berubah dari waktu ke waktu. (American Diabetes Association, 2013)

## 2. Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)

Sekitar 90–95% penderita diabetes menderita jenis diabetes ini, yang juga dikenal sebagai diabetes usia dewasa, atau diabetes yang tidak bergantung pada insulin. Orang dengan diabetes tipe ini biasanya mengalami kekurangan insulin relatif dibandingkan absolut dan resisten terhadap insulin. Orang-orang ini tidak memerlukan terapi insulin untuk bertahan hidup, setidaknya hanya pada awalnya, dan seringkali tidak sepanjang hidup mereka. Diabetes jenis ini kemungkinan besar disebabkan oleh berbagai macam hal. Etiologinya

tidak diketahui, namun individu tidak menunjukkan kerusakan sel  $\beta$  secara autoimun. Mayoritas penderita diabetes tipe ini mengalami obesitas, dan obesitas berkontribusi terhadap resistensi insulin sampai batas tertentu. Pada diabetes jenis ini, ketoasidosis jarang berkembang dengan sendirinya, bila terjadi, biasanya hal itu terjadi sebagai respons terhadap stres akibat penyakit lain, seperti infeksi. Karena jenis diabetes ini berkembang secara bertahap dan seringkali tidak cukup parah pada tahap awal sehingga pasien dapat mendeteksi tanda-tanda klasik diabetes, bentuk diabetes ini biasanya tidak diobati selama bertahun-tahun. Namun, ada kemungkinan lebih tinggi terjadinya masalah makrovaskular dan mikrovaskular pada pasien ini. Pasien dengan diabetes tipe ini mungkin tampak memiliki kadar insulin yang normal atau meningkat, namun jika fungsi sel  $\beta$  mereka normal, kadar gula darah yang lebih tinggi akan menyebabkan kadar insulin yang lebih tinggi lagi. Akibatnya, sekresi insulin pasien terganggu dan tidak cukup untuk mengkompensasi resistensi insulin. Meskipun resistensi insulin jarang menjadi normal, resistensi ini dapat membaik dengan penurunan berat badan dan/atau pengobatan hiperglikemia. (American Diabetes Association, 2013)

### 3. Diabetes tipe lainnya

#### a. Defek Genetik Pada sel $\beta$ .

Beberapa bentuk diabetes berhubungan dengan defek monogenetik pada fungsi sel  $\beta$ . Diabetes bentuk ini sering kali ditandai dengan timbulnya hiperglikemia pada usia dini (umumnya sebelum usia 25 tahun). Penyakit ini ditandai dengan gangguan pada sekresi insulin dengan sedikit atau tanpa cacat pada kerja insulin. Mereka diwariskan dalam pola autosomal dominan. Kelainan pada enam lokus genetik pada kromosom berbeda telah teridentifikasi hingga saat ini. Bentuk paling umum dikaitkan dengan mutasi pada kromosom 12 pada faktor transkripsi hati yang disebut faktor nuklir hepatosit (HNF) -1 $\alpha$ . Bentuk kedua dikaitkan dengan mutasi pada gen glukokinase pada kromosom 7p dan menghasilkan molekul

glukokinase yang rusak. Glukokinase mengubah glukosa menjadi glukosa-6-fosfat, yang metabolismenya kemudian merangsang sekresi insulin oleh sel  $\beta$ . Dengan demikian, glukokinase berfungsi sebagai “sensor glukosa” untuk sel  $\beta$ . Karena kerusakan pada gen glukokinase, peningkatan kadar glukosa plasma diperlukan untuk memperoleh tingkat normal sekresi insulin. Bentuk yang kurang umum disebabkan oleh mutasi pada faktor transkripsi lain, termasuk HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\beta$ , faktor promotor insulin (IPF)-1, dan NeuroD1.

#### b. Defek Genetik Pada Kerja Insulin.

Ada beberapa penyebab diabetes yang tidak biasa karena kelainan kerja insulin yang disebabkan karena genetik. Gangguan metabolisme yang berhubungan dengan mutasi reseptor insulin dapat berkisar dari hiperinsulinemia dan hiperglikemia ringan hingga diabetes parah. Beberapa orang dengan mutasi ini mungkin menderita akantosis nigrikans. Wanita mungkin mengalami virilisasi dan pembesaran kistik ovarium. Dahulu, sindrom ini disebut resistensi insulin tipe A. Leprechaunisme dan sindrom Rabson-Mendenhall adalah dua sindrom masa kanak-kanak yang melibatkan mutasi pada gen reseptor insulin yang diikuti dengan perubahan fungsi reseptor insulin dan resistensi insulin ekstrem. Yang pertama memiliki ciri wajah yang spesifik dan biasanya berakibat fatal pada masa kanak-kanak, sedangkan yang kedua berhubungan dengan kelainan gigi dan kuku serta hiperplasia kelenjar pineal.

#### c. Diabetes Yang Diinduksi Bahan Kimia Atau Obat

Banyak obat yang dapat menghambat sekresi insulin. Obat-obatan ini mungkin tidak menyebabkan diabetes dengan sendirinya, namun dapat menyebabkan diabetes pada orang yang mengalami resistensi insulin. Dalam kasus seperti ini, klasifikasinya tidak jelas karena sebab dari disfungsi sel  $\beta$  dan resistensi insulin tidak diketahui. Racun tertentu, seperti Vacor (racun tikus) dan pentamidin intravena, dapat menghancurkan sel  $\beta$  pankreas secara permanen. Untungnya, reaksi obat seperti ini jarang terjadi. Ada juga banyak obat dan

hormon yang dapat mengganggu kerja insulin. Contohnya termasuk asam nikotinat dan glukokortikoid. Pasien yang menerima  $\alpha$ -interferon telah dilaporkan mengembangkan diabetes yang berhubungan dengan antibodi sel pulau dan, dalam kasus tertentu, kekurangan insulin yang parah. (American Diabetes Association, 2013)

### 2.1.3. Manifestasi Klinis

Berikut manifestasi klinis diabetes secara umum:

#### A. Peningkatan buang air kecil (poliuria)

Sel-sel tubuh tidak dapat menyerap glukosa, sehingga ginjal berusaha mengeluarkan glukosa sebanyak mungkin. Akibatnya penderita DM lebih sering buang air kecil dibandingkan orang normal.

#### B. Rasa haus yang berlebihan (polidipsia)

Hilangnya air dalam tubuh akibat sering buang air kecil, penderita DM merasa haus dan membutuhkan banyak air untuk menggantikan cairan yang hilang.

#### C. Penurunan berat badan

Pada penderita diabetes, glukosa tidak dapat dibawa ke dalam sel untuk dijadikan sumber energi, maka tubuh menggunakan protein sebagai alternatif untuk menghasilkan energi.

#### D. Sering lapar

Rasa lapar yang berlebihan merupakan tanda penyakit diabetes. Ketika gula darah turun drastis, tubuh mengira belum dimakan dan membutuhkan glukosa untuk sel.

#### E. Masalah kulit

Kulit gatal, disebabkan karena kulit yang kering, sering kali merupakan tanda peringatan diabetes, serta penyakit kulit lainnya, seperti penggelapan kulit di sekitar leher atau ketiak.

#### F. Penyembuhan luka yang lambat

Penyembuhan luka yang lambat disebabkan oleh darah yang bergerak lebih lambat, sehingga lebih sulit bagi tubuh untuk mengantarkan nutrisi ke luka.

#### G. Infeksi jamur

Diabetes meningkatkan kerentanan terhadap berbagai infeksi. Jamur dan bakteri dapat tumbuh subur di lingkungan yang kaya gula. (Kemenkes RI, 2019)

### 2.1.4. Diagnosis

Menurut *American Diabetes Association* (ADA), nilai glukosa darah puasa harus digunakan untuk skrining diabetes rutin. Namun, kadar gula darah postprandial, kadar gula darah acak, dan tes toleransi glukosa juga digunakan untuk mengukur kadar gula darah. Diagnosis diabetes memerlukan setidaknya satu kriteria:

- Gejala diabetes (poliurea, polidipsia, penurunan berat badan tanpa sebab yang jelas, dll) serta konsentrasi glukosa plasma normal = 11,1 mmol/L (200 mg/dL).
- Glukosa plasma puasa = kisaran normal adalah 70 - 110 mg/dL tanpa asupan kalori selama minimal 8 jam.

Klasifikasi Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mencakup tahapan klinis (normoglikemia, gangguan toleransi glukosa/gangguan glukosa puasa (IGT/IFG), diabetes). Jenis etiologi diabetes mellitus, identik dengan ADA kecuali kelompok WHO memasukkan klasifikasi yang sebelumnya dikenal sebagai toleransi glukosa gangguan kehamilan atau diabetes melitus gestational (GDM) : glukosa puasa = 7,0 mmol/L (126 mg/dL) dan/atau glukosa 2 jam = 7,8 mmol/L (140 mg/dL) setelah tes toleransi glukosa oral atau OGTT 75g. (Yash Sahebrao Chaudhari *et al.*, 2023)

### 2.1.5. Komplikasi

Komplikasi penyakit diabetes melitus secara umum dibagi menjadi komplikasi makrovaskular (misalnya, penyakit kardiovaskular (CVD) dan komplikasi mikrovaskuler (misalnya, komplikasi yang mempengaruhi ginjal, retina dan sistem saraf). Komplikasi DMT2 sangat umum terjadi, dengan studi observasional yang dilakukan di 28 negara di Asia, Afrika, Amerika Selatan dan Eropa menunjukkan bahwa separuh pasien DMT2 mengalami komplikasi mikrovaskuler, dan 27% mengalami komplikasi makrovaskuler. (Zheng, Ley and Hu, 2018)

#### A. Mikrovaskular

##### 1. Retinopati Diabetik

Retinopati adalah komplikasi umum diabetes. Onset dan perkembangannya berhubungan erat dengan glukosa plasma. Peningkatan HbA1c sebesar 1% dikaitkan dengan peningkatan retinopati >30%. Risiko perkembangan lebih dari 20% dan kebutaan meningkat hampir 15%. Baru-baru ini, konsep diabetic retinopathy (DR) telah berkembang menjadi konsep unineurovaskular yang terdiri dari beberapa fenotip sel termasuk sel endotel, perisit, sel glial, mikroglia, dan neuron. Glukosa yang tinggi merusak semua komponen ini. (Avogaro and Fadini, 2019)

##### 2. Diabetik Makular Edema

*Diabetic macular edema* (DME) adalah salah satu komplikasi diabetes yang mengancam penglihatan, merupakan akumulasi dari cairan di bagian tengah retina, yang timbul akibat kegagalan *blood retinal barrier* (BRB). *Diffuse edema* disebabkan oleh kebocoran kapiler yang luas, sedangkan *localized edema* disebabkan oleh kebocoran fokal dari mikroaneurisma di satu tempat. (Avogaro and Fadini, 2019)

##### 3. Neuropati diabetik

Neuropati diabetik dapat terjadi akibat peradangan pada serabut saraf proksimal atau distal atau dapat mempengaruhi sistem saraf somatik atau otonom. Polineuropati simetris distal mempengaruhi

sepertiga pasien diabetes tipe 1 atau tipe 2. Berkurangnya sensasi merupakan faktor predisposisi terjadinya DFU dan selanjutnya dapat mengakibatkan amputasi. Risiko seumur hidup dari lesi kaki, termasuk ulkus dan gangren, adalah 15-25%. DFU meningkatkan kemungkinan terjadinya PJK lebih dari tiga kali lipat. Khususnya pada pasien diabetes dengan durasi lama, *autonomic neuropati* (AN), jika melibatkan fungsi jantung, secara independen memprediksi risiko kematian akibat penyakit kardiovaskular dan *acute myocardial infark* (AMI). (Avogaro and Fadini, 2019)

#### 4.Nefropati Diabetik

*Diabetic nephropathy* (DN) adalah salah satu yang paling sering terjadi dan komplikasi parah diabetes melitus (DM) dan berkaitan dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas di pasien diabetes. Patogenesis permulaan dan perkembangan DN bersifat kompleks dan multifaktorial, melibatkan banyak jalur pensinyalan dan mediator. Secara umum, mekanisme perkembangan DN dianggap sebagai akibat dari homeostasis yang abnormal, termasuk kelainan hemodinamik, gangguan metabolisme, dan sintesis hormon seperti Ang-II, sistem renin-angiotensin-aldosteron (RAAS), kompleks *advanced glycation end product* (AGE), *transforming growth factor-β1* (TGF-β1), , *connective tissue growth factor* (CTGF), *protein kinase C* (PKC), *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), dan *reactive oxygen species* (ROS) adalah jalur penting untuk permulaan dan perkembangan DN. Setiap jalur menyebabkan kerusakan melalui banyak mediator atau berinteraksi dengan jalur lain.(Samsu, 2021)

#### B. Makrovaskular

##### 1. Penyakit Arteri Perifer (PAD)

Penyakit arteri perifer adalah sekelompok penyakit yang ditandai dengan penyempitan atau penyumbatan arteri, yang secara bertahap mengurangi suplai darah ke ekstremitas. Pasien dengan PAD mungkin tidak menunjukkan gejala atau mengalami gejala seperti klaudikasio

intermiten, gejala parah, iskemia ekstremitas yang ditandai dengan nyeri perifer saat istirahat, ulserasi iskemik, dan gangren. Pasien diabetes dengan PAD mempunyai peningkatan risiko peningkatan morbiditas dan mortalitas akibat penyakit kardiovaskular. Dampak dari masalah ini sangat besar, mengingat antara 120 hingga 140 juta orang di seluruh dunia menderita diabetes melitus (DM) dan pasien diabetes berisiko tinggi terkena penyakit dan PAD. (Jude, Eleftheriadou and Tentolouris, 2010)

## **2.2. Luka Diabetik**

### **1.1.1 Definisi**

Luka kulit diabetik atau ulkus kulit diabetik bermanifestasi sebagai ulkus yang menyakitkan dengan kerusakan jaringan kulit, termasuk epidermis, dermis, dan seringkali jaringan subkutan. Pada diabetes, ulserasi kulit kronis sering terjadi pada ekstremitas bawah, khususnya kaki. Ulkus kaki diabetik (DFU) mempengaruhi 15% penderita diabetes. 14-24% pasien DFU kemudian menjalani amputasi ekstremitas bawah, dan angka kematian mendekati 50-59% dalam waktu 5 tahun setelah amputasi. Studi patologis pada ulkus kaki diabetik berfokus pada invasi mikroba, kerusakan epitel, dan disfungsi imun sebagai beberapa faktor yang berkontribusi terhadap fenotip *non-healing*. Salah satu faktor mendasar yang terkait dengan semua tukak diabetes adalah aliran pembuluh darah yang buruk, suatu kondisi yang menghambat penyembuhan luka dengan baik. (Okonkwo and Dipietro, 2017)

### **1.1.2 Patofisiologi**

#### **A. Hiperglikemia**

Pada penderita DM, hiperglikemia dapat menyebabkan aterosklerosis, disfungsi berbagai sel kulit, gangguan penutupan luka akibat neuropati perifer, dan berkembangnya DFU. Meskipun hipoglikemia juga dikaitkan dengan komplikasi vaskular diabetes, sebagian besar literatur, dan bagian ini, berfokus pada efek negatif hiperglikemia dalam kaitannya dengan perkembangan dan perkembangan

DFU. Hiperglikemia berkontribusi pada perkembangan aterosklerosis dan mencegah sirkulasi nutrisi mencapai luka.

Selain sel endotel, hiperglikemia juga mengganggu proses penting untuk re-epitelisasi, yaitu sintesis protein, migrasi, dan proliferasi keratinosit dan fibroblas. Pada pasien dengan DFU, ekspresi beberapa protein keratinosit yang berhubungan dengan re-epitelisasi terganggu, termasuk sitoskeletal protein keratin (K2, K6, dan K10), yang penting untuk diferensiasi keratinosit, dan protein prekursor rantai laminin-5  $\alpha$ 3 (LM-3A32), yang mengatur pengikatan sel epitel ke membran basal. Selanjutnya reduksi dari LM-3A32 mengganggu kelangsungan hidup dan diferensiasi keratinosit dan demikian juga re-epitelisasi.

Mekanisme lain dimana hiperglikemia mengganggu penyembuhan luka adalah kerusakan akibat radikal bebas melalui penurunan aktivitas enzim antioksidan glutathione peroksidase dan superoksida dismutase. Ini mungkin menjelaskan mengapa penelitian lain menunjukkan bahwa hiperglikemia yang tidak terkontrol dalam jangka panjang menyebabkan peningkatan kadar *marker* yang terkait dengan proses penuaan kulit, yaitu *advanced glycation end products* (AGEs) serta reseptornya. Hiperglikemia juga dapat menyebabkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) melalui jalur poliol, heksosamin, protein kinase C, dan AGE. Meskipun ROS diketahui diperlukan pada tahap awal penyembuhan luka, ketidakseimbangan dalam produksi ROS terbukti merugikan tahap penyembuhan luka selanjutnya. Terutama, peningkatan kadar ROS dapat merusak suplai darah, metabolisme, dan struktur saraf tepi. (Volmer-thole and Lobmann, 2016)

## B. Neuropati

Selain meningkatkan risiko pembentukan DFU, setiap jenis neuropati (sensorik, motorik, dan/atau otonom) dapat berkontribusi terhadap gangguan penyembuhan DFU. Misalnya, neuropati otonom menurunkan aktivitas kelenjar keringat, sehingga menyebabkan kulit kering dan pecah-pecah meningkatkan risiko pruritus dan infeksi, yang

menghambat penyembuhan luka. Selain itu kulit kering dan sirkulasi yang buruk, neuropati diabetik, karena alasan yang tidak jelas, terkait dengan pruritus. Sementara itu, neuropati motorik meningkatkan tekanan pada plantar permukaan kaki, menyebabkan iskemia jaringan dan kematian. Secara keseluruhan, kulit bersifat neuropatik berkurangnya kepadatan neuron dan menunjukkan berkurangnya penyembuhan kulit . (Burgess *et al.*, 2021)

Selain mengoptimalkan kontrol gula darah, pasien dapat mencegah kulit kering dan pruritus dengan menghindari paparan air panas dan menggunakan pelembab, terutama yang tidak mengandung air panas. pewangi atau pewarna. Perawatan lain untuk meningkatkan penutupan luka pada pasien diabetes dan neuropati termasuk antibiotik jika ada infeksi, serta debridemen dan pembersihan luka. (Volmer-thole and Lobmann, 2016)

### C. Inflamasi dan Disregulasi Sistem Imun

Dinamika penyembuhan luka akut terdiri dari empat tahap yang saling tumpang tindih termasuk hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling .Individu dengan diabetes dapat mengalami berbagai komplikasi, termasuk luka kronis seperti DFU yang tidak dapat disembuhkan akibat terganggunya semua tahap penyembuhan luka .Pertama, berbeda dengan luka akut , DFU dikaitkan dengan fase inflamasi yang tidak dapat diselesaikan di mana sejumlah besar neutrofil dan makrofag ditemukan di dasar luka dan pelepasan sitokin proinflamasi, termasuk pelepasan kronis (IL)-1, IL-6, faktor nekrosis tumor (TNF)- $\alpha$  dan protein C-reaktif plasma dan proliferasi bakteri adalah faktor yang paling banyak dipelajari yang berkontribusi terhadap gangguan proses penyembuhan. Ciri lain dari DFU adalah keadaan hipoksia yang persisten karena angiogenesis yang tidak memadai, yang diperburuk oleh respon inflamasi yang berkelanjutan, menyebabkan peningkatan ROS dan disfungsi proses penyembuhan. Downregulasi faktor pertumbuhan jaringan ikat pada DFU berkorelasi dengan penurunan faktor pertumbuhan transformasi (TGF)- $\beta$  dan kadar kolagen,

sehingga memperlambat penutupan luka dan menghambat proliferasi fibroblas pada populasi sel vaskular di model tikus maupun manusia. Penelitian telah menunjukkan bahwa ekspresi berlebih dari TNF dan penurunan regulasi TGF- $\beta$ 1 pada makrofag menghasilkan peningkatan kadar IL-10, penurunan produksi kolagen, dan peningkatan kerusakan jaringan. Secara kolektif, faktor-faktor ini secara signifikan berkontribusi terhadap keadaan inflamasi jangka panjang di DFU, sehingga menghambat keberhasilan penutupan luka. (Volmer-thole and Lobmann, 2016). (Volmer-thole and Lobmann, 2016)

Selain itu, gangguan fungsi sel kekebalan telah didokumentasikan dengan baik pada pasien diabetes, dengan gangguan aktivitas fagositik dan disfungsi leukosit. Makrofag telah banyak dipelajari dalam studi sistem kekebalan pada lesi kronis pada manusia dan tikus diabetes. Hal ini sebagian karena makrofag memproduksi dan melepaskan sitokin, yang dipengaruhi oleh mikrobioma di sekitarnya dan mengoordinasikan transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi. Pada luka akut, makrofag M1 digantikan oleh M2 seiring dengan meredanya tahap inflamasi, sedangkan pada DFU, makrofag M1 terus mendominasi lingkungan mikro luka. Demikian pula pada pasien diabetes, peradangan kronis menyebabkan penumpukan sel T, yang merupakan alasan tingginya tingkat TNF- $\alpha$  dan reseptor kemokin motif C-C 4 (CCR4), secara signifikan mempengaruhi respon imun dan memfasilitasi proliferasi patogen oportunistik. Penelitian juga menunjukkan bahwa tingkat keparahan DFU mungkin berbeda sebagian ditentukan oleh defisiensi respon imun pada DFU melalui deregulasi IL-6, faktor penghambat migrasi makrofag (MIF), dan protein yang diinduksi interferon (IP) -10, dan respons neutrofil yang terganggu. (Morey *et al.*, 2019)

Dalam beberapa tahun terakhir telah diusulkan bahwa rasio trombosit-ke-limfosit (PLR) dan neutrofil-limfosit (NLR) yang tinggi mungkin merupakan penanda biologis untuk tingkat keparahan DFU, di mana tingkat PLR yang tinggi mencerminkan peningkatan aktivitas trombosit, peradangan, dan risiko trombosis dan aterogenesis, sementara

kadar NLR yang tinggi menyebabkan peningkatan regulasi sitokin dan enzim proteolitik yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan. (Chen and Chen, 2021)

### 1.1.3 Diagnosis

Evaluasi luka diabetik dapat diketahui dengan 2 langkah, melalui anamnesis dan pemeriksaan fisik.

#### A. Anamnesis

Pada anamnesis meliputi tanda-tanda neuropati perifer termasuk hipoestesi, hiperesthesia, paresthesia, nyeri radikular, dan anhidrosis. Karena kecenderungan terjadinya aterosklerosis, pasien diabetes sering mengalami kram kaki, lemas, dan kelelahan.

#### B. Pemeriksaan Fisik

Pemeriksaan fisik pada pasien Luka diabetik dibagi menjadi 3 bagian:

##### 1. Pemeriksaan Luka Dan Keadaan Umum Penderita Ekstremitas

Tumit, di sekitar kepala metatarsal telapak tangan, dan jari kaki yang menonjol (jari kaki pertama dan kedua) merupakan area umum terjadinya tukak diabetes.

##### 2. Penilaian Risiko Insufisiensi Vaskular

Pemeriksaan fisik menunjukkan denyut nadi perifer tertekan atau di bawah batas tertentu. Atrofi kulit, rambut rontok di kaki, sianosis pada jari kaki, ulserasi dan nekrosis iskemik, dan pucat pada tungkai saat kaki diangkat setinggi jantung selama 1 hingga 2 menit adalah gejala aterosklerosis lainnya. Pengukuran oksigen transkutan, indeks pergelangan kaki-brakial (ABI), dan tekanan sistolik jari kaki adalah bagian dari pengujian vaskular non-invasif. Dengan menggunakan pemindai Doppler, indeks pergelangan kaki-brakialis dapat diukur dengan mudah dan non-invasif (Rosyid, 2017).

### 3. Penilaian Risiko Neuropati Perifer

Tanda-tanda neuropati perifer termasuk hilangnya getaran dan kesadaran posisi, hilangnya refleks tendon dalam, ulserasi trofik, kelemahan dorsofleksi, atrofi otot, dan pembentukan kalus hipertrofik, terutama pada daerah yang terjadi penekanan misalnya tumit. Status saraf dapat diperiksa dengan mengidentifikasi sensasi protektif menggunakan monofilamen *Semmes-Weinsten*. Instrumen tes lainnya adalah garpu tala 128 Hz yang mengukur sensasi pada sendi pergelangan kaki dan sendi metatarsophalangeal pertama jempol kaki.

#### 1.1.4 Tatalaksana

Strategi penyembuhan luka dapat mencakup terapi perawatan standar dan terapi lanjutan, dengan perawatan standar meliputi debridemen luka, Pengendalian kadar gula darah, dan pengendalian infeksi, sedangkan terapi lanjutan mencakup terapi oksigen hiperbarik (HBOT), pembalutan, terapi luka tekanan negatif (NPWT), dan terapi faktor pertumbuhan, termasuk plasma kaya trombosit, stem *cell* dan produk berbasis sel dan jaringan. Mengingat kebutuhan klinis, strategi pengobatan multifungsi dan responsif terhadap stimulus dapat mempercepat penyembuhan luka diabetes dapat menjadi bagian penting dari manajemen luka diabetes di masa depan.

##### A. Debridemen

Debridement didefinisikan sebagai pengangkatan benda mati, benda asing, dan jaringan yang sulit disembuhkan dari suatu luka. Sebagai bagian dari perawatan standar, debridemen luka mengurangi jumlah bakteri, termasuk biofilm, dan meningkatkan efektivitas sistem kekebalan tubuh, serta mekanisme kerja lainnya. Meskipun keberadaan biofilm bakteri pada luka akut berfungsi sebagai penghalang mekanis dan faktor pertumbuhan yang melekat dalam penyembuhan luka, pembentukan biofilm yang tidak terkontrol dapat menjadi resisten terhadap banyak obat dan mempersulit proses penyembuhan yang terjadi pada luka diabetik.

## B. Terapi Oksigen Hiperbarik

Terapi oksigen hiperbarik (HBOT) melibatkan penggunaan oksigen 100% pada tekanan yang lebih tinggi dari tekanan atmosfer. Saat ini terdapat beberapa permohonan dan indikasi yang disetujui untuk HBOT. HBOT telah berhasil digunakan sebagai pengobatan komplementer untuk penyembuhan luka. Luka yang tidak dapat disembuhkan seperti luka diabetes dan insufisiensi vaskular telah menjadi salah satu bidang penelitian utama bagi peneliti, dimana penggunaan HBO sebagai terapi tambahan telah dibuktikan oleh banyak penelitian dan pengujian yang berbeda. (Bhutani and Vishwanath, 2012)

## C. Terapi Tekanan Luka Negatif

Penanganan menggunakan terapi tekanan luka negatif (NPWT) ini didasarkan pada tekanan negatif lokal yang didistribusikan secara merata pada permukaan luka. Luka terbuka ditutup dengan penutup luka tersendiri (poliuretan atau polivinil alkohol) dan film kedap udara. Penutup luka disambung melalui satu set tabung hisap ke unit kontrol dimana tekanan negatif primer pada permukaan luka dapat diatur. Paling umum digunakan tekanan negatif 80-125 mm Hg, baik terus menerus atau dalam siklus. Cairan disedot dari luka dikumpulkan ke dalam wadah di unit kontrol/ (Vikatmaa *et al.*, 2008)

## D. Terapi Sel Punca

Terapi sel punca untuk pengobatan DFU baru-baru ini menjadi topik yang menarik. Model tikus diabetes telah menunjukkan bahwa penggunaan sel punca yang berasal dari adiposa, tali pusat, sumsum tulang, dan sel otot polos atau terapi kombinasi dengan MSCs akan mempercepat luka penyembuhan. Karena sel punca yang diturunkan dari diabetes memiliki fenotip penyembuhan yang berubah, memodifikasi MSCs dengan mengekspresi gen terpilih secara berlebihan seperti *stromal-cell-derived factor* (SDF) -1 $\alpha$ , ekspresi berlebih dari c-Jun, penipisan miR - 205-5p, atau dengan fotobiomodulasi telah menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam mempromosikan

penyembuhan luka dan menawarkan pendekatan potensial untuk terapi sel punca autologus manusia, injeksi jaringan adiposa terfragmentasi autologus dan terapi kombinasi dengan MSC tali pusat telah meningkatkan hasil terapi.

Sebuah meta-analisis baru-baru ini menunjukkan tingkat amputasi yang lebih rendah dan peningkatan penyembuhan luka pada uji coba terkontrol secara acak dari terapi sel punca autologous. Terapi aselular menggunakan media pengkondisi lipofilik MSCs dan eksosom untuk mengobati luka juga sedang dikembangkan. Beberapa uji klinis yang sedang berjalan saat ini menggunakan turunan MSCs dari tali pusat manusia, plasenta dan jaringan adiposa. Percobaan klinis lainnya menunjukkan bahwa MSCs sumsum tulang autologus meningkatkan aliran darah dan penyembuhan anggota tubuh. Dengan perkembangan pesat dalam beberapa tahun terakhir, sel punca dapat menjadi terapi generasi berikutnya untuk penyembuhan luka diabetik.

## 2.3. Makrofag

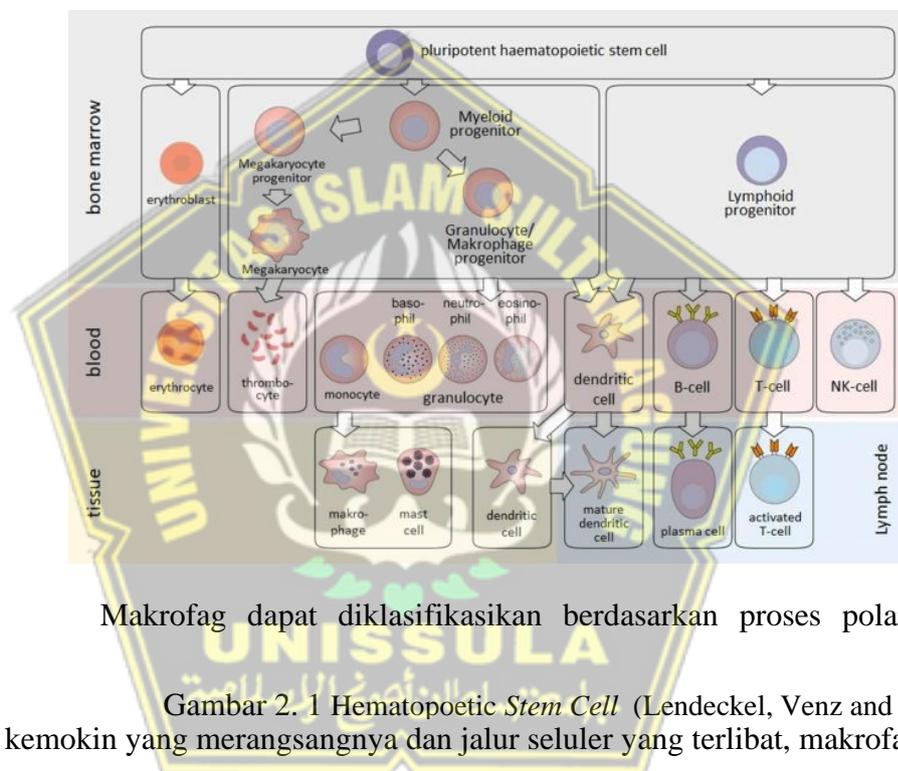
### 1.1.5 Definisi

Makrofag adalah sel penting dari sistem kekebalan bawaan atau non-spesifik yang terdapat pada semua vertebrata. Seperti semua sel imun, makrofag berasal dari sel induk hematopoietik multipoten yang ditemukan di sumsum tulang. (Lendeckel, Venz and Wolke, 2022)

Makrofag adalah komponen utama sistem fagositik mononuklear yang terdiri dari sel-sel yang berkerabat dekat yang berasal dari sumsum tulang, termasuk monosit darah dan makrofag jaringan. Dari darah, monosit berpindah ke jaringan lain dan berubah menjadi makrofag. Selama peradangan, makrofag mempunyai tiga fungsi utama: presentasi antigen, fagositosis, dan imunoregulasi melalui produksi sitokin dan berbagai faktor pertumbuhan. Makrofag memainkan peran penting dalam memulai, mempertahankan, dan menyelesaikan peradangan. Mereka diaktifkan dan dinonaktifkan selama peradangan. Sinyal pengaktif termasuk sitokin (interferon  $\gamma$ , faktor perangsang koloni granulosit-monosit dan faktor nekrosis tumor  $\alpha$ ), lipopolisakarida bakteri, protein

matriks ekstraseluler, dan mediator kimia lainnya. Penghambatan peradangan dengan menghilangkan atau menonaktifkan mediator inflamasi dan sel efektor memungkinkan host memperbaiki kerusakan jaringan. Makrofag yang teraktivasi diinaktivasi oleh sitokin anti inflamasi (interleukin 10 dan transforming growth factor  $\beta$ ) dan antagonis sitokin yang diproduksi terutama oleh makrofag. (Fujiwara and Kobayashi, 2015)

### 1.1.6 Klasifikasi



Makrofag dapat diklasifikasikan berdasarkan proses polarisasi,

Gambar 2. 1 Hematopoietic *Stem Cell* (Lendeckel, Venz and kemokin yang merangsangnya dan jalur seluler yang terlibat, makrofag

dibagi menjadi dua jalur polarisasi yang disebut fenotipe M1 dan M2. M1 adalah makrofag yang diaktifkan secara klasik yang menciptakan lingkungan inflamasi jaringan perifer, melalui sekresi sitokin, dan menunjukkan sifat antibakteri yang kuat melalui produksi oksida nitrat dan radikal oksigen lainnya, yang meningkatkan respons sel T. Makrofag M2 bertindak sebaliknya (pro-regeneratif), menginduksi imunomodulasi dan regenerasi jaringan seperti penyembuhan luka dan fibrosis. Selain itu, M2 menghasilkan sitokin yang memiliki sifat anti-aterosklerotik dan bermanfaat, membantu meningkatkan stabilitas plak. (Dannhauser *et al.*,

2022)

Makrofag M1 mengekspresi CD80, CD86, dan CD16/32 secara berlebihan dan mampu mensekresi sitokin proinflamasi. Sebaliknya, ekspresi arginase-1 (Arg-1), CD163, reseptor mannose (CD206), faktor anti-inflamasi (IL-10) dan kemokin CCL17 dan CCL22 meningkat pada makrofag M2. Mereka memainkan peran penting dalam perbaikan jaringan, angiogenesis, dan metabolisme (Yunna *et al.*, 2020)

### 1.1.7 Polarisasi Makrofag M2

Bergantung pada lingkungan mikro di sekitarnya dan konteks imunologis, makrofag dapat memperoleh karakteristik fungsional yang berbeda melalui proses yang disebut polarisasi. Polarisasi menyebabkan pematangan dan pembentukan makrofag M1 yang “diaktifkan secara klasik” atau M2 “diaktifkan secara alternatif”, yang mewakili tipe makrofag fungsional utama. Makrofag M1 berhubungan dengan peningkatan aktivitas fagositik, kapasitas presentasi antigen, dan peningkatan sintesis dan pelepasan sitokin inflamasi. Sitokin interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) adalah pertama yang diidentifikasi untuk mengubah makrofag menjadi M1. Zat yang saat ini diketahui menginduksi pembentukan makrofag M1 termasuk LPS bakteri dan IFN $\beta$ . (Lendeckel, Venz and Wolke, 2022)

Sebaliknya, polarisasi terhadap sel M2 dimediasi oleh sitokin IL-4 dan IL-13. Makrofag M2 dapat mendorong angiogenesis dan neovaskularisasi, aktivasi dan remodeling stroma, perbaikan jaringan, fibrosis, dan secara umum memiliki kemampuan antiinflamasi yang baik. (Lendeckel, Venz and Wolke, 2022)

Makrofag M1 lebih melimpah daripada makrofag M2 pada tikus dengan luka 3 hari. Sebaliknya, makrofag M2 terdeteksi secara mencolok pada tikus dengan luka 6 hari. Makrofag M1 terdeteksi pada luka pada hari ke-4 fase awal perbaikan, sedangkan jumlah makrofag M2 rendah. Baik makrofag M1 dan M2 manusia terdeteksi berlimpah pada luka pada hari ke-7. M2 makrofag sebagian besar hadir pada luka pada hari ke-10 fase proliferasi perbaikan (Kuninaka *et al.*, 2022)

### 1.1.8 Makrofag M2 Pada Luka Diabetik

Luka diabetes menunjukkan kadar M1 yang berlebihan pada tahap awal namun menunjukkan defisiensi M2 pada tahap proliferasi selanjutnya, hal ini menunjukkan bahwa perubahan aktivasi makrofag dapat berkontribusi terhadap penurunan kemampuan penyembuhan luka diabetes. Strategi untuk membalikkan aktivasi abnormal ini dapat digunakan untuk meningkatkan penyembuhan luka. Oleh karena itu, mendorong migrasi makrofag, fagositosis, dan polarisasi M2 sangat penting untuk mengatur lingkungan mikro imun luka dan mempercepat penyembuhan luka. (Wu *et al.*, 2022)

## 2.4. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs)

### 1.1.9 Stem Cells

SC adalah sel nenek moyang yang dianggap sebagai prekursor lebih dari 200 jenis sel dalam tubuh manusia. Mereka dapat membelah untuk menghasilkan sel lain yang sangat terspesialisasi. Sel disebut SC jika memiliki dua sifat berbeda: *self-renewal* dan *pluripotency*. Pembaharuan diri adalah kemampuan untuk berkembang biak tanpa batas waktu melalui pembagian sederhana. Pluripotensi berarti suatu sel mampu menghasilkan semua jenis sel dalam suatu organisme.

Pembaharuan diri atau diferensiasi ditentukan oleh proses pembelahan sel. SC menghasilkan SC yang tidak berdiferensiasi atau berspesialisasi dalam sel induk. Proses ini diatur oleh pembelahan simetris dan asimetris. Itu tergantung pada faktor intrinsik sel dan ekstrinsik sel. Pembelahan simetris menghasilkan dua sel anak yang identik dengan karakteristik SC. Pembelahan asimetris menghasilkan sel induk SC dan sel progenitor dengan potensi pembaharuan diri yang terbatas. Sel progenitor dapat melalui beberapa siklus pembelahan sel sebelum akhirnya berdiferensiasi menjadi sel khusus. (Arrighi, 2018)

*Stem cell* dapat diklasifikasikan berdasarkan sejauh mana mereka dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel yang berbeda. Empat hal utama

dapat klasifikasikan menjadi totipoten, pluripoten, multipoten, atau unipoten. (Kalra and Tomar, 2014)

#### A. Totipoten

Kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi semua kemungkinan jenis sel. Contohnya adalah zigot terbentuk pada pembuahan sel telur dan beberapa sel pertama yang dihasilkan dari pembelahan zigot.

#### B. Pluripoten

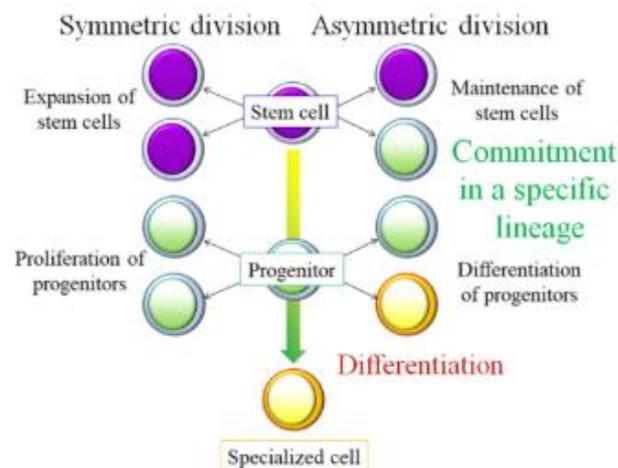
kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi hampir semua jenis sel. Contohnya termasuk sel induk embrionik dan sel-sel yang berasal dari lapisan germinal mesoderm, endoderm, dan ektoderm yang terbentuk di dalam tahap awal diferensiasi sel induk embrionik

#### C. Multipoten

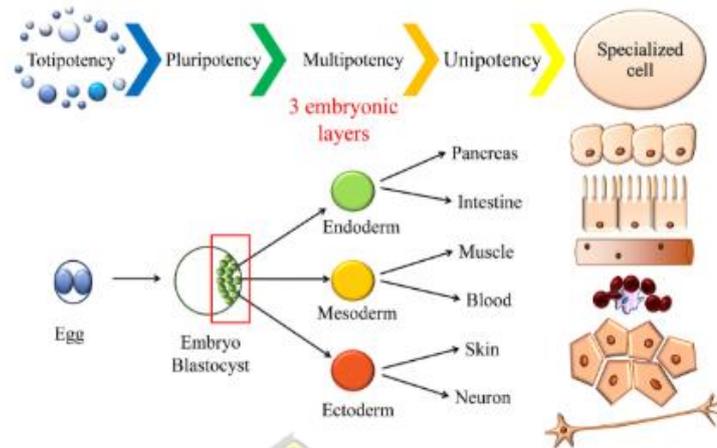
Kemampuan berdiferensiasi menjadi keluarga sel yang berkerabat dekat. Contohnya termasuk sel induk hematopoietik menjadi sel darah merah dan putih atau trombosit

#### D. Unipoten

Kemampuan untuk hanya menghasilkan sel jenisnya sendiri, namun memiliki sifat pembruan diri yang diperlukan untuk diberi label sebagai sel induk. Contohnya termasuk sel induk otot. (Kalra and Tomar, 2014)



Gambar 2. 2 pembelahan pada stem cell



Gambar 2. 3 Klasifikasi stem cell berdasarkan potensi

### 1.1.10 Hypoxic Mesenchymal Stem Cells (H-MSCs)

H-MSC dikenal sebagai sel progenitor stroma multipoten hipoksia, dan ketika ditumbuhkan dalam kondisi kultur hipoksia mereka menunjukkan penguatan kapasitas diferensiasi dan faktor pertumbuhan dan sifat anti-inflamasi yang terkait dengan perbaikan kerusakan jaringan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa HMSC menekan respons peradangan yang berlebihan dan menghambat peradangan dengan melepaskan beberapa sitokin anti-inflamasi seperti interleukin-10 (IL-10), TGF- $\beta$ , dan faktor pertumbuhan hepatosit mendorong transisi ke tahap berikutnya. (Hamra *et al.*, 2021)

Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa konsentrasi oksigen merupakan faktor lingkungan yang penting untuk menjaga plastisitas dan proliferasi sel induk secara *in vitro*. Penelitian lain menunjukkan bahwa hipoksia (tekanan O<sub>2</sub> kurang dari 5%) memiliki efek positif pada MSC dalam hal kelangsungan hidup dan pembaruan diri secara *in vitro*, terutama dalam mempertahankan sifat sel induk dan meningkatkan proliferasi. Bahkan setelah 2 minggu inkubasi kultur, proliferasi MSC meningkat pada kondisi hipoksia dibandingkan dengan kondisi normoksia. Namun, penelitian ini tidak melaporkan penggunaan *Hypoxia chamber* sebagai alat kultur. Sebaliknya, penelitian lain

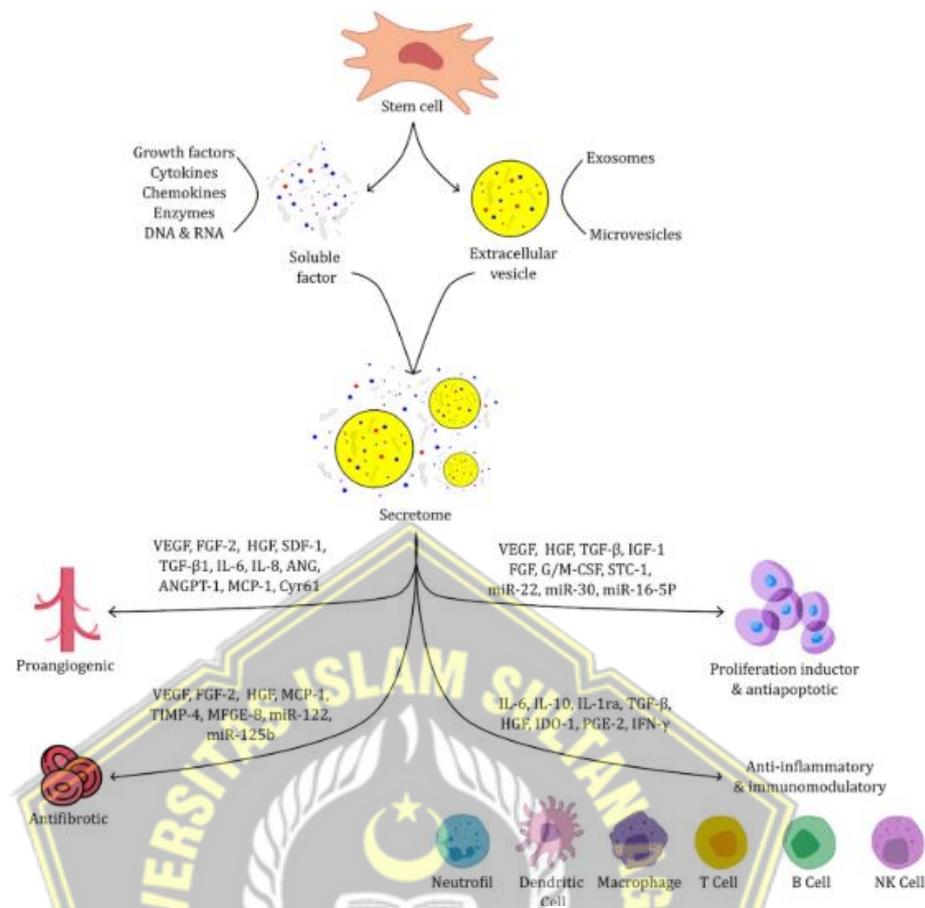
melaporkan bahwa hipoksia yang berkepanjangan mengurangi potensi klonogenik dan diferensiasi MSC. (Yustianingsih, Sumarawati and Putra, 2019)

### 1.1.11 Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs)

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa manfaat terapeutik penting dari MSC tidak terbatas pada interaksi antar sel. Tergantung pada lingkungan, MSC mengeluarkan berbagai molekul bioaktif, yang secara kolektif disebut sekretom, termasuk protein, asam nukleat, proteasom, eksosom, mikroRNA, dan vesikel membran. Sekretom MSC (MSC-S) kemudian mempengaruhi sel-sel di sekitarnya dan mengontrol berbagai proses biologis. (Ahangar, Mills and Cowin, 2020)

Sekretom mengacu pada media sel yang dikultur yang digunakan/dibuang/dikonsumsi setelah masa inkubasi tertentu, dan mencakup protein, faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin, dan *Extra cellular Matrix* (ECM) yang disekresikan oleh sel. Selain itu, molekul kecil termasuk metabolit, ion, peptida, mikrovesikel, eksosom, dll juga dilepaskan dari sel. Sekresi protein adalah salah satu proses biologis paling mendasar karena terlibat dalam pengaturan banyak fungsi seluler. Penggunaan sekretom menarik karena dapat digunakan secara alogenik dan mengandung protein yang mendorong proliferasi sel, diferensiasi, migrasi, dan perbaikan jaringan. (Md Fadilah *et al.*, 2022)

Sekretom dikumpulkan dari berbagai jenis sel setelah terpapar pada medium bebas serum atau kondisi hipoksia. Lebih dari 10 sumber sel induk mesenkim (MSC) telah digunakan untuk mengobati penyakit kulit, termasuk yang diisolasi dari sumsum tulang (BM), tali pusat atau *Wharton's jelly*, adalah yang paling umum digunakan dalam penelitian sekretom. (Md Fadilah *et al.*, 2022)



Gambar 2. 4Illustrasi Secretome dan aktivitasnya

## 2.5. Pengaruh Gel Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) Terhadap Ekspresi Makrofag Tipe-2 pada Tikus Model Luka Diabetik

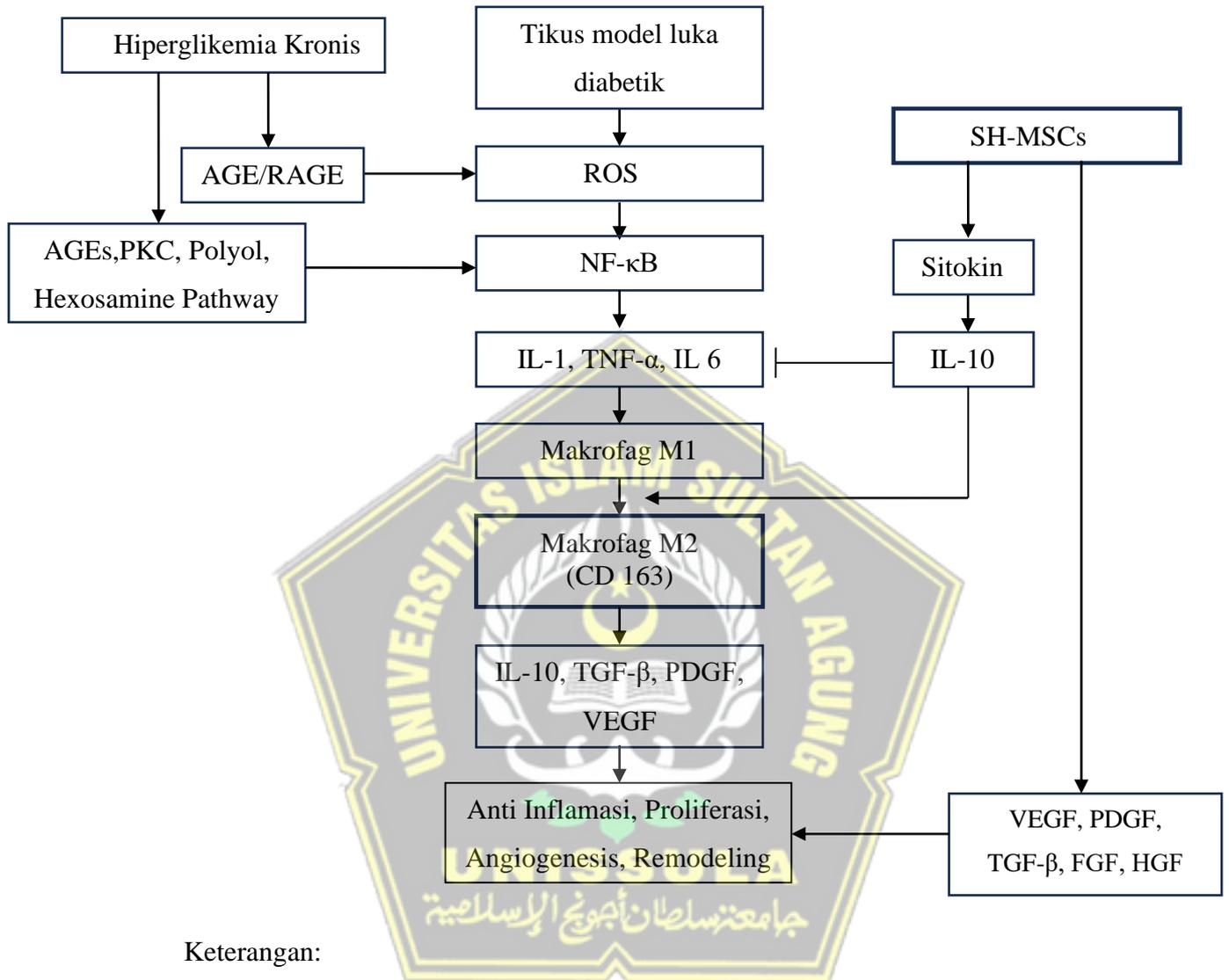
Meskipun monosit dan makrofag umumnya diketahui sebagai pemicu respon inflamasi awal, mereka juga berkontribusi terhadap angiogenesis, kontraksi luka, dan remodeling jaringan yang diperlukan untuk proses penyembuhan luka. Tergantung sinyal aktivasi, makrofag dapat polarisasi menjadi fenotip M1 (pro-inflamasi) atau M2 (anti-inflamasi). Semakin banyak bukti menunjukkan bahwa makrofag M2 mengekspresikan mediator penting untuk resolusi peradangan dan remodeling jaringan dan dengan demikian dapat meningkatkan penyembuhan luka .(He *et al.*, 2019)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa MSC dapat mengubah fenotip makrofag dari M1 menjadi M2 secara *in vitro* dan *in vivo*. Namun, mekanisme yang mendasari transisi makrofag oleh MSC dari fenotip M1 ke

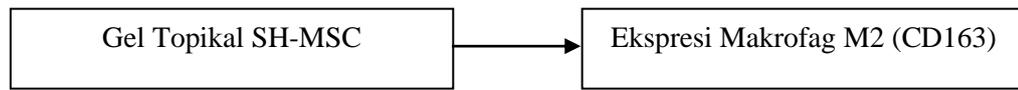
M2 selama penyembuhan luka masih belum jelas. Baru-baru ini, ditemukan bahwa MSC mengeluarkan sejumlah besar vesikel (40-100 nm) yang disebut eksosom. Mereka membawa berbagai protein, mRNA, dan mikroRNA, yang semuanya secara fungsional dapat memodifikasi sel penerima yang berinteraksi dengan eksosom. Eksosom muncul sebagai mekanisme baru komunikasi sel ke sel dan memainkan peran penting dalam penyembuhan luka. (He *et al.*, 2019)



## 2.6. Kerangka Teori



## 2.7. Kerangka Konsep



Bagan 2. 1 Kerangka Konsep

## 2.8. Hipotesis

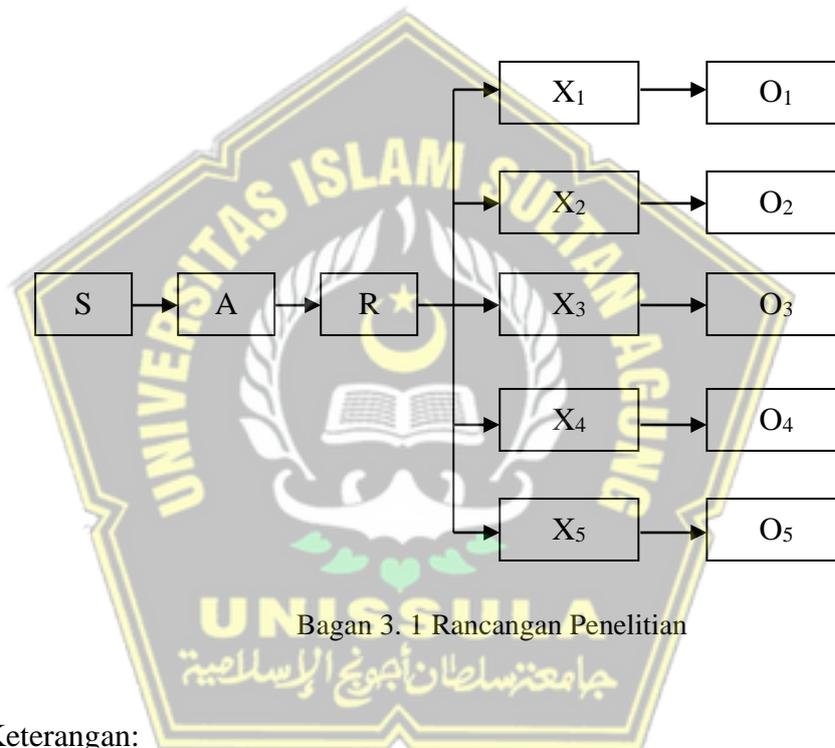
Terdapat pengaruh pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesechymal Stem Cell* terhadap ekspresi makrofag tipe 2 pada Tikus Wistar dengan model Luka Diabetik.



## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 1 kelompok sehat tanpa luka diabetik, 1 kelompok dengan perlakuan getamycin (kontrol positif), 1 kelompok dengan perlakuan base gel (kontrol negatif), 2 kelompok dengan intervensi.



Keterangan:

S = Subjek berupa tikus jantan galur wistar sehat

V = Validasi

R = Randomisasi

X1 = kelompok sehat tanpa luka diabetik

X2 = Kelompok kontrol negatif (tikus model luka diabetik diberikan base gel 200mg)

X3 = Kelompok Kontrol positif (tikus model luka diabetik dengan terapi getamycin 200mg)

X4 = Kelompok perlakuan 1 atau K1 (tikus model luka diabetik dengan

pemberian SH-MSD dosis 200  $\mu$ L dalam 200mg gel)

X5 = Kelompok perlakuan 2 atau K2 (tikus model luka diabetik dengan pemberian SH-MSD dosis 400  $\mu$ L dalam 200mg)

O = Observasi

## 2.2 Variable dan Definisi Operasional

### 2.2.1 Variable

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel SH-MSDs

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Jumlah makrofag Tipe 2

### 2.2.2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara ukur	Satuan	Skala
Gel SH-MSDs	merupakan gel yang mengandung molekul bioaktif yang diekresikan MSCs. Diperoleh dari Lab SCCR yang diberikan secara topikal pada area luka diabetik 1x/hari	Flowcytometry	ml	Rasio
Eksresi CD 163	Merupakan penanda pada permukaan sel makrofag yang diaktifkan secara alternatif yang memiliki sifat pro regeneratif	PCR	%	Rasio

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

## 2.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

### 2.3.1 Subjek Penelitian

Tikus galur wistar jantan berumur 2-3 bulan dengan berat 200-250 g dipilih oleh dokter hewan di Animal House SCCR Semarang sebagai subjek penelitian yang sesuai.

### 2.3.2 Sampel Penelitian

#### A. Kriteria Inklusi :

1. Tikus jantan galur *Wistar* sehat yang bergerak aktif
2. Tikus berumur 2-3 bulan
3. Berat badan tikus 200-250 gram
4. Tikus kondisi luka diabetikum yang diinduksi streptozotosin yang divalidasi dengan pemeriksaan gula darah > 200 mg
5. Tidak ada kelainan anatomis

#### B. Kriteria Eklusi

1. Tikus sakit atau mati pasca masa adaptasi
2. Memiliki kelainan anatomis (memiliki kecatatan)
3. Sudah pernah digunakan pada penelitian sebelumnya

#### C. Kriteria *drop out*

1. Tikus mati selama penelitian.
2. Tikus hilang selama proses penelitian

### 2.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan cara *randomized sampling* yaitu subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan eklusi di pilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok

### 2.3.4 Besar Sampel

Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus federer yang berjumlah 5 kelompok, sebagai berikut:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 5$$

Keterangan:

n = Jumlah sampel

t = Jumlah kelompok/perlakuan

Sehingga Jumlah sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini 5 ekor tikus jantan galur wistar pada setiap kelompok dan ditambahkan 3 ekor untuk menghindari kemungkinan lost of follow, maka total tikus yang dibutuhkan 40 ekor tikus yang selanjutnya akan dibagi dalam 5 kelompok perlakuan secara acak.

## 2.4 Alat dan Bahan Penelitian

### 2.4.1 Alat

Penelitian ini melibatkan peralatan sebagai alat kultur sel yang terdiri dari biosafety cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO<sub>2</sub>, dissecting kit, dan flask 75T. Menggunakan hypoxic chamber agar kondisi kultur hipoksia diperoleh. Dalam hypoxic chamber, kadar oksigen diukur dengan meteran oksigen. Alat untuk induksi DM adalah beaker glass, pengaduk, spuit 1 cc, neraca dan handscoon, gluco test easy touch. Alat untuk luka incisi pada tikus adalah punch incisi, spuit 1 cc, stemple cetakan luka 2x2 cm, pinset, gunting bedah, handscoon dan tempat fiksasi. Selain itu, penelitian ini juga menggunakan steril swab untuk mengoleskan gel SH-MSCs.

### 2.4.2 Bahan

Tali pusat tikus, Dinitrophenyl-bovine serum albumin (DNP-BSA), aluminium hydroxide gel (Al(OH)), 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB), acetone 0,9% NaCl minyak zaitun, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan

penstrep merupakan bahan yang digunakan dalam penelitian ini. Selain itu, streptozotocin, buffer sitrat, water-based gel (Carbopol-980, Propanol, Glycerin, Distilled Water), ketamine, dan xylazine sebagai bahan perlakuan.

## **2.5 Cara Penelitian**

### **2.5.1 Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord**

Seluruh proses dilakukan dalam biosafety cabinet class 2, dengan menggunakan alat yang sudah di steril dan dikerjakan dengan prosedur sterilitas yang tinggi.

1. Tali pusat dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam wadah steril yang berisi NaCl 0,9%.
2. Gunakan pinset untuk memasukkan tali pusat ke dalam cawan petri, dicuci sampai bersih dengan PBS.
3. Tali pusat dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darahnya diangkat.
4. Tali pusat diratakan dan diletakkan rata pada wadah 75T dan dibiarkan selama 3 menit hingga jaringan menempel pada permukaan wadah.
5. Media lengkap yang terdiri dari DMEM, Fungisizon, penstrep dan FBS ditambahkan perlahan sampai menutupi jaringan
6. Kultur diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>
7. Sel akan muncul kira-kira 14 hari setelah kultur dimulai
8. Penggantian media dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara menghilangkan separuh media dan menggantinya dengan media lengkap yang baru
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%

### **2.5.2 Proses Hipoksia**

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan dengan medium komplet hingga 10ml
2. Memasukan ke dalam hypoxic chamber, flask yang telah berisi MSC

3. Menyalurkan gas nitrogen melalui katup inlet dan *oxygen meter* ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan disaring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SH-MSC yang selanjutnya dicampurkan dengan gel untuk disesuaikan dengan kebutuhan kelompok K1 dan K2

### **2.5.3 Pembuatan Sediaan Gel**

1. Pembuatan sediaan gel SH-MSC dilakukan dengan cara mencampurkan SH-MSC dengan gel sehingga mempunyai kandungan SH-MSC dengan dosis 200  $\mu\text{L}$  (K1) dan 400  $\mu\text{L}$  secretome (K2).
2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah pengamatan mikroskop.

### **2.5.4 Pembuatan Tikus Model Luka Diabetikum**

1. Tikus yang telah diadaptasi selama 1 minggu, lalu selama 8-12 jam dipuasakan. kemudian di injeksikan streptozotocin secara intraperitoneal dengan menggunakan dosis 65 mg/kgbb, yang telah dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,0. Kemudian dilakukan pengujian kadar gula darah pada hari ke-7 setelah induksi, tikus dengan konsentrasi gula darah  $>200$  mg/dl dapat dinyatakan diabetes.
2. Satu bulan setelah injeksi Streptozotosin, rambut pada punggung tikus dicukur hingga bersih.
3. Dengan menggunakan steril dan aseptik, dilakukan punch insisi pada Punggung belakang, berbentuk bulat dengan diameter 6 mm dan kedalam 2 mm menggunakan alat punch insisi disposable. Kemudian luka ditutup dengan biofilm selama 5 hari.

### 2.5.5 Perlakuan Pada Hewan Coba

Setelah terbentuk ulkus pada tikus model DMT-1 tikus diberikan gel topikal setiap hari selama 10 hari, yang mengandung gel SH- MSCs dosis 200  $\mu$ L dalam 200 mg gel dan dosis 400  $\mu$ L dalam 200 mg gel, tikus kontrol negatif diberikan perlakuan base gel 200mg, dan tikus kontrol positif diberikan perlakuan gentamycin 200mg.

### 2.5.6 Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke 11 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk fiksasi dalam formalin 10% selama 24 jam dan dalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

### 2.5.7 Ekstrasi RNA dan Sintesis Cdna

1. Sampel kulit sebanyak 50mg kemudian dimasukkan ke dalam tube berisi 1 $\mu$ L Trizol, kemudian dilakukan proses homogenisasi menggunakan ultrasonikator dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.
2. Sampel kemudian ditambahkan dengan 0.2 $\mu$ L kloroform dan diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu ruang.
3. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000xg selama 15 menit dengan suhu 4°C.
4. Sampel akan membentuk tiga lapis larutan, sisi bawah berwarna merah muda berisi protein, sisi tengah berwarna putih asap berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (aqueous phase).
5. Pisahkan aqueous phase di sisi atas ke tube yang berbeda.
6. Sampel aqueous phase kemudian ditambahkan 0.5 $\mu$ L isopropanol, kemudian diresuspensi, diinkubasi selama 10 menit dan

- disentrifugasi dengan kecepatan 12000xg pada suhu 4°C selama 10 menit.
7. Supernatant kemudian dibuang dan pellet ditambahkan dengan 1µL 75% ethanol lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7500 x g di suhu 4°C selama 5 menit.
  8. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan dengan 50µL *Nuclease-Free Water* (NFW).
  9. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan *udrop microplate reader*.
  10. Sampel RNA sebanyak 0,1µg dalam 1µL kemudian ditambahkan 5µL NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit menggunakan *thermal cyclers*.
  11. Sampel RNA kemudian ditambahkan 2µL 4x DN Master Mix dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit menggunakan *thermal cyclers*.
  12. Proses reverse transcription kemudian dilakukan dengan menambahkan 2µL 5x RT Master Mix dan diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit dan 98°C selama 5 menit menggunakan *thermal cyclers*.
  13. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20°C

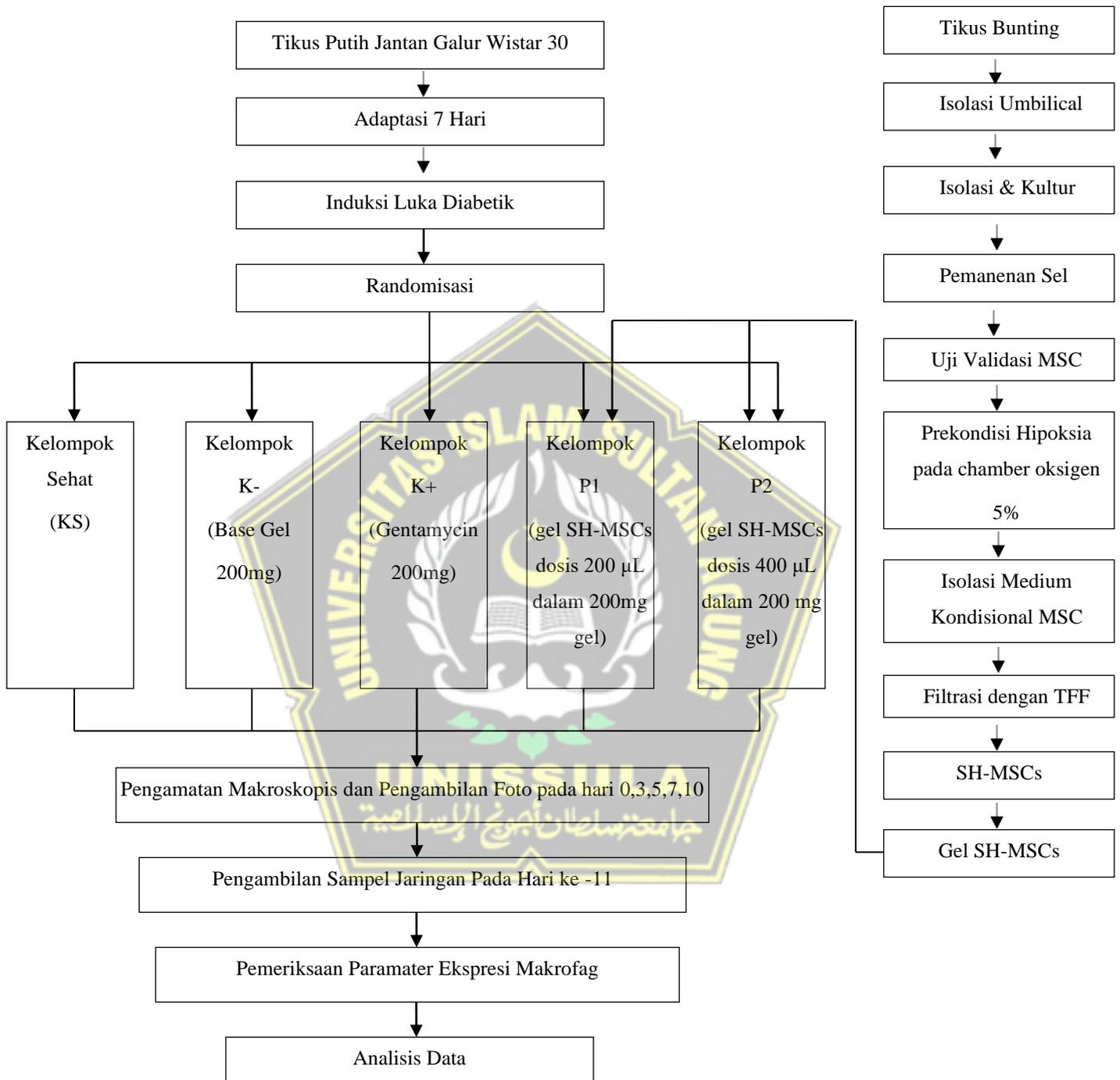
### **2.5.8 Pembacaan Ekspresi CD163 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR)**

1. Ekspresi gen dari CD163 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR).
2. Campuran dari 1µL cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No- ROX Mix sebanyak 10µL, forward primer 0,8µL, reverse primer 0,8µL dan NFW 7,4 µL.
3. Primer CD163 yang digunakan adalah F: 5'-TGG GAT CGC CGT GAC GCT TC -3' dan R: 5'- CAG CGA CTG CCT CCA CCG AC-3'. Primer Proses qRT-PCR dilakukan menggunakan suhu 95°C selama 2 menit, 95°C selama 5 detik dan 56°C selama 20 detik

- sebanyak 50 siklus. Proses qRT-PCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
4. Kuantifikasi data qRT-PCR dilakukan menggunakan Software EcoStudy.



## 2.6 Alur Penelitian



Bagan 3. 2 Alur Penelitian

## **2.7 Tempat dan Waktu Penelitian**

### **2.7.1 Tempat Penelitian**

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

### **2.7.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus – September 2024

## **2.8 Analisa Hasil**

Uji deskriptif akan dilakukan pada data yang diperoleh dari penelitian dengan menggunakan skala data rasio. Kemudian dilakukan uji Shapiro Wilk dan Levene's Test untuk menganalisis normalitas dan variasi data. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ), maka dilakukan uji beda One Way Anova. Jika terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji One Way Anova, maka dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi ( $p < 0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran dan varian data normal ( $p > 0,05$ ) dan tidak homogen ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji beda One Way Anova. Jika terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) setelah uji One Way Anova di semua kelompok penelitian, maka dilanjutkan menggunakan uji Post Hoc Tamhane. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Jika didapatkan sebaran data tidak normal ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji Kruskal Wallis. Jika terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) pada semua kelompok penelitian setelah uji Kruskal Wallis, maka dilanjutkan menggunakan uji Mann Whitney untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Aplikasi dekstop SPSS 27 digunakan pada pengolahan analisis data pada penelitian ini

## BAB III

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Hasil Penelitian

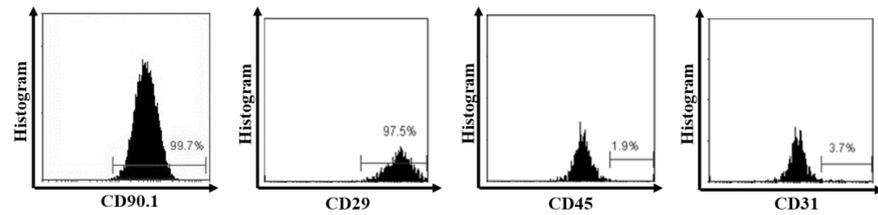
##### 3.1.1 Isolasi Secretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs)

Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang, dengan menggunakan *umbilical cord* yang berusia 21 hari. Setelah itu dilakukan kultur pada hasil isolasi pada medium khusus flask plastik. Kemudian hasil kultur MSCs setelah pasase 5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle like cell* pada pengamatan mikroskopis



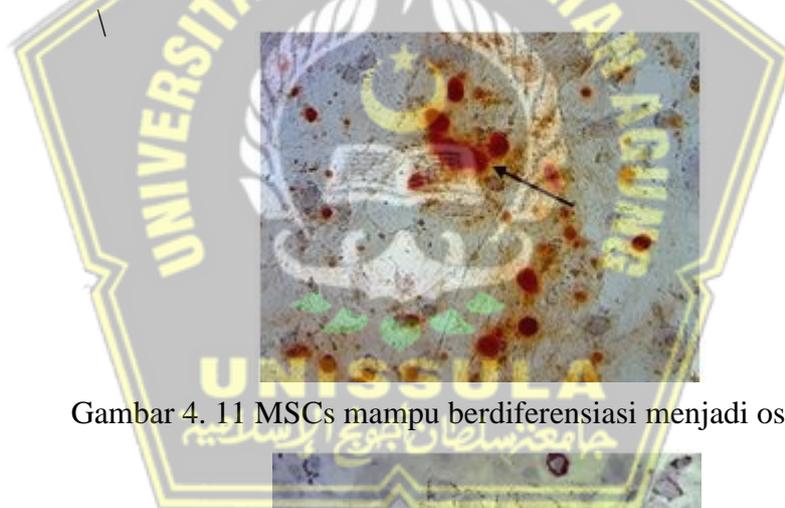
Gambar 4. 1 Isolasi MSCs (sel yang berbentuk spindle-like)

Hasil isolasi MSCs kemudian divalidasi dengan menggunakan alat flowcytometry yang dapat menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai surface marker khusus. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99,80%), CD29 (94,20%), dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%).

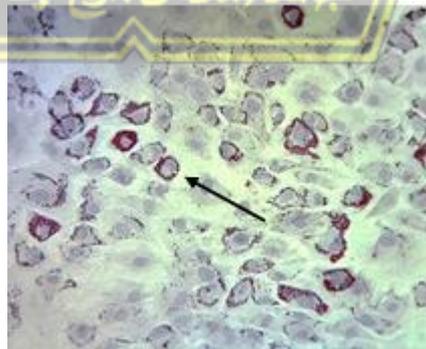


Gambar 4. 9 Analisis *Flowcytometry*, validasi MSCs

Pada penelitian ini MSCs juga dianalisis kemampuan dalam berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel matur. Kemudian dengan menggunakan medium khusus, MSCs dikultur agar dapat berdiferensiasi menjadi osteofit dan adiposit. Pada penelitian ini didapatkan bahwa MSCs dapat berdiferensiasi menjadi osteofit dan adiposit berdasarkan mikroskopisnya yaitu, terdapat deposit kalsium dan lemak berupagambaran berwarna merah pada pewarnaan *Alizarin Red*.



Gambar 4. 11 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit



Gambar 4. 20 MSCs mampu berdiferensiasi menjadi adiposit

Selanjutnya MSCs diinkubasi dengan menggunakan *chamber hypoxia* dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi (5% O<sub>2</sub>) selama 24 jam. Medium kultur MSCs yang mengandung SH-MSCs difiltrasi dengan menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF) berdasarkan *molecular weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50kDa yang mengandung *Interleukin 10* (IL-10) dan *Transforming Growth Factor β* (TGF-β).

### 3.1.2 Hasil Validasi Diabetes

Tikus yang telah diadaptasi selama 1 minggu, lalu selama 8-12 jam dipuaskan. kemudian di injeksikan streptozotocin secara intraperitoneal dengan menggunakan dosis 65 mg/kgbb, yang telah dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,0. Kemudian dilakukan pengujian kadar gula darah pada hari ke-7 setelah induksi, dan didapatkan data sebagaimana ditampilkkan di tabel 4.1 didapatkan bahwa tikus yang telah diinjeksi STZ memiliki kadar gula darah yang tinggi sehingga tervalidasi mengalami diabetes.

Gula Darah Tikus Tanpa Injeksi STZ	Gula Darah Tikus dengan Injeksi STZ
120 ± 5.9 mg/dL	238 ± 11.6 mg/dL

Tabel 4. 1 Hasil Validasi Gula Darah Setelah Diberikan Injeksi STZ

Tikus yang telah tervalidasi diabetes kemudian diberikan luka di bagian punggung dengan metode *punch insisi* lalu diberikan dengan biofilm selama 5 hari. Setelah tikus mengalami diabetes dan luka, kemudian tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu KS (kelompok tikus sehat), K- (kelompok tikus dengan perlakuan base gel 200 mg), K+ (kelompok tikus dengan perlakuan gentamycin 200 mg), P1 (kelompok dengan perlakuan gel SH-MSCs dosis 200 μL dalam 200mg gel), P2 (kelompok dengan perlakuan gel SH-MSCs dosis 400 μL dalam 200mg gel). Setelah 11 hari setelah perlakuan, tikus diambil sampel jaringan di area luka dan dianalisis ekspresi makrofag (CD 163).

### 3.1.3 Hasil Analisis CD 163

Pada penelitian ini sampel jaringan luka tikus di ukur menggunakan qRT- PCR dan dilihat dari *marker* Makrofag M2 yaitu CD 163. Data yang didapat dianalisis menggunakan Uji normalitas *Shapiro Wilk* untuk mengetahui kenormalan distribusi data dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* dapat dilihat pada tabel 4.2. Hasil analisis menunjukkan bahwa distribusi data ekspresi CD163 pada kelima kelompok tersebut adalah normal ( $p>0,05$ ). Uji homogenitas varian data menggunakan uji *Levene* menunjukkan bahwa ekspresi makrofag CD163 pada kelima kelompok bersifat Homogen ( $P>0,05$ ).

Berdasarkan hasil analisis data tes normalitas dan homogenitas untuk ekspresi CD163 normal, analisis data dilanjutkan menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antar kelompok ( $p<0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi CD163.

Variabel	Kelompok					
	SH	K-	K+	P1	P2	P
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Value
<b>CD 163</b>	1.0640	0.2220	0.3000	0.7120	0.9620	
Std. Deviasi	0.42430	0.08319	0.15232	0.33848	0.47945	
Shapiro Wilk						>0,05
Lavene Test						>0,05
One Way Anova						<0,05

Tabel 4. 2 Hasil Ekspresi CD 163 pada Seluruh Kelompok Penelitian

Hasil Analisa data menggunakan *One Way Anova* ekspresi CD 163 yang signifikan maka data dianalisis lanjut dengan uji *Post Hoc LSD* agar dapat menentukan perbandingan kelompok dengan signifikansi  $p<0,05$ . Hasil dari analisis *Post Hoc Lsd* pada data CD163.

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
SH	K-	0.001
	K+	0.002
	P1	0.110
	P2	0.633
K-	K+	0.715
	P1	0.031
	P2	0.002
K+	P1	0.065
	P2	0.005
P1	P2	0.249

Tabel 4. 3 Uji Perbandingan Signifikansi 2 Kelompok Menggunakan Uji Post Hoc LSD

Berdasarkan hasil analisis Post hoc data ekspresi CD163 menunjukkan bahwa kelompok P1 dan P2, SH dan P2, SH dan P2, K+ dan P2 tidak berbeda secara signifikan ( $P > 0,05$ ) hal ini menunjukkan kelompok diatas memiliki ekspresi CD163 yang sama atau hamper sama. Sedangkan untuk kelompok K- dan P1, K- dan P2, K+ dan P2 berbeda secara signifikan ( $P < 0,05$ ) hal ini menunjukkan kelompok diatas memiliki ekspresi CD163 yang secara signifikan berbeda. Berdasarkan hasil analisis diatas, didapatkan bahwa tidak terdapat pola *dose dependent manner* pada ekspresi CD 163 yang menunjukkan bahwa dosis SH-MSCs yang lebih tinggi (400  $\mu$ L) tidak meningkatkan ekspresi CD163 dibandingkan dosis yang lebih rendah (200 $\mu$ L).

### 3.2 Pembahasan

Diabetes Melitus (DM) adalah salah satu penyakit metabolik paling umum yang dicirikan dengan gula darah yang tinggi hasil dari penurunan produksi insulin atau aktivitas dari insulin. Orang yang menderita diabetes memiliki resiko mengembangkan macam-macam penyakit serius yang dapat membahayakan nyawa sehingga dapat mengakibatkan meningkatnya

biaya perawatan, penurunan kualitas hidup dan meningkatnya angka kematian (Holt and Flyvbjerg, 2023). Pasien diabetes dapat mengalami luka yang ditandai dengan gangguan penyembuhan, inflamasi yang berkepanjangan, dan penurunan kemampuan epitelisasi. Pada 15% penderita T2DM timbul luka yang terlokalisasi di ekstremitas bawah dan dapat berubah menjadi ulkus yang disebut ulkus kaki diabetik (DFU). DFU mewakili bentuk luka diabetes paling parah yang dapat menyebabkan amputasi ekstremitas bawah, bahkan kematian. Faktanya 84 persen amputasi yang terjadi pada ekstremitas bawah disebabkan oleh DFU (Bar-Meir, Mendes and Winkler, 2006).

Dalam keadaan normal, proses penyembuhan luka terdiri dari 4 fase yang berlangsung dan tumpang tindih, termasuk hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling (Arumugam, Looi and Kuppusamy, 2021). Pada awal fase inflamasi, neutrofil adalah jenis sel utama dari luka dermal. Mereka menggunakan peptida antimikroba (seperti LL37), spesies oksigen reaktif (ROS), dan perangkap ekstraseluler neutrofil (NET). Selain itu, neutrofil mengeluarkan kemokin untuk menarik monosit. Monosit yang telah datang akan menjadi makrofag kemudian menjadi tipe sel yang dominan dalam fase inflamasi dan sangat penting dalam mengatur inflamasi ini. Awalnya makrofag bersifat pro-inflamasi atau disebut M1, menghasilkan sitokin seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\beta$ , IL-12. Selanjutnya tipe lain makrofag anti-inflamasi atau disebut M2 yang berfungsi untuk pebaikan luka normal menjadi dominan seiring waktu untuk memicu fase proliferasi (Wolf, Melvin and Gallagher, 2021). Luka diabetes menunjukkan kadar M1 yang berlebihan pada tahap awal namun menunjukkan defisiensi M2 pada tahap proliferasi selanjutnya, hal ini menunjukkan bahwa perubahan aktivasi makrofag dapat berkontribusi terhadap penurunan kemampuan penyembuhan luka diabetes. Strategi untuk membalikkan aktivasi abnormal ini dapat digunakan untuk meningkatkan penyembuhan luka. Oleh karena itu, mendorong migrasi makrofag, fagositosis, dan polarisasi M2 sangat penting untuk mengatur lingkungan mikro imun luka dan mempercepat penyembuhan luka. (Wu *et*

*al.*, 2022)

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dampak pemberian Gel SH-MSCs dengan dosis 200 $\mu$ L dan 400 $\mu$ L terhadap ekspresi CD163 pada luka diabetik tikus putih galur wistar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi CD163 serta pada masing masing dosis gel SH-MSCs berhasil meningkatkan ekspresi CD163. Hasil lain menunjukkan bahwa kelompok sehat memiliki perbedaan jumlah ekspresi CD163 secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) dan kontrol positif (K+). Hasil lain menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan jumlah ekspresi CD163 secara signifikan jika dibandingkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2). Hasil lainnya menunjukkan bahwa aplikasi gel SH-MSCs dengan kedua dosis tersebut memiliki kemampuan yang lebih baik dan signifikan dalam meningkatkan ekspresi CD163 apabila dibandingkan dengan base gel. Namun pemberian gel SH-MSCs dengan dosis 200  $\mu$ L memiliki kemampuan yang lebih baik dalam meningkatkan ekspresi CD163 namun tidak signifikan, sedangkan pemberian SH-MSCs dengan dosis 400  $\mu$ L memiliki kemampuan yang lebih baik dan signifikan. Selain itu, penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs kadar 200  $\mu$ L tidak jauh berbeda dengan dosis yang lebih tinggi (400  $\mu$ L)

. Hal tersebut disebabkan oleh kandungan sitokin anti-inflamasi berupa IL-10, IL-13, atau TGF  $\beta$  yang terdapat pada SH-MSCs. Hal ini sejalan dengan konsep plastisitas makrofag saat ini dimana fenotip anti inflamasi dibentuk dalam keadaan atau dalam pengaruh lingkungan anti inflamasi, sebaliknya juga fenotip pro inflamasi dibentuk dalam keadaan atau dalam pengaruh lingkungan pro inflamasi. Seperti yang disebutkan diatas, faktor proinflamasi, seperti LPS dan IFN, memprogram fenotipe M1 untuk meningkatkan produksi sitokin proinflamasi. Sitokin ini menggeser fenotipe makrofag lebih jauh ke arah M1. Akibatnya, mekanisme umpan balik positif proinflamasi terbentuk, yang memungkinkan pemrograman cepat fenotipe M1 antimikroba dan

antitumor. Demikian pula, sitokin antiinflamasi, seperti IL-10, IL-13, atau TGF- $\beta$ , memprogram fenotip M2, yang kemudian secara intensif menghasilkan lebih banyak sitokin antiinflamasi. Sitokin ini menggeser fenotipe makrofag lebih jauh ke arah tipe M2, sehingga kembali membentuk mekanisme umpan balik positif anti-inflamasi, yang memungkinkan pemrograman cepat fenotipe M2 (Malyshev and Malyshev, 2015). IL-10 merupakan salah satu sitokin anti-inflamasi yang diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk sel T, monosit, dan makrofag. IL-10 memiliki kemampuan untuk mengaktifkan fungsi makrofag/monosit dan menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi (King *et al.*, 2014). IL-10 dapat mengaktifkan M2 sebagai respon terhadap luka yang bertindak untuk mempercepat penyembuhan luka dengan meredam inflamasi dan menstimulasi pembentukan matriks ekstraseluler yang baru (Steen *et al.*, 2020)

Dalam kasus luka inflamasi kronis, termasuk luka diabetes, beberapa jalur pensinyalan inflamasi bekerja sama untuk mengatur keadaan polarisasi makrofag. Jalur ini meliputi jalur pensinyalan interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )/reseptor IFN- $\gamma$ , jalur pensinyalan Toll-like receptor 4 (TLR4)/faktor nuklir  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), dan jalur pensinyalan JAK-STAT. Di antara semuanya, jalur pensinyalan JAK-STAT memainkan peran penting dalam menyeimbangkan polarisasi makrofag. Memodulasi jalur ini dapat dicapai melalui sifat mekanik bahan dan sifat kimia obat, yang berfungsi sebagai metode utama intervensi (Mao *et al.*, 2024).

IL-4, IL-10, IL-13 memprogram ulang makrofag menjadi fenotipe M2 melalui jalur pensinyalan JAK/STAT. Pengikatan IL-4 dengan reseptornya mengaktifkan JAK. Namun, selanjutnya, berbeda dengan IFN- $\gamma$ , fosforilasi dan aktivasi faktor transkripsi gen fenotipe M2, terjadi melalui STAT3 dan STAT6. Selain itu, IL-4 menginduksi ekspresi c-Myc, yang meningkatkan ekspresi gen fenotipe M2, seperti *Scarb1* dan *Mrc1*, dan aktivitas STAT6 dan PPAR- $\gamma$ . Pengikatan IL-13 dengan reseptornya mengaktifkan kinase JAK1, JAK2, dan Tyk2 setelah aktivasi dari STAT1, STAT3, dan STAT6. Setelah itu, STAT3 dan STAT6 mengaktifkan

ekspresi gen fenotipe M2, seperti reseptor mannanosa, Fizz1, Ym1, dan sitokin antiinflamasi. Pengikatan IL-10 dengan reseptornya melalui aktivasi JAK1 dan STAT3 menginduksi ekspresi gen fenotip M2, seperti TGF- $\beta$  dan IL-10, serta gen yang menghambat produksi sitokin M1, seperti TNF- $\alpha$ . Selain itu, IL-10 menstimulasi relokasi p50/p50 ke dalam nukleus, dimana dia memblokir dari ekspresi gen proinflamasi (Malyshev and Malyshev, 2015)

Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim (2022) menunjukkan bahwa sekretom BM-MSCs dapat mempercepat penyembuhan luka dalam hal penurunan inflamasi, peningkatan vaskularisasi, pembentukan dan peningkatan jaringan granulasi, deposisi kolagen, dan beberapa ekspresi gen faktor trofik (Ibrahim et al., 2022). Penelitian lainnya yang menggunakan *systematic review* dan *meta-analysis* yang dilakukan oleh Suhandi (2025) menunjukkan bahwa penggunaan sekretom sel punca berpotensi sebagai strategi terapi baru untuk penyembuhan luka diabetes (Suhandi et al., 2025).

Terdapat beberapa keterbatasan penelitian ini yang pertama adalah pada penelitian ini hanya menggunakan satu *marker* sehingga tidak menjelaskan secara detail kemungkinan molekuler yang terlibat dalam penyembuhan luka diabetik. Kedua penelitian ini hanya menganalisis ekspresi CD163 hanya pada hari ke 11, sehingga tidak mengetahui pada hari ke berapa ekspresi CD163 tertinggi. Ketiga pada penelitian ini yaitu tidak dilakukannya variasi waktu pemberian SH-MSCs pada kelompok tikus model luka diabetik untuk mengetahui potensi penyembuhan yang lebih optimal.

## **BAB IV**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **4.1 Kesimpulan**

1. Pemberian gel SH-MSCs berpengaruh signifikan terhadap ekspresi CD 163 pada tikus putih jantan galur Wistar model luka diabetik
2. Pemberian gel SH-MSCs terhadap ekspresi CD 163 pada dosis 200  $\mu$ L dalam 200 mg meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif, namun tidak meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol positif.
3. Pemberian gel SH-MSCs terhadap ekspresi CD 163 pada dosis 400  $\mu$ L dalam 200 mg meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif dan positif

#### **4.2 Saran**

1. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut terkait ekspresi CD 163 setelah dilakukan pemberian SH-MSCs pada kelompok tikus model luka diabetik
2. Penelitian selanjutnya dapat melihat hubungan SH-MSCs terhadap biomarker anti-inflamasi yang lain seperti jumlah kadar IL-10, TGF $\beta$ , Treg.
3. Perlu dilakukan variasi waktu pemberian SH-MSCs pada kelompok tikus model luka diabetik untuk mengetahui potensi penyembuhan yang lebih optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahangar, P., Mills, S. J. and Cowin, A. J. (2020) ‘Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), pp. 1–15. doi: 10.3390/ijms21197038.
- Arrighi, N. (2018) ‘Definition and Classification of Stem Cells’, *Stem Cells*, pp. 1–45. doi: 10.1016/b978-1-78548-254-0.50001-x.
- Arumugam, B., Looi, M. L. and Kuppusamy, U. R. (2021) ‘A review of diabetic wound models—Novel insights into diabetic foot ulcer’, (May). doi: 10.1002/term.3246.
- Association, A. D. (2013) ‘Diagnosis and classification of diabetes mellitus’, *Diabetes care*, 36(Supplement\_1), pp. S67–S74.
- Avogaro, A. and Fadini, G. P. (2019) ‘Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists’, *International Journal of Cardiology*, 291, pp. 29–35. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.02.030.
- Bar-Meir, E., Mendes, D. and Winkler, E. (2006) ‘Skin substitutes’, *Israel Medical Association Journal*, 8(3), pp. 188–191. doi: 10.5005/jp/books/11396\_16.
- Bhutani, S. and Vishwanath, G. (2012) ‘Hyperbaric oxygen and wound healing’, *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(02), pp. 316–324.
- Burgess, J. L. *et al.* (2021) ‘Diabetic Wound-Healing Science’.
- Chen, W. and Chen, K. (2021) ‘Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predict Mortality in Patients with Diabetic Foot Ulcers Undergoing Amputations’, pp. 821–829.
- Dannhauser, D. *et al.* (2022) ‘Single cell classification of macrophage subtypes by label-free cell signatures and machine learning’, *Royal Society Open Science*,

9(9). doi: 10.1098/rsos.220270.

Diabetes, D. O. F. (2010) 'Diagnosis and classification of diabetes mellitus', *Diabetes Care*, 33(SUPPL. 1). doi: 10.2337/dc10-S062.

Dias, I. *et al.* (2021) 'Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes', *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 2(November), p. 100069. doi: 10.1016/j.crphar.2021.100069.

Fujiwara, N. and Kobayashi, K. (2005) 'Macrophages in inflammation', *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 4(3), pp. 281–286. doi: 10.2174/1568010054022024.

Hamra, N. F. *et al.* (2021) 'Hypoxia mesenchymal stem cells accelerate wound closure improvement by controlling  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in the full-thickness animal model', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9, pp. 35–41. doi: 10.3889/oamjms.2021.5537.

He, X. *et al.* (2019) 'MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing', 2019. doi: 10.1155/2019/7132708.

Holt, R. I. G. and Flyvbjerg, A. (2023) *Textbook of diabetes*. John Wiley & Sons.  
*IDF Diabetes Atlas IDF Diabetes Atlas* (2021).

Jude, E. B., Eleftheriadou, I. and Tentolouris, N. (2010) 'Peripheral arterial disease in diabetes - A review', *Diabetic Medicine*, 27(1), pp. 4–14. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02866.x.

Kalra, K. and Tomar, P. C. (2014) 'Stem Cell: Basics, Classification and Applications', *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7), pp. 919–930.

King, A. *et al.* (2014) 'Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10',

- Advances in Wound Care*, 3(4), pp. 315–323. doi: 10.1089/wound.2013.0461.
- Kuninaka, Y. *et al.* (2022) ‘Macrophage polarity and wound age determination’, *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-022-24577-9.
- Lendeckel, U., Venz, S. and Wolke, C. (2022) ‘Macrophages: shapes and functions.’, *Chemtexts*, 8(2), p. 12. doi: 10.1007/s40828-022-00163-4.
- Ma, H. *et al.* (2021) ‘Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (Admscs) and admsc-derived secretome expedited wound healing in a rodent model – a preliminary study’, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 14, pp. 753–764. doi: 10.2147/CCID.S298105.
- Mahmoudvand, G. *et al.* (2023) ‘Mesenchymal stem cell therapy for non-healing diabetic foot ulcer infection: New insight’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, p. 1158484.
- Malyshev, I. and Malyshev, Y. (2015) ‘Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage “switch” phenotype’, *BioMed Research International*, 2015. doi: 10.1155/2015/341308.
- Mao, J. *et al.* (2024) ‘Balancing macrophage polarization via stem cell-derived apoptotic bodies for diabetic wound healing’, *Med*, 5(2), pp. 148-168.e8. doi: 10.1016/j.medj.2024.01.006.
- Md Fadilah, N. I. *et al.* (2022) ‘Cell secretomes for wound healing and tissue regeneration: Next generation acellular based tissue engineered products’, *Journal of Tissue Engineering*, 13. doi: 10.1177/20417314221114273.
- Morey, M. *et al.* (2019) ‘Hyperglycemia acts in synergy with hypoxia to maintain the pro-inflammatory phenotype of macrophages’, *PLoS ONE*, 14(8), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0220577.
- Murphy, M. *et al.* (2012) ‘Mesenchymal stem cells in regenerative medicine’, *Biomedical and Health Research*, pp. 51–61. doi: 10.3233/978-1-61499-076-

5-51.

Okonkwo, U. A. and Dipietro, L. A. (2017) 'Diabetes and wound angiogenesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), pp. 1–15. doi: 10.3390/ijms18071419.

Oliver, T. I. and Mutluoglu, M. (2019) 'Diabetic foot ulcer'.

Samsu, N. (2021) 'Review Article Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment', 2021.

Sazli, B. *et al.* (2023) 'Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease', *Medical Archives*, 77(2), p. 90. doi: 10.5455/medarh.2023.77.90-96.

Steen, E. H. *et al.* (2020) 'The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis', *Advances in Wound Care*, 9(4), pp. 184–198. doi: 10.1089/wound.2019.1032.

Suhandi, C. *et al.* (2025) 'The Effect of Stem Cell Secretome on the Improvement of Diabetic Wound Recovery: A Systematic Review and Meta-Analysis of In Vivo Studies', *Current Therapeutic Research*, p. 100778. doi: 10.1016/j.curtheres.2025.100778.

Vikatmaa, P. *et al.* (2008) 'Negative Pressure Wound Therapy: a Systematic Review on Effectiveness and Safety', *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 36(4), pp. 438–448. doi: 10.1016/j.ejvs.2008.06.010.

Volmer-thole, M. and Lobmann, R. (2016) 'Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome'. doi: 10.3390/ijms17060917.

Wang, Y. *et al.* (2021) 'Clinical application of mesenchymal stem cells in rheumatic diseases', *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s13287-021-02635-9.

Wolf, S. J., Melvin, W. J. and Gallagher, K. (2021) 'Macrophage-mediated

- inflammation in diabetic wound repair’, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 119(December 2020), pp. 111–118. doi: 10.1016/j.semcd.2021.06.013.
- Wu, X. *et al.* (2022) ‘Macrophage polarization in diabetic wound healing’, *Burns and Trauma*, 10. doi: 10.1093/burnst/tkac051.
- Yash Sahebrao Chaudhari *et al.* (2023) ‘Diabetes Mellitus: A Review’, *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology*, 3(3), pp. 16–22. doi: 10.48175/ijarsct-8551.
- Yunna, C. *et al.* (2020) ‘Macrophage M1/M2 polarization’, *European Journal of Pharmacology*, 877(March), p. 173090. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- Yustianingsih, V., Sumarawati, T. and Putra, A. (2019) ‘Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells’, *Universa Medicina*, 38(3), pp. 164–171. doi: 10.18051/univmed.2019.v38.164-171.
- Zheng, Y., Ley, S. H. and Hu, F. B. (2018) ‘Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications’, *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), pp. 88–98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151.

