

**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELL* (SH-MSCS) TERHADAP EKSPRESI IL-6  
(STUDI IN VIVO PADA TIKUS WISTAR MODEL LUKA DIABETIC)**

**Skripsi**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun Oleh :

Dhaffa Renanda Pramudya

30102100061

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG**

**2025**

**SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL*  
*STEM CELL (SH-MSCS)* TERHADAP EKSPRESI IL-6  
Studi In Vivo Pada Tikus Wistar Model Luka Diabetic**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

**Dhaffa Renanda Pramudya**

**30102100061**

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

**Susunan Tim Penguji**

Pembimbing I

Anggota Tim Penguji

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

  
Dr. dr. Chodidjah, M.Kes

Pembimbing II

  
Dr. dr. Eko Setiawan, Sp. B FINACS

  
Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes

Semarang, 18 Februari 2025

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan



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

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : **Dhaffa Renanda Pramudya**

NIM : **30102100061**

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA*  
*MESENCHYMAL STEM CELL* (SH-MSCS) TERHADAP EKSPRESI IL-6  
(STUDI IN VIVO PADA TIKUS WISTAR MODEL LUKA DIABETIC)”**

Adalah benar hasil karya saya dan 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, 18 Februari 2025



Dhaffa Renanda Pramudya

## PRAKATA

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

*Alhamdulillahirrabbilamin*, puji syukur kehadiran Allah SWT atas semua anugerah dan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL (SH-MSCS)* TERHADAP EKSPRESI IL-6 (STUDI IN VIVO PADA TIKUS WISTAR MODEL LUKA DIABETIC)”** ini dapat terselesaikan.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan banyak terima kasih kepada:

1. DR.dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF.,S.H., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med dan Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B,FINACS selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Skripsi ini.
3. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes dan dr. Hadi Sarosa, M.Kes. selaku dosen penguji yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Skripsi ini.

4. Kepada Bapak Iswanto selaku bapak penulis dan Ibu Uli Fatun yang telah memberikan kasih sayang, fasilitas, dukungan dan doa yang tiada henti selama penyusunan Skripsi ini.
5. Kepada Aurel dan Elvira selaku adik penulis yang selalu memberi dukungan dan membantu dalam proses perkuliahan ini.
6. Kepada Shah Sema Amukti selaku sahabat dan orang yang selalu memberikan dukungan semangat, fasilitas dan doa selama penyusunan Skripsi ini.
7. Kepada orang terdekat penulis Neva Callysta Tanaya Sullivan yang telah memberikan semangat, doa dan dukungannya selama penyusunan skripsi ini

Sebagai akhir kata dari penulis, penulis hanya bisa berharap semoga Skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

*Wassalamu 'alaikum Wr. Wb*

Semarang, 18 Februari 2025

Dhaffa Renanda Pramudya

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
SURAT PERNYATAAN .....	ii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan umum.....	5
1.3.2 Tujuan khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat teoritis.....	5
1.4.2 Manfaat praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Luka .....	7
2.1.1. Definisi Luka .....	7
2.1.2. Klasifikasi Luka .....	8
2.1.3. Fase Penyembuhan Luka .....	10
2.1.4. Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka .....	13
2.1.5. Luka Diabetik.....	18
2.2. Interleukin 6 (IL-6) .....	22
2.2.1. Definisi IL-6 .....	22
2.2.2. Mekanisme aktivasi IL-6.....	23
2.2.3. Mekanisme IL-6 pad penyembuhan luka .....	24
2.3. <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC) .....	25
2.3.1. Definisi .....	25
2.3.2. Secretome MSC.....	27
2.4. Pengaruh Pemberian Gel <i>Secretome Hypoxia Mesechymal Stem Cell</i> (SH-MSC) terhadap Ekpresi IL-6 pada Luka Diabetik.....	28

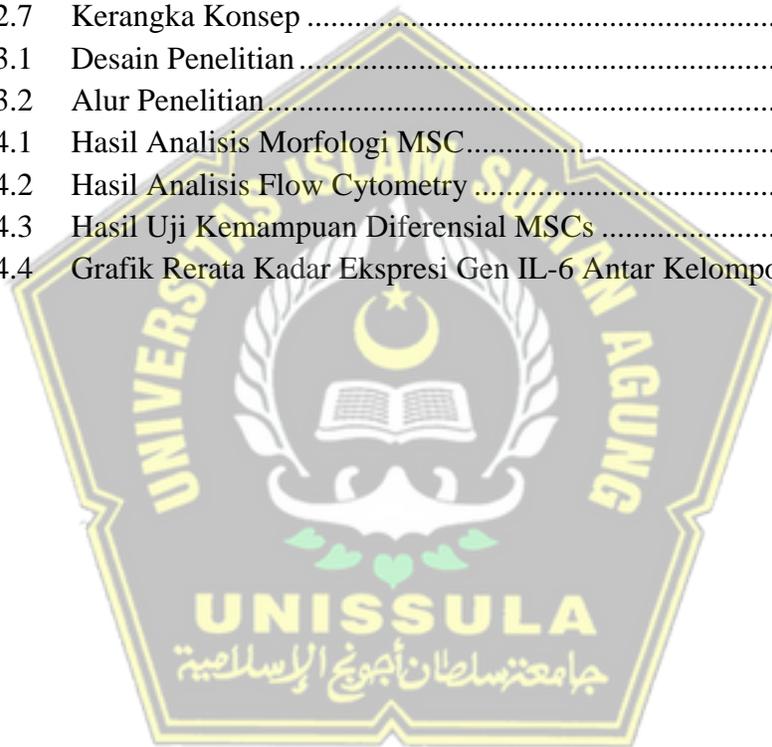
2.5. Kerangka Teori .....	<b>30</b>
2.6. Kerangka Konsep.....	<b>30</b>
2.7. Hipotesis .....	<b>31</b>
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....	<b>32</b>
3.2. Variabel dan Definisi Operasional.....	<b>33</b>
3.2.1. Variabel .....	33
3.2.2. Definisi operasional.....	33
3.3. Subjek Uji .....	<b>34</b>
3.3.1. Kriteria Inklusi : .....	35
3.3.2. Kriteria eksklusi.....	35
3.3.3. Kriteria Drop Out : .....	35
3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian .....	<b>35</b>
3.4.1. Instrumen.....	35
3.4.2. Bahan.....	36
3.5. Cara Penelitian .....	<b>37</b>
3.5.1. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord.....	37
3.5.2. Proses Hipoksia .....	38
3.5.3. Pembuatan Sediaan Gel.....	39
3.5.4. Induksi Tikus Model Luka Diabetik.....	39
3.5.5. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA.....	40
3.5.6. Validasi luka diabetik pemeriksaan makroskopis .....	42
3.5.7. Pembacaan Ekspresi Kadar IL-6 Metode RTq-PCR .....	42
3.6. Alur Penelitian .....	<b>44</b>
3.7. Tempat dan Waktu Penelitian.....	<b>45</b>
3.7.1. Tempat Penelitian.....	45
3.7.2. Waktu Penelitian .....	45
3.8. Analisa Hasil.....	<b>45</b>
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>46</b>
4.1. Hasil Penelitian .....	<b>46</b>
4.1.1. Isolasi Sekretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs).....	<b>46</b>

4.1.2. Hasil Validasi Diabetes.....	<b>49</b>
4.1.3. Pengaruh Pemberian Gel Sekretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs) Terhadap Ekspresi Gen IL-6.....	<b>50</b>
4.2. Pembahasan.....	<b>52</b>
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	<b>56</b>
5.1. Kesimpulan .....	<b>56</b>
5.2. Saran .....	<b>56</b>
DAFTAR PUSTAKA .....	<b>58</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Kebutuhan nutrisi dalam proses penyembuhan luka .....	23
Gambar 2.2	Mekanisme penyembuhan luka pada diabetes .....	24
Gambar 2.3	Signaling IL-6-STAT3 dalam sistem imun .....	31
Gambar 2.4	Hierarki sel punca.....	33
Gambar 2.5	Sekretom sel punca mesenkimal (MSC) dalam aplikasi klinis .....	33
Gambar 2.6	Kerangka Teori .....	33
Gambar 2.7	Kerangka Konsep .....	33
Gambar 3.1	Desain Penelitian .....	33
Gambar 3.2	Alur Penelitian .....	33
Gambar 4.1	Hasil Analisis Morfologi MSC.....	46
Gambar 4.2	Hasil Analisis Flow Cytometry .....	46
Gambar 4.3	Hasil Uji Kemampuan Diferensial MSCs .....	47
Gambar 4.4	Grafik Rerata Kadar Ekspresi Gen IL-6 Antar Kelompok .....	49



## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Validasi Gula Darah Tikus .....	48
Tabel 4.2	Hasil Uji Analisis .....	49
Tabel 4.2	Hasil Uji Post LSD .....	50



## INTISARI

Diabetes adalah kondisi medis kronis yang dapat menyebabkan komplikasi seperti ulkus diabetik, yang disebabkan oleh gangguan penyembuhan luka akibat ketidakseimbangan sitokin proinflamasi seperti IL-6. Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells (SH-MSC) telah menunjukkan potensi dalam pengobatan regeneratif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel SH-MSC terhadap ekspresi IL-6 dalam proses penyembuhan luka pada model tikus diabetik.

Penelitian eksperimental dengan rancangan *posttest only control group design* ini menggunakan 40 ekor tikus jantan wistar yang diinduksi STZ dengan dosis 65 mg/kgBB. Tikus dibagi lima kelompok (KS: tanpa luka diabetik; K- : luka diabetik+base gel; K+ : luka diabetik+gentamycin; P1: luka diabetik+ gel SH-MSCs 200 $\mu$ L/KgBB; P2 : luka diabetik+gel SH-MSC dosis 400 $\mu$ L/KgBB). Penilaian kadar ekspresi gen IL-6 diambil dari jaringan kulit luka diabetik dan diperiksa menggunakan metode qRT-PCR. Perbandingan kadar ekspresi IL-6 dianalisis menggunakan uji *one way anova* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc LSD*.

Hasil Penelitian ini didapatkan rerata kadar ekspresi IL-6 pada kelompok KS sebesar 1.156 $\pm$  0.646 $\mu$ L, K- sebesar 2.496  $\pm$  1.150 $\mu$ L, K+ sebesar 1.062  $\pm$  0.555 $\mu$ L, sedangkan pada P1 sebesar 0.890  $\pm$  0.392 $\mu$ L dan P2 sebesar 0.722  $\pm$  0.891 $\mu$ L. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan  $p < 0,001$ ; uji lanjutan dengan *Post Hoc LSD* didapatkan perbedaan ekspresi IL-6 antara K- dengan K+, sedangkan K- memiliki perbedaan dengan kelompok K+, P1 dan P2. tetapi tidak ada perbedaan antara P1 dengan P2 ( $p > 0,05$ ).

Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa Pemberian gel SH-MSCs berpengaruh signifikan terhadap ekspresi gen IL-6 pada tikus putih jantan galur Wistar model luka diabetik

**Kata kunci:** Gel Sekretom Hipoksia, Luka Diabetik, IL-6

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes adalah suatu kondisi medis kronis yang ditandai dengan hiperglikemia atau peningkatan kadar glukosa darah akibat ketidakmampuan tubuh memproduksi atau menggunakan insulin dengan baik, suatu hormon yang mengatur gula dalam darah. Terdapat dua tipe utama diabetes: diabetes tipe 1, yang diakibatkan oleh ketidakmampuan tubuh untuk memproduksi insulin, dan diabetes tipe 2, yang biasanya berkembang pada usia dewasa dan melibatkan resistensi insulin, sel-sel tubuh tidak dapat memproduksi insulin juga berespon efektif terhadap insulin (Cho *et al.*, 2018). Gangguan metabolik yang berhubungan dengan diabetes menyebabkan banyak komplikasi mulai dari gangguan kardiovaskular dan serebrovaskular hingga neuropati, retinopati, nefropati, dan waktu penyembuhan luka yang lama. Salah satu komplikasi yang terkait dengan diabetes adalah berkembangnya ulkus diabetik (Khamaisi dan Balanson, 2019). Ulkus diabetik adalah luka terbuka yang sering terjadi pada penderita diabetes, terutama pada bagian ekstremitas bawah. Insiden ulkus diabetik diperkirakan mencapai 19-34% dari total pasien diabetes di Inggris. (Armstrong *et al.*, 2021). Ulkus diabetik disebabkan oleh kombinasi beberapa faktor yang berhubungan dengan diabetes, termasuk gangguan sirkulasi darah, kerusakan saraf, hingga gangguan fungsi kekebalan tubuh (Jhamb *et al.*, 2019). Kerusakan saraf akibat diabetes dapat menurunkan sensasi di area yang terkena, membuat penderita sering kali tidak menyadari adanya cedera atau iritasi. Jika

tidak segera ditangani, cedera ini dapat berkembang menjadi ulkus diabetik. Selain itu, diabetes juga mengurangi aliran darah ke ekstremitas, sehingga proses penyembuhan luka pada ulkus diabetik menjadi lebih lambat dan berisiko semakin parah. (Hachisuka *et al.*, 2019). Selain itu, diabetes dapat melemahkan sistem kekebalan tubuh, sehingga menyulitkan tubuh untuk melawan infeksi dan menyembuhkan luka dan pada akhirnya harus dilakukan tindakan amputasi (Falanga, 2021). Penelitian meta analisis mengenai presentasi amputasi pada penderita ulkus diabetik memiliki prevalensi yang bervariasi seperti di negara Turki sebesar 37,11%; di negara Taiwan 42,88%; di negara India 28,4%; di negara Cina 21,54% (Mansoor and Modaweb, 2022).

Proses penyembuhan luka merupakan serangkaian peristiwa yang kompleks dan terkoordinasi yang melibatkan berbagai sel, protein, dan molekul pemberi sinyal yang bekerja sama memperbaiki jaringan yang rusak dimulai dengan hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling (Valero *et al.*, 2020). Protein yang berperan penting dalam penyembuhan luka adalah Interleukin 6 (IL-6) sitokin multifungsi, memainkan peran penting dalam regulasi kekebalan tubuh, peradangan, dan regenerasi jaringan. Interleukin 6 dalam konteks penyembuhan luka memiliki beberapa fungsi seperti berkontribusi terhadap respon inflamasi dengan merekrut sel-sel kekebalan ke lokasi cedera serta terlibat dalam aktivasi dan proliferasi fibroblas, yang penting untuk produksi kolagen dan perbaikan jaringan (Walter *et al.*, 2020). Penyembuhan luka pada ulkus diabetik berbeda dari luka akut biasa karena mengalami peradangan yang berkepanjangan. Kondisi ini ditandai dengan akumulasi neutrofil dan makrofag di dasar luka serta pelepasan

sitokin proinflamasi kronis, seperti interleukin-1 (IL-1), faktor nekrosis tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), dan protein reaktif C plasma. Selain itu, proliferasi bakteri juga berperan dalam menghambat proses penyembuhan (Kusnadi *et al.*, 2019). Ciri lain dari ulkus diabetik adalah keadaan hipoksia berkelanjutan yang berasal dari insufisiensi angiogenesis, dimana keadaan tersebut diperkuat oleh respon inflamasi yang terus menerus, sehingga mengakibatkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan proses penyembuhan yang tidak efektif (Deng *et al.*, 2021).

Terapi *secretome hypoxia-mesenchymal stem cells* (SH-MSC) telah muncul sebagai kandidat yang menjanjikan untuk pengobatan regeneratif karena sifat pemulihan jaringan dan mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Xu (2022) terapi SH-MSC dapat meningkatkan polarisasi makrofag anti-inflamasi dengan peningkatan kapasitas eferositosis dan dapat secara efektif meningkatkan penyembuhan pada luka. Kultur hipoksia berturut-turut tidak hanya dapat meningkatkan proliferasi SH-MSC dengan kualitas sel yang baik tetapi juga dapat meningkatkan imunomodulator dan terapeutik dari SH-MSC (Wang *et al.*, 2022). Pemberian SH-MSC pada penyakit yang memerlukan regenerasi jaringan dan modulasi sistem imun dapat meningkatkan mediator antiinflamasi seperti IL-10 tanpa mempengaruhi IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  sehingga dapat memperbaiki kondisi peradang atau inflamasi (Jahandideh *et al.*, 2018). Efek imunoregulasi dari SH-MSC dapat memberikan efek penurunan ekspresi NF-kB, TNF- $\alpha$ , dan peningkatan IL-10 sehingga memberikan pengaruh immunosupresi terhadap proses peradangan luka

(Sari *et al.*, 2023). Pendekatan ini bertujuan untuk memanfaatkan potensi regeneratif MSC untuk memodulasi respon inflamasi dan meningkatkan perbaikan jaringan khususnya dalam lingkungan mikro yang terganggu pada ulkus diabetikum. Hal Ini dapat terjadi karena dalam SH-MSC mengandung sejumlah besar growth factor, sitokin, dan berbagai makromolekul dan vesikel ekstraseluler termasuk mikrovesikel dan eksosom yang dapat merangsang berbagai reaksi biologis, terutama dalam modulasi berbagai formasi jaringan baru. Faktor-faktor ini memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel dan terlibat dalam berbagai proses fisiologis, termasuk transduksi sinyal untuk memberikan respons biologis untuk mempercepat penyembuhan luka (Wang *et al.*, 2020).

Berdasarkan potensi yang dimiliki oleh *secretome hypoxia-mesenchymal stem cells* sebagai agen terapi penyembuhan luka berat seperti ulkus diabetik maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian gel SH-MSC terhadap ekspresi IL-6 atau salah satu sitokin yang berperan aktif dalam proses penyembuhan luka dengan studi *in vivo* pada tikus model luka diabetik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi IL-6 pada tikus *Wistar* model luka diabetik?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan umum

Untuk membuktikan pengaruh pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi IL-6 pada tikus *Wistar* model luka diabetik.

#### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui ekspresi IL-6 pada tikus *Wistar* dengan model luka diabetik dengan pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 200  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$ .
2. Mengetahui ekspresi IL-6 pada tikus *Wistar* dengan model luka diabetik dengan pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) dosis 400  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$ .

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat teoritis

Memberikan sumbangan informasi bagi pengembangan penelitian mengenai pengaruh gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap penanganan luka diabetik

#### 1.4.2 Manfaat praktis

1. Penelitian ini memberikan informasi di bidang kesehatan sebagai referensi penelitian selanjutnya sebagai parameter yang berbeda sehingga memberikan manfaat kepada masyarakat.

2. Sebagai pedoman penelitian selanjutnya mengenai pengaruh pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs) terhadap ekspresi IL-6 pada luka diabetik



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Luka**

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

Luka merupakan kerusakan atau hilangnya sebagian jaringan tubuh yang disebabkan oleh adanya trauma benda tajam, tumpul, perubahan suhu, paparan zat kimia, sengatan listrik, maupun gigitan hewan. Luka merupakan hilangnya kontinuitas jaringan tubuh atau degradasi integritas jaringan epitel yang berakibat terhadap kerusakan fungsi perlindungan kulit yang dapat disebabkan oleh adanya cedera atau pembedahan (Sjamsuhidajat and De Jong, 2017).

Berdasarkan onset atau waktu luka dibedakan menjadi dua jenis, sebagai berikut (Wintoko and Yadika, 2020):

##### 1) Luka Akut

Luka akut adalah luka yang terjadi secara tiba-tiba yang diikuti dengan proses penyembuhan yang normal sesuai

dengan tahapan dan waktu penyembuhan, seperti contohnya luka sayatan, luka memar dan luka bakar.

##### 2) Luka Kronik

Luka kronik adalah luka yang dalam proses penyembuhan tidak normal atau gagal melewati tahapan dan waktu penyembuhan luka secara normal yang melibatkan integritas dan fungsi anatomi yang terganggu.

Penyembuhan yang membutuhkan waktu lama dan proses inflamasi yang terus-menerus, seperti contohnya ulkus diabetikum dan ulkus decubitus.

### 2.1.2. Klasifikasi Luka

Luka diklasifikasikan berdasarkan penyebabnya sebagai berikut (Payne-James and Jones, 2019):

#### 1) Luka Lecet

Merupakan luka yang mengenai lapisan epidermis kulit yang disebabkan oleh adanya gesekan benda permukaan kasar dengan lapisan kulit teratas.

#### 2) Luka Memar

Merupakan luka yang terjadi akibat cedera pada jaringan yang menyebabkan kerusakan kapiler darah sehingga merembes pada jaringan sekitarnya. Luka memar dapat disebabkan oleh benturan dengan benda tumpul.

#### 3) Luka Iris atau Insisi

Luka yang disebabkan oleh sayatan benda tajam seperti pisau atau silet yang sering dilakukan pada tindakan operasi pembedahan. Luka sayatan ditandai dengan kecenderungan tepi rata, bentuk lurus, tidak didapatkan memar dan tidak ada lecet.

#### 4) Luka Laserasi

Luka yang disebabkan oleh benturan keras dengan benda tumpul. Luka laserasi ditandai dengan tepi luka yang tidak braturan.

#### 5) Luka Tusuk

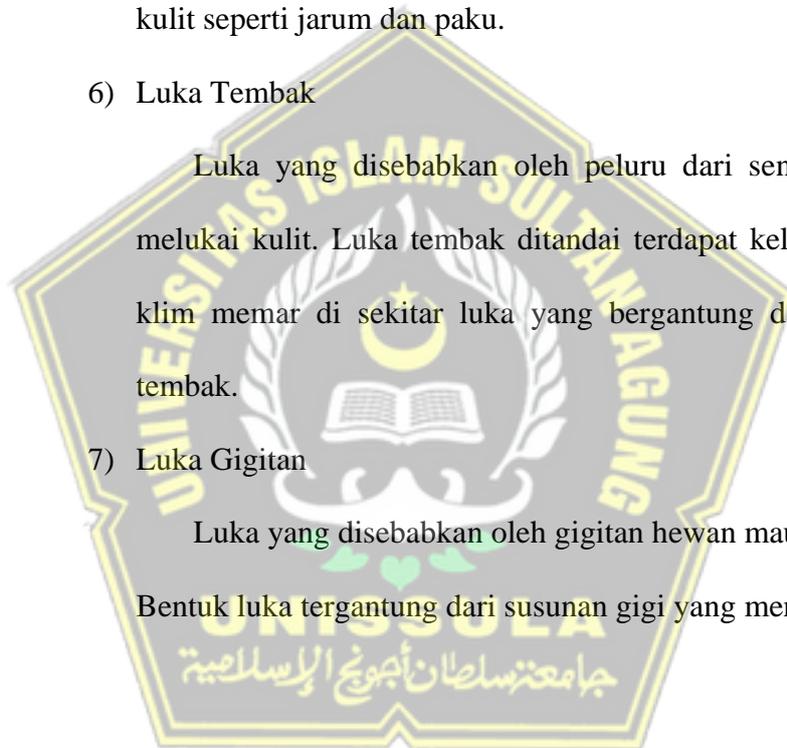
Luka yang disebabkan oleh benda runcing yang menusuk kulit seperti jarum dan paku.

#### 6) Luka Tembak

Luka yang disebabkan oleh peluru dari senjata api yang melukai kulit. Luka tembak ditandai terdapat kelim jelaga dan klim memar di sekitar luka yang bergantung dari jarak luka tembak.

#### 7) Luka Gigitan

Luka yang disebabkan oleh gigitan hewan maupun manusia. Bentuk luka tergantung dari susunan gigi yang mengigitnya.



### 2.1.3. Fase Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang memiliki tiga fase yang saling tumpang tindih yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi (remodeling). Tiga fase penyembuhan luka sebagai berikut (Wang *et al.*, 2018):

#### A. Fase Inflamasi

Pada fase inflamasi didapatkan 2 mekanisme yang terjadi yaitu inflamasi awal atau homeostatis dan inflamasi akhir.

##### 1) Fase Inflamasi Awal

Pada fase inflamasi awal atau homeostatis dimulai ketika terjadi kerusakan jaringan akibat cedera dan pembuluh darah terpotong dan berdarah. Respon tubuh akan mengaktifkan faktor kaskade pembekuan darah yang akan menyediakan penyumbatan bekuan darah fibrin sementara pada lokasi cedera melalui agregasi trombosit dan aktivasi faktor pembekuan endogen dan ekstrinsik, serta respon vasokonstriksi pembuluh darah. Respon sementara ini bertujuan untuk mencegah pendarahan lebih lanjut dan melindungi luka. Sumbatan fibrin akan membentuk matriks yang berfungsi sebagai struktur untuk proses penyembuhan luka lebih lanjut seperti migrasi leukosit, keratinosit, sel fibroblas, sel endotel dan berfungsi sebagai sumber dari faktor pertumbuhan. Vasodilatasi terjadi setelah respon

vasokonstriksi kurang lebih 5-10 menit awal terjadi cedera yang akan menimbulkan manifestasi klinis hiperemis dan edem pada area luka. Faktor sub-endotelium, kolagen dan jaringan yang terpapar karena cedera akan merangsang agregasi trombosit dan mengaktifkan degranulasi trombosit. Faktor kemotaksis dan faktor pertumbuhan akan dilepaskan menyelesaikan hemostatis dan memulai fase inflamasi.

## 2) Fase Inflamasi Akhir

Pada fase inflamasi akhir terjadi pengangkatan jaringan mati dan pencegahan kolonisasi dan infeksi oleh patogen mikroorganisme patogen. Netrofil direkrut menuju daerah luka dalam 24 jam pertama dan menetap hingga 2-5 hari/ (Wang *et al.*, 2018). Proses fagositosis yang dilanjutkan oleh makrofag. Sel-sel fagositik ini akan melepaskan *reactif oxygen species* (ROS) dan protease untuk membunuh bakteri patogen dan merusak jaringan nekrotik. Netrofil bertindak sebagai chemoattractant untuk sel-sel lain dan menambah respon inflamasi dengan melepaskan banyak sitokin proinflamasi. Makrofag tiba di daerah luka sekitar 3 hari setelah cedera. Terjadi pelepasan banyak faktor pertumbuhan, kemokin, sitokin yang mempromosikan

proliferasi sel dan sintesis molekul matriks ekstraseluler (ECM) (Sorg *et al.*, 2017).

## B. Fase Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung mulai hari ke-3 hingga 14 pasca cedera yang ditandai dengan pergantian sel rusak yang didominasi oleh platelet dan makrofag secara bertahap. Berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan memiliki peran dalam fase ini seperti transformasi keluarga faktor pertumbuhan-beta (TGF-beta, termasuk TGF-beta1, TGF-beta2, dan TGF-beta3), keluarga interleukin (IL) dan faktor angiogenesis. Sel yang paling dominan pada fase proliferasi ialah sel fibroblas dan sel endotel. Selama proliferasi sel, kebutuhan untuk suplai darah yang memadai terjadi. Oleh karena itu, respons angiogenik dimulai secara bersamaan. Respons ini terutama dirangsang oleh hipoksia lokal, faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGF), faktor pertumbuhan fibroblast-basis (bFGF) dan trombin protease serin. Pembuluh darah baru dibangun oleh 2 mekanisme yaitu angiogenesis dan vaskulogenesis (Reinke and Sorg, 2012).

Di sisi lain, epitelisasi juga dimulai setelah luka yang dirangsang oleh sitokin inflamasi dan faktor pertumbuhan yang berbeda. Keratinosit lokal yang ditemukan di tepi luka dan sel induk epitel di umbi folikel rambut dan kelenjar apokrin mengambil bagian

dalam epitelisasi (Gantwerker and Hom, 2011). Langkah terakhir dari fase proliferasi adalah pembentukan jaringan granulasi. Fibroblas bermigrasi ke lokasi luka dan berkembang biak di dalam luka. Kemudian mereka mulai mensintesis matriks sementara yang mengandung kolagen tipe III, glikosaminoglikan dan fibronektin. Jaringan granulasi terdiri dari fibroblas, granulosit, makrofag, kapiler, dan bundel kolagen yang terorganisir secara longgar (Demidova-Rice, Hamblin and Herman, 2012).

#### **2.1.4. Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka**

Terdapat 3 jenis faktor yang mempengaruhi terhadap penyembuhan luka yaitu faktor instrinsik, faktor ekstrinsik dan faktor iatrogenik (Palmer, 2022).

##### **A. Faktor Intrinsik**

Merupakan faktor yang tidak dapat diubah pada seseorang, akan tetapi dapat dikelola (Palmer, 2022). Sebagai berikut:

##### **1. Usia**

Bertambahnya usia akan membuat lapisan epidermis menjadi lebih tipis dan memiliki pergantian yang lebih lambat. Produksi serat elastin, serat kolagen dan asam hialuronat menurun seiring bertambahnya usia. Hal tersebut, akan membuat kulit menjadi lebih rentan terhadap paparan patogen maupun luka. Hormon pertumbuhan memainkan

peran penting dalam penyembuhan luka yang ikut menurun produksinya dengan adanya penambahan usia. Sehingga, fase penyembuhan luka akan semakin lambat dengan berkurangnya aliran darah ke dermis dan perlambatan kaskade penyembuhan luka yang kompleks (Palmer, 2022).

## 2. Hormon Seks

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa peningkatan hormon estrogen dan androgen akan mempercepat penyembuhan luka tergantung pada fase penyembuhan luka (4). Hal ini dapat dipertimbangkan terutama pada seseorang yang menggunakan hormon sintesis atau mengalami perubahan hormon seperti menopause pada wanita (Palmer, 2022).

## 3. Penyakit Kronis

- Diababetes

Kondisi hiperglikemia akan menghambat proses penyembuhan luka, sehingga perlu dilakukan pengendalian kadar gula darah normal yang memberikan efek menguntungkan terhadap penyembuhan luka. Berdasarkan penelitian Palmer, (2022) Pasien dengan HbA1C < 7,1 % atau kadar gula darah yang terkontrol akan meningkatkan waktu penyembuhan luka.

- Penyakit paru kronis

Akibat kondisi tersebut maka akan terjadi defisiensi oksigenasi jaringan yang akan mempengaruhi terhadap proses penyembuhan luka (Palmer, 2022).

- *Immunocompromised*

Kondisi immunocompromised akan mencegah terjadinya respon inflamasi yang diperlukan untuk memulai kaskade penyembuhan. Hal ini akan meningkatkan risiko infeksi, penurunan fungsi fagositosis dan penurunan aktivitas fibroblast (Palmer, 2022).

## B. Faktor Ekstrinsik

Merupakan faktor yang diluar dari proses penyembuhan luka yang dapat mempengaruhi secara langsung (Palmer, 2022).

### 1. Gizi

Status gizi memiliki fungsi yang krusial dalam penyembuhan luka karena ketersediaan makro dan mikronutrien sangat penting dalam proses fisiologis penyembuhan luka. Contohnya air yang diperkirakan kebutuhannya meningkat sekitar 20-30% diatas orang normal pada kondisi penyembuhan luka (Palmer, 2022).

List of key nutrients required for wound healing
<p><b>Most important nutrients include:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Water</li> <li>• Carbohydrates</li> <li>• Protein, particularly protein building-blocks such as the amino acids arginine and glutamine</li> <li>• Vitamin A</li> <li>• Vitamin C</li> <li>• Vitamin D</li> <li>• Zinc</li> </ul>
<p><b>Other nutrients needed for optimal healing include:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamin E</li> <li>• Magnesium</li> <li>• Manganese</li> <li>• Copper</li> <li>• Omega-3 fatty acids</li> </ul>

Gambar 2. 1 Kebutuhan Nutrisi dalam Proses Penyembuhan Luka

## 2. Keadaan Stres dan peningkatan kadar kortisol

Berdasarkan penelitian oleh Wang *et al.*, (2023) membandingkan tingkat penyembuhan luka biopsi pada sekelompok mahasiswa kedokteran gigi, didapatkan bahwa rata-rata tiga hari lebih lama waktu penyembuhan luka ketika dalam tekanan ujian dibandingkan dengan sedang liburan. Hal tersebut menunjukkan waktu penyembuhan luka 40% lebih lama pada seseorang yang mengalami stress dengan orang non stress.

## 3. Merokok

Dampak buruk dari kebiasaan merokok ialah hipoksia, iskemia jaringan, peradangan pada pembuluh darah dan mengganggu setiap fase penyembuhan luka. Telah terbukti

bahwa merokok satu batang dapat mengurangi konsentrasi oksigen menuju ke jaringan yang berakibat terhambatnya fase penyembuhan luka (Palmer, 2022).

#### 4. Infeksi

Infeksi oleh patogen seperti bakteri dan jamur dapat menghambat terhadap proses penyembuhan luka. Infeksi dapat mengakibatkan area luka semakin lebar dan produksi hasil metabolisme dari infeksi seperti toxin dan sitokin proinflamasi akan menghambat dan melemahkan jaringan kulit, serta respon peradangan seperti penurunan produksi kolagen, nutrisi yang tersedia untuk penyembuhan menurun, terjadi kematian terhadap sel-sel penting untuk proses penyembuhan luka (Palmer, 2022).

#### C. Faktor Iatrogenik

Merupakan faktor yang memiliki pengaruh terhadap proses penyembuhan luka terhadap intervensi (Palmer, 2022). Sebagai berikut:

##### 1. Debridemen

Debridemen yang berlebihan terhadap area luka dapat memberikan efek yang merugikan karena dapat membatasi terhadap proses penyembuhan luka. Sehingga debridemen dilakukan untuk mengangkat jaringan nekrotik dan biofilm

yang bertujuan untuk memperbaiki proses penyembuhan luka (Palmer, 2022).

## 2. Manajemen edema melalui penentuan posisi

Luka kronis sering dikaitkan dengan edema terutama pada ulkus. Sehingga posisi elevasi kaki harus lebih tinggi dari jantung dan dikombinasikan dengan latihan pompa betis. Jika pasien tidak dapat mentolerir atau melakukan posisi tersebut, maka dapat mengangkat kaki ke arah distal dari pinggul (Palmer, 2022).

## 3. Trauma lokal

Tekanan eksternal pada area jaringan luka dapat menurunkan aliran kapiler yang berakibat terhadap oksigenasi jaringan. Gaya gesek dapat mengakibatkan kerusakan jaringan yang menyebabkan pembentukan luka dan mengganggu proses penyembuhan luka seperti menggosok, menggaruk, gerakan berlebih pada area luka (Palmer, 2022).

### 2.1.5. Luka Diabetik

Luka diabetik atau ulkus diabetik merupakan salah satu komplikasi mikrovaskular yang mempengaruhi kualitas hidup penderita diabetes melitus. Luka diabetik dapat dicegah karena faktor pemicu terseringnya ialah trauma ringan yang berkembang menjadi ulkus diabetikum. Pasien

diabetes melitus tipe 1 dan 2 memiliki risiko komplikasi mikrovaskular seperti ulkus diabetikum sebesar 25% (55).

Kejadian ulkus diabetikum di Indonesia memiliki prevalensi sebesar 12% dan pasien diabetes melitus dengan risiko ulkus diabetikum sebesar 55,4% (Detty *et al.*, 2020). Kasus ulkus diabetikum merupakan kasus yang sering ditemui di Rumah Sakit. Angka kematian akibat ulkus diabetikum sebesar 17-23% dengan tingkat risiko amputasi sebesar 15-30%. Faktor yang mempengaruhi terhadap kejadian ulkus diabetikum ialah usia, tempat tinggal, pekerjaan, pendidikan, pendapatan, lama menderita, perawatan kaki, obesitas, neuropati perifer, riwayat ulkus sebelumnya, DM tipe 2 dan kontrol glikemik (Saputra *et al.*, 2023).

Ulkus diabetikum merupakan penyakit yang disebabkan oleh multifaktorial dengan lebih dari 60% insiden disebabkan oleh adanya neuropati. Kondisi hiperglikemia akan meningkatkan produksi enzim *sorbitol reductase* dan *sorbitol dehydrogenase* yang akan mengubah glukosa menjadi fruktosa dan sorbitol. Akumulasi glukosa, sintesis myoinositol pada saraf akan mengganggu penghantaran konduksi sehingga mengakibatkan terjadinya neuropati. Neuropati dapat berupa sensorik, motorik dan autonomik yang mengakibatkan perubahan pada kulit dan otot sehingga meningkatkan risiko terjadinya ulkus. Keadaan hiperglikemia memicu kerusakan pada sel endotel dan abnormalitas pada sel otot pada arteri perifer. Disfungsi endotel tersebut dapat mengakibatkan perubahan proliferasi sel, penebalan membran basalis dan

penurunan sintesis nitrit oksida, penurunan aliran darah dan meningkatkan viskositas darah. Hal tersebut akan memicu terjadinya aterosklerosis dan vasokonstriksi pembuluh darah yang berakibat terjadinya iskemia (Wechsler *et al.*, 2021).

Terdapat beberapa tahapan terbentuknya ulkus diabetikum yang berdasarkan dari 7<sup>th</sup> *Practical Diabetes International Foot Conference*, sebagai berikut:

Tahap 1 : kaki normal tanpa faktor risiko

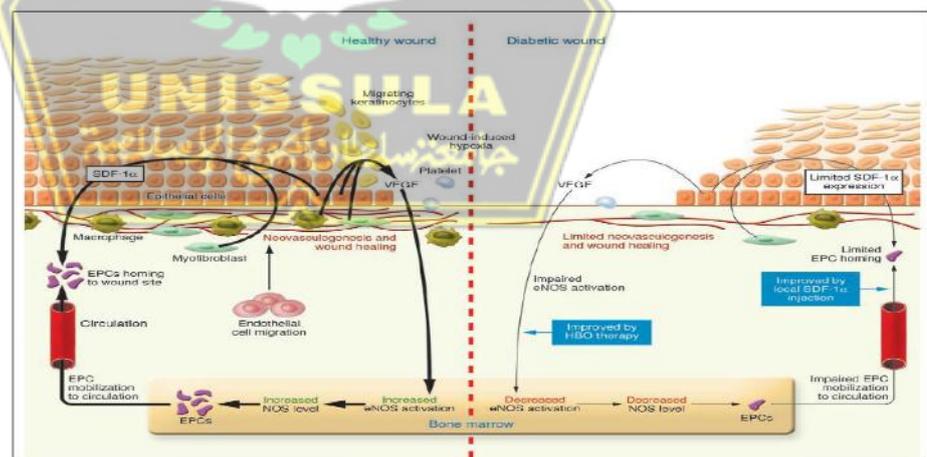
Tahap 2 : kaki berisiko tinggi

Tahap 3 : ulserasi kaki

Tahap 4 : kaki selulit

Tahap 5 : kaki nekrotik

Tahap 6 : kaki harus diamputasi



Gambar 2. 2 Mekanisme penyembuhan luka pada diabetes

Kondisi Hiperglikemia dan peningkatan produksi *Advanced Glycation of Ends product* (AGEs) akan menyebabkan hipoksia dan

stress oksidatif yang berakibat penurunan perfusi jaringan dan inhibisi angiogenesis, sehingga meningkatkan respon akut inflamasi dan produksi *reactive oxygen species* (ROS), disregulasi imun sel T, kerusakan leukosit kemotaksis, fagositosis, kemampuan bakterisidal, disfungsi fibroblas dan sel epidermal. Selain itu, terjadi penurunan produksi faktor pertumbuhan, angiogenesis, deposisi kolagen, kerusakan barrier epidermal, granulasi jaringan, migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas, remodeling oleh *matrix metaloproteinases* (MMPs) dan *extracellular matriks* (ECM) (Zheng *et al.*, 2021). Proses tahapan penyembuhan luka pada pasien dengan diabetes mellitus cenderung memiliki waktu yang lebih lama, hal ini dikarenakan (Al-Rawaf, Gabr and Alghadir, 2019):

1. Fase inflamasi yang memanjang

Adanya peningkatan kadar sitokin proinflamasi pada luka kronik yang lebih tinggi hingga 100 kali dibandingkan pada luka akut. Hal ini disebabkan oleh adanya infeksi patogen berupa bakteri dan jaringan nekrosis pada luka kronik.

2. Degradasi pada jaringan kolagen.

3. Penurunan faktor pertumbuhan seperti VEGF

VEGF berperan dalam penyembuhan luka melalui proses angiogenesis dan epitelisasi jaringan. Pada kondisi diabetes akan terjadi kerusakan *signaling pathway* ikatan VEGF

dengan reseptor, ekspresi VEGF diatur melalui hipoksia, sitokin, diferensiasi dan transformasi.

4. Peningkatan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan endotel pembuluh darah
5. Gangguan penutupan area luka akibat perubahan struktural keratinosit
6. Penurunan kontraksi luka yang mengakibatkan luka menjadi sukar menutup.

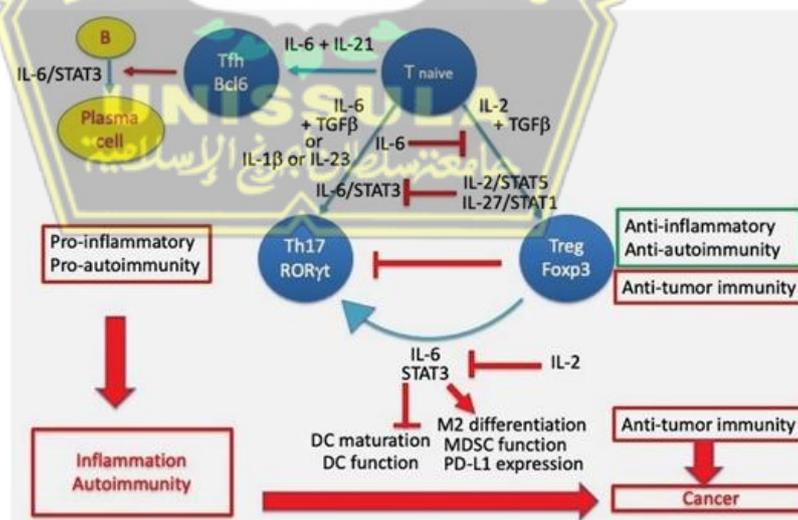
## 2.2. Interleukin 6 (IL-6)

### 2.2.1. Definisi IL-6

Interleukin 6 (IL-6) adalah sitokin proinflamasi yang mengatur berbagai situasi respon inflamasi, diproduksi pada lesi menular dan mengaktifkan sinyal peringatan ke jaringan tubuh lainnya. Penanda spesifik patogen eksogen, yang disebut pola molekuler, ditemukan pada lesi yang terinfeksi oleh *Pattern recognition receptor* (PRR) sel imun seperti inti monosit dan makrofag. *Toll-like receptors* (TLR), reseptor DNA, reseptor doamine oligomerisasi pengikat nukleotida, dan reseptor gen 1 yang diinduksi asam inoat. merangsang berbagai jalur sinyal seperti NFkB, TNF-a, IL-1b. IL-1b akan merangsang faktor transkripsi yang merangsang pembentukan IL-6 (Yustianingsih, Sumarawati and Putra, 2019).

### 2.2.2. Mekanisme aktivasi IL-6

IL-6 merupakan faktor yang menginduksi produksi imunoglobulin pada sel B. IL-6 akan mempromosikan produksi antibodi pada sel plasma dan secara tidak langsung mempromosikan diferensiasi sel CD4 dan sel T yang bergantung pada BCL6 bersama dengan IL-21. STAT3 juga diperlukan untuk diferensiasi sel plasma dengan meregulasi *up-regulating* BLIMP1 dan *down-regulating* BCL6. Seorang yang kehilangan fungsi STAT3 akan memiliki gangguan respon antibodi spesifik terhadap antigen. Aktivitas STAT3 diinduksi oleh IL-6 yang memiliki peran penting dalam sistem kekebalan tubuh. Peran IL-6 selain pada sel Tfh diketahui mempromosikan diferensiasi sel T helper tipe-2 melalui IL-4, sementara itu menghambat diferensiasi Sel Th1 sebagai penghasil IFN (Solís-Martínez *et al.*, 2018).



Gambar 2. 3 Signaling IL-6-STAT3 dalam sistem imun

IL-6 mempromosikan produksi antibodi dengan baik langsung bertindak pada sel plasma atau secara tidak langsung mempromosikan

diferensiasi sel T<sub>fh</sub>. IL-6 / STAT3 bersama dengan TGF $\beta$  atau IL-1 $\beta$  dan IL-23 menginduksi sel T<sub>h</sub>17, sedangkan IL-6 menghambat generasi sel T<sub>reg</sub> yang diinduksi TGF $\beta$  / IL-2. IL-2 / STAT5 atau IL-27 / STAT1 menghambat diferensiasi sel T<sub>h</sub>17 yang diinduksi IL-6 / STAT3. IL-6 / STAT3 menginduksi konversi sel T<sub>reg</sub> menjadi sel T<sub>h</sub>17, dan proses ini dihambat oleh IL-2. Sumbu IL-6 / TGF $\beta$  dan IL-2 / TGF $\beta$  mengatur keseimbangan sel T<sub>h</sub>17 dan T<sub>reg</sub>; Yang pertama adalah pro-inflamasi dan yang terakhir anti-inflamasi. IL-6 / STAT3 menginduksi diferensiasi makrofag M2 dan mengaktifkan MDSC, yang keduanya memiliki efek kekebalan anti-tumor. Selain itu, IL-6 / STAT3 menghambat pematangan dan fungsi DC. Akhirnya, IL-6/STAT3 menginduksi ekspresi PD-L1 (Hirano, 2021).

### 2.2.3. Mekanisme IL-6 pad penyembuhan luka

Peran IL-6 dalam penyembuhan luka kulit tidak dapat diabaikan, respon inflamasi penting dalam proses penutupan luka, terganggunya jalur sinyal IL-6 dapat memperlambat penyembuhan luka. Manifestasi utama IL-6 pada luka adalah makrofag M1, dan peningkatan rasio M1:M2, seperti yang diamati pada orang lanjut usia dan obesitas, dapat menghambat penyembuhan luka karena sinyal inflamasi kronis. Sebaliknya, IL-6 melakukan kontrol terhadap polarisasi M2 melalui peningkatan IL-4R pada makrofag dan sekresi IL-4 oleh limfosit Th2, dan makrofag M2. Ini adalah sekretor penting dari sitokin proliferasi TGF- $\beta$  dan VEGF. Loop umpan balik IL-6/TGF- $\beta$  telah terlibat dalam

patogenesis beberapa kondisi kulit fibrotik, karena mekanisme loop autokrin aktif dari fibroblas, didukung oleh IL-17A untuk meningkatkan proliferasi, deposisi kolagen, dan diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, yang kontrak. Biarkan tepi luka menyatu (Johnson *et al.*, 2020).

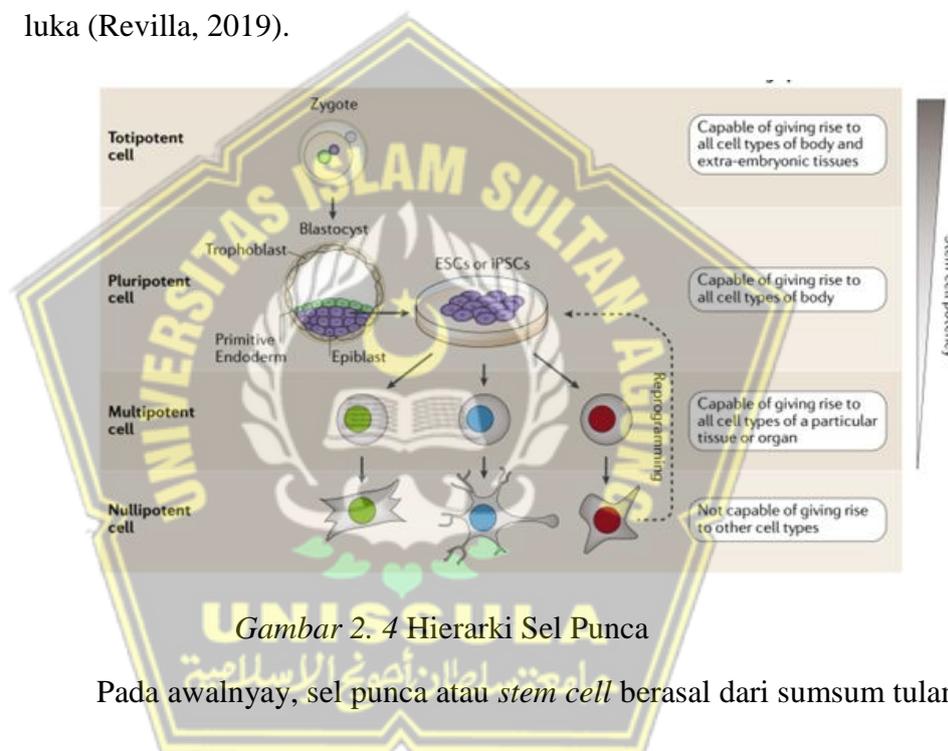
Stimulasi oleh IL-6 meningkatkan kelangsungan hidup myofibroblast, dan paparan berlebihan merupakan ciri dari beberapa penyakit fibrotik kulit. Ekspresi VEGF oleh endotel jaringan, keratinosit, fibroblas, dan makrofag sebagai respons terhadap IL-6 berkontribusi terhadap penyakit fibrotik yang bergantung pada hipervaskularisasi (Johnson *et al.*, 2020).

### 2.3. Mesenchymal Stem Cell (MSC)

#### 2.3.1. Definisi

*Stem cell* atau sel punca merupakan sel yang memiliki kemampuan untuk memperbarui diri (*self-renewal*), tidak terspesialisasi (*unspecialized*), menunjukkan trans diferensiasi/plastisitas, dan dapat diisolasi serta dikolesi untuk kepentingan terapi (transplantasi/implantasi) (Wojciech Z *et al.*, 2019). Sel punca mesenkimal dapat didapatkan dari organ target (adiposa, synovium, dll), sumsum tulang (*bone marrow derived stem cell*), atau plasenta. Sel punca mesenkimal merupakan *stem cell* yang bersifat multipotent pregenitor dan memiliki tingkat proliferasi dan diferensiasi yang tinggi (Kareem, Aijaz and Jeschke, 2021).

Penelitian oleh Weng *et al.*, (2020) Memaparkan bahwa sel punca mesenkimal dapat meregenerasi jaringan adneksa kulit, biomaterial *scaffolds*, faktor bioaktif dan stimulasi faktor pertumbuhan. Salah satu faktor pertumbuhan ialah *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang dapat mempercepat pertumbuhan kembali folikel rambut dengan meninduksi vaskularisasi perifolikular, serta mempercepat penyembuhan luka (Revilla, 2019).



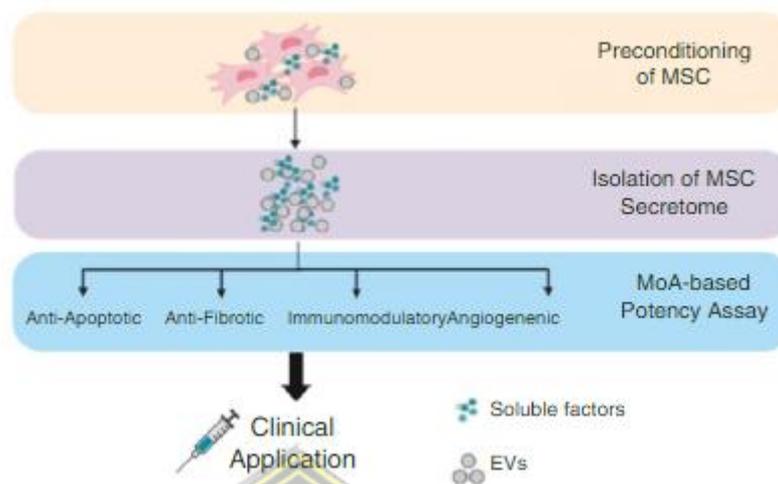
Gambar 2. 4 Hierarki Sel Punca

Pada awalnya, sel punca atau *stem cell* berasal dari sumsum tulang (*bone marrow derived stem cell*) diduga hanya berupa sel punca hematopoietik (*hematopoietic stem cells/HSC*). Seiring perkembangan ilmu kedokteran sel punca di sumsum tulang kini ditemukan HSC, *Endothelial progenitor cells* (EPC), dan sel punca mesenkimal (*Mesenchymal stem cells/MSC*). Sesuai dengan namanya bahwa HSC dapat berdiferensiasi menjadi berbagai lini sel darah, sedangkan untuk

MSC mampu berdiferensiasi menjadi lemak, tulang dan kartilago (De Luca *et al.*, 2019).

### 2.3.2. Secretome MSC

Sekretom *mesenchymal stem cell* terdiri dari beberapa faktor terlarut seperti sitokin, faktor pertumbuhan, kemokin, molekul imunomodulator, organel sel dan asam nukleat (Rendra, Scaccia and Biebac, 2020). Faktor-faktor tersebut dapat memodulasi sistem imun, menghambat apoptosis sel dan fibrosis, merangsang pembentukan vaskulerisasi atau proangiogenesis, dan mendorong remodeling jaringan. Penggunaan sekretom MSC secara *in vitro* dengan hipoksia, kultur 3D atau faktor terlarut seperti *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) atau *Transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ), *Trigger Akt*, ERK dan p38MAPK *signaling pathways*. Pada jalur tersebut, dapat menginduksi produksi molekul sitoprotektif (katalase, *heme oxygenase-1*), pro-regeneratif (*fibroblast growth factor*, *hepatocyte growth factor*, *insuline like growth factor-1*) dan pro-angiogenesis (*vascular endothelial growth factor* atau VEGF), serta imunomodulataor (IDO, PGE2, IL-6) (Noronha *et al.*, 2019).



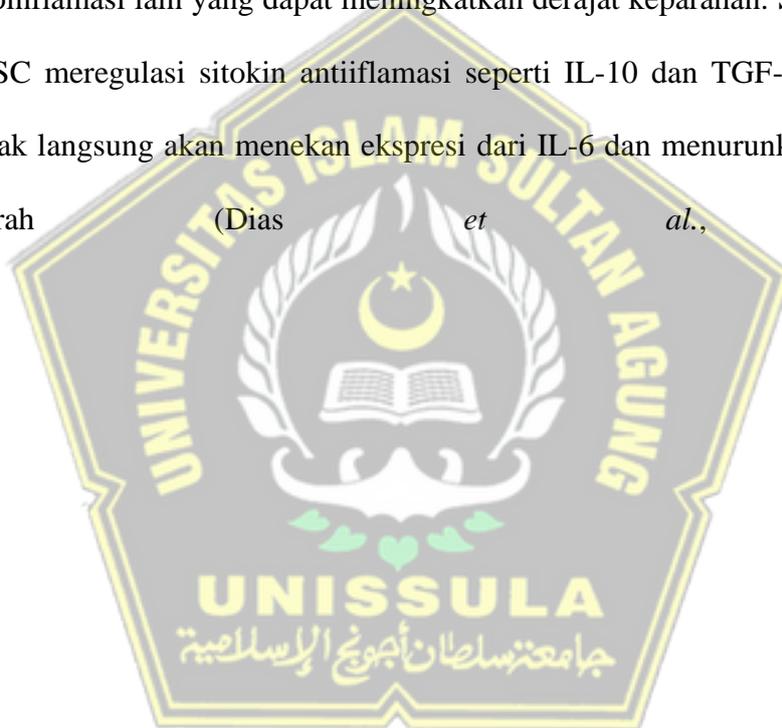
Gambar 2. 5 Sekretom Sel Punca Mesenkimal (MSC) dalam aplikasi Klinis

#### 2.4. Pengaruh Pemberian Gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSC) terhadap Ekspresi IL-6 pada Luka Diabetik

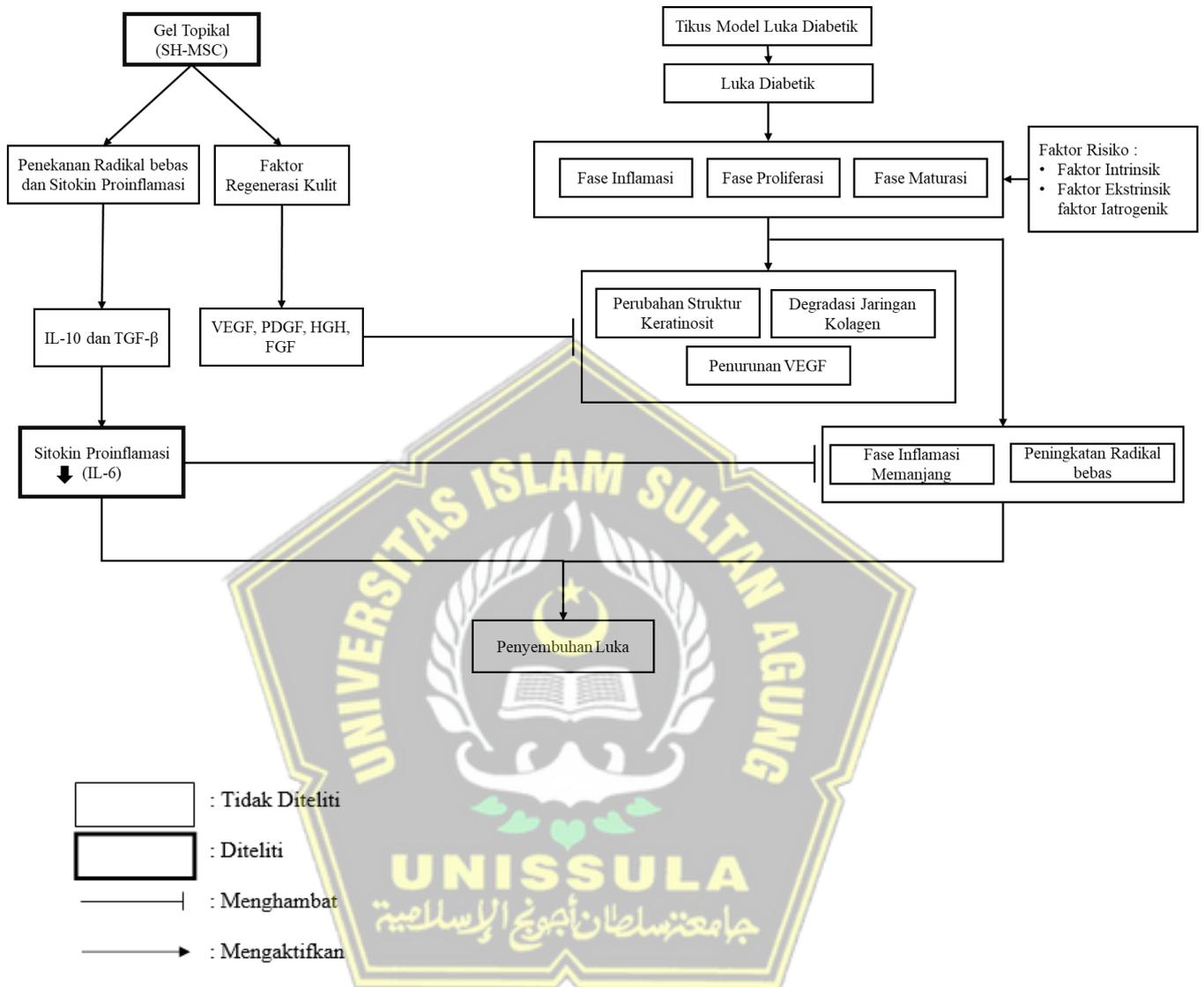
*Secretome hypoxia mesenchymal stem cell* memiliki dua mekanisme untuk penyembuhan luka. pertama, sebagai imunomodulator yang mengatur proses inflamasi, proliferasi dan remodeling. Kedua, secara langsung membedakan dan mengganti sel-sel yang rusak. SH-MSC akan melepaskan molekul yang disekresikan termasuk banyak mediator anti-inflamasi dan faktor pertumbuhan selama regenerasi kulit, seperti VEGF, PDGF, HGF, FGF, dan IFN- $\gamma$ . Beberapa faktor pertumbuhan dan mediator dilepaskan oleh MSC dalam kondisi hipoksia untuk mendorong regenerasi kulit (Yustianingsih, Sumarawati and Putra, 2019).

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa pemberian *secretome hypoxia mesenchymal stem cell* (SH-MSC) dapat menekan stres oksidatif dan menghambat sitokin proinflamasi seperti IL-6 (Roep *et al.*, 2021). Selain itu,

eksosom (SH-MSC) dapat menghambat dari *reactive oxygen species* (ROS) yang meningkat pada luka diabetik. Pada kondisi peradangan menetap pada luka diabetik ditemukan terjadi peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6 yang akan menyebabkan dimerisasi gp130 sehingga menginduksi fosforilasi protein STAT1 dan STAT3 (Schmidt-Arras and Rose-John, 2021). Proses terjadinya fosforilasi STAT1/3 akan menginduksi transkripsi gen proinflamasi lain yang dapat meningkatkan derajat keparahan. Selain itu, SH-MSC meregulasi sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan TGF- $\beta$  yang secara tidak langsung akan menekan ekspresi dari IL-6 dan menurunkan kadar gula darah (Dias *et al.*, 2021).

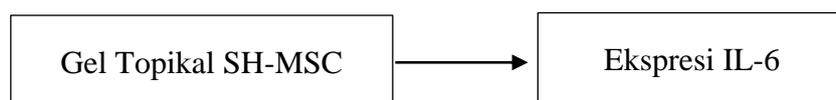


### 2.5. Kerangka Teori



Gambar 2. 6 Kerangka teori

### 2.6. Kerangka Konsep



Gambar 2.7. Kerangka Konsep

## 2.7. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian gel topikal *Secretome Hypoxia Mesechymal Stem Cell* terhadap ekspresi gen IL-6 pada Tikus Wistar dengan model Luka Diabetik

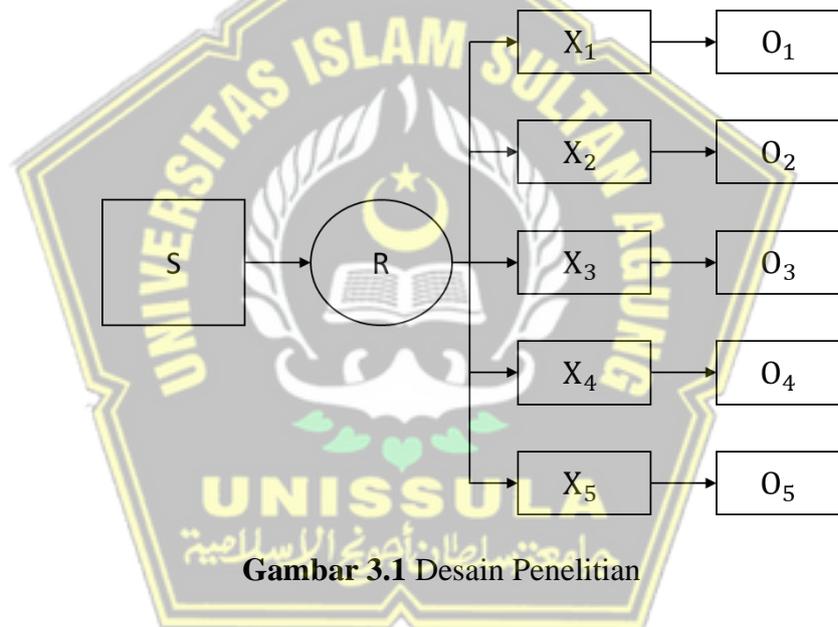


### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### 3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba dengan desain penelitian *post test control group design* terhadap 40 ekor tikus jantan galur Wistar yang kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan seperti Gambar 3.1 berikut:



Gambar 3.1 Desain Penelitian

Keterangan:

S = subjek berupa tikus jantan galur wistar 40 ekor

R = randomisasi

X<sub>1</sub> = kelompok sehat tanpa luka diabetik

X<sub>2</sub> = Kelompok kontrol negatif (tikus mode luka diabetik + base gel)

$X_3$  = Kelompok Kontrol positif (tikus model luka diabetik dengan terapi getamycin)

$X_4$  = Kelompok perlakuan 1 atau K1 (tikus model luka diabetik dengan pemberian gel SH-MSK dosis 200  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$ )

$X_5$  = Kelompok perlakuan 2 atau K2 (tikus model luka diabetik dengan pemberian gel SH-MSK dosis 400  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$ )

$O_1$  = Observasi kelompok sehat.

$O_2$  = Observasi kelompok kontrol negatif

$O_3$  = Observasi kelompok kontrol positif

$O_4$  = Observasi kelompok perlakuan 1

$O_5$  = Observasi kelompok perlakuan 2

## 3.2. Variabel dan Definisi Operasional

### 3.2.1. Variabel

#### 3.2.1.1. Variabel Bebas

Gel topikal SH-MSK

#### 3.2.1.2. Variabel Terikat

Eksresi kadar IL-6

### 3.2.2. Definisi operasional

#### 3.2.2.1. Gel Topikal SH-MSK

Merupakan gel SH-MSK yang diperoleh dari Lab SCCR yang diberikan secara topikal pada area luka diabetik 1x/hari dengan dosis pemberian dosis 200  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$  pada kelompok K1 dan dosis 400  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$  pada kelompok K2 perlakuan.

Satuan :  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$

Skala : Rasio

### 3.2.2.2. Ekspresi Kadar IL-6

Ekspresi kadar IL-6 yang diambil dari jaringan kulit pada luka diabetik tikus Wistar diperiksa pada hari ke 6 menggunakan qRT-PCR.

Satuan : pg/mL

Skala : Rasio

### 3.3. Subjek Uji

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq \frac{19}{4}$$

$$n \geq 4,75$$

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.

#### 3.3.1. 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. Tidak ada kelainan anatomis

#### 3.3.2. Kriteria eksklusi

1. Tikus sakit atau mati pasca masa adaptasi
2. Anggota tubuh tikus tidak lengkap (memiliki kecatatan)
3. Terdapat infeksi pada luka yang ditandai dengan adanya pus

#### 3.3.3. Kriteria Drop Out :

1. Tikus mati atau sakit selama penelitian berlangsung
2. Tikus hilang selama proses penelitian
3. Tikus yang mengalami infeksi selama masa penelitian.

### 3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1. Instrumen

1. Kandang tikus individu dengan tempat pakan dan minum
2. Timbangan tikus
3. Sonde lambung
4. Sputit

5. Mikropipet
6. Alat-alat gelas (beker glass, gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, pipet tetes)
7. *Biosafety Cabinet (BSC)*
8. *Hypoxic Chamber*
9. *Oxygen meter*
10. Handscoon
11. Gluco test easy touch
12. *Punch incisisi*
13. Stemple cetakan luka 2x2 cm
14. pinset
15. gunting bedah
16. Tempat fiksasi
17. Flask 75T

#### 3.4.2. Bahan

1. Dinitrophenyl-bovine serum albumin (DNP-BSA)
2. Gel alumunium hidroksida (Al(OH))
3. 2,4-Dinitrochlorobenzene 1,5% (DNCB)
4. Aseteon-minyak zaitun NaCl 0.9%
5. PBS
6. DMEM
7. FBS

8. Fungizone
9. Penstrep
10. Streptozotosin
11. Buffer sitrat
12. Gel berbasis air
13. Ketamin
14. Xylasine

### 3.5. Cara Penelitian

#### 3.5.1. Prosedur Isolasi Mesenymal 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. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%.
2. Dengan menggunakan pinset, *Umbilical cord* diletakn ke *petri dish*, dicuci sampai bersih menggunakan PBS.
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dihaluskan dan diletakan pada flask 75T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, Fungsizon, penstrep dan FBS ditambahkan secara perlahan hingga menutupi jaringan

6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplet baru
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluens 80%.

### 3.5.2. Proses Hipoksia

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan dengan medium komplet hingga 10ml
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam *chamber*.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. 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

### 3.5.3. Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel SH-MSC dilakukan dengan cara mencampurkan SH-MSC dengan gel sehingga mempunyai konsentrasi 250  $\mu\text{L/g}$ . Gel SH-MSC 200mg dan 400mg masing-masing mempunyai kandungan SH-MSC dengan dosis 200  $\mu\text{L/KgBB}$  (K1) dan 400  $\mu\text{L/KgBB}$  *secretome* (K2).
2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah pengamatan mikroskop.

### 3.5.4. Induksi Tikus Model Luka Diabetik

1. Tikus yang sudah aklimatisasi selama 1 minggu, dipuasakan selama 8-12 jam kemudian dibius dengan campuran ketamin (60mg/KgBB) dan xylazine (20mg/KgBB), diinjeksi streptozotocin secara intraperitoneal dengan dosis 65 mg/KgBB (1x/hari), yang dilarutkan dengan buffer sitrat 0,1 M pH 4,0. Pada hari ke-7 setelah induksi dilakukan pengujian kadar gula darah, dinyatakan diabetes apabila kadar gula darah  $> 200\text{mg/dL}$  dengan menggunakan gluco-check dan pemeriksaan insulin C-Peptide dengan spektrofotometri massa.
2. 21 hari setelah injeksi Streptozotocin, di cek ulang kadar gula darah  $> 200\text{mg/dl}$  dan pemeriksaan insulin C-peptide dengan

spektrofotometri massa, rambut pada pada punggung atas tikus dipotong hingga bersih.

3. Menggunakan steril dan aseptik, dilakukan punch icisis pada punggung atas, berbentuk bulan dengan diameter 6mm dan kedalaman 2mm menggunakan alat punch incisi disposable. Luka dibiarkan selama 5 hari.
4. Selanjutnya pada hari ke enam setelah terbentuk luka diabetik, diberi treatment dengan pemberian gel topikal pada setiap hari selama 10 hari yang mengandung gel SH-MSc dosis 200  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$  dalam 200mg gel (K1) dan 400  $\mu\text{L}/\text{KgBB}$  dalam 400mg gel (K2). Tikus kontrol negatif (K-) diberikan base gel dan Tikus kontrol positif (K+) diberikan terapi gentamycin.

### **3.5.5. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA**

1. Sebanyak 50-100mg sampel kulit dipotong menjadi beberapa bagian kecil dan dimasukkan ke dalam glass tube yang berisi 0,5 mL RNA Iso Plus. Berikan mikropastel dan DNA bebas RNase dengan tujuan menghaluskan potongan kulit, lalu ditambahkan 0,5 mL RNA Iso Plus dan diamkan dalam suhu ruangan selama 5 menit, setelah itu masukan 0,2 mL kloroform hingga adonan berubah warna menjadi putih pucat

2. Sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C setelah 5 menit inkubasi suhu kamar, atau hingga larutan berada dalam, tabung tiga lapis.
3. Lapisan paling atas mengandung mRNA dipindahkan ke dalam microtube 2mL, dengan perbandingan yang sama ditambahkan isopropanol.
4. Sentrifugasi kembali pada suhu 4°C kecepatan 12.000 rpm dalam waktu 10 menit, sampai tampak supernatan kemudian di buang hingga pelt putih muncul di bagian bawah tabung.
5. Setelah kering, tambahkan 100 µL/g etanol 75% ke dalam larutan DEPC (*Diethyl pyrocarbonat*) kemudian dibolak balik beberapa kali, kemudian sentrifugasi kembali 4°C kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit.
6. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 50-100 µL pada suhu -80°C.
7. Kemudian sebanyak 2 µL sampel RNA dikuantifikasi menggunakan Nano Drop dengan panjang gelombang 260nm. Hasil kuantifikasi akan dihitung untuk dijadikan 3000ng.
8. Proses sintesis cDNA dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung sebelumnya dengan 1 µL OligoDT dan PCR water mencapai volume 10 µL, kemudian campurkan thermal cycler dan diinkubasi selama 5 menit hingga suhu 70°C.

9. Selanjutnya, tambahkan 4  $\mu\text{L}$  buffer 5X, 5  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O yang diberi DEPC dan 1  $\mu\text{L}$  ReverTraAce
10. Campurkan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 45-500°C.

### 3.5.6. Validasi luka diabetik pemeriksaan makroskopis

Validasi luka diabetik dilakukan menggunakan makroskopis dengan menggunakan foto sampel treatment luka diabetik

### 3.5.7. Pembacaan Ekspresi Kadar IL-6 Metode RTq-PCR

1. Dengan terukur campuran 3  $\mu\text{L}$  cDNA sampel, *Taq master mix* (dNTPs, *Taq DNA Polymerase*, *reaction buffer*, dan  $\text{MgCl}_2$ ) sebanyak 12,5  $\mu\text{L}$ , ditambahkan primer spesifik pada setiap gen teraget sebanyak 0,6  $\mu\text{L}$  untuk primer forward dan reverse dan 8,3  $\mu\text{L}$  *nuclease free water* (NFW).
2. Lakukan analisa menggunakan illuine RT-PCR menggunakan sekuensi primer GADPH sebagai berikut

F: 5'-GCG ACA GTC AAG GCT GAG AATG -3'

R: 5'-TCT CGC TCC TGG AAG ATG GTGA -3'

3. Menggunakan Sekuensi Primer IL-6:

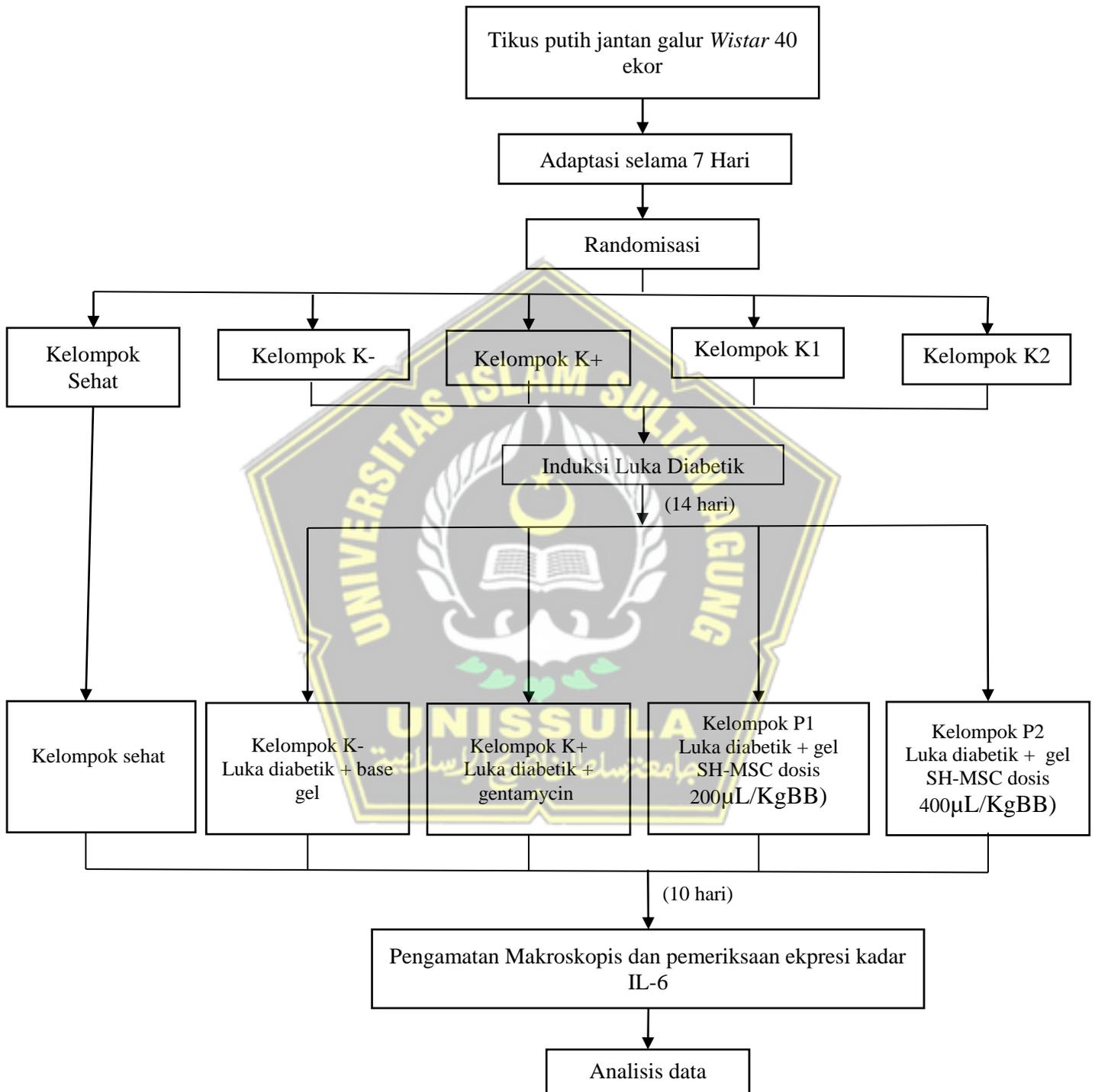
F: 5'-TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC-3'

R: 5'-TTG GAT GGT CCT GGT CCT TAG CC-3'

4. Hasil ekpresi gen dianalisis pada ratio terhadap *house keeping* gen dengan menggunakan *software EcoStudy*.



### 3.6. Alur Penelitian



**Gambar 3. 2** Alur Penelitian

### 3.7. Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.7.1. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang

#### 3.7.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember – Januari 2025.

### 3.8. Analisa Hasil

Data didapatkan dari setiap kelompok penelitian yang kemudian diuji deskriptif untuk dilihat nilai mean atau mediannya dengan skala data rasio. Data kemudian diuji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak dengan jumlah sampel  $<50$  dan uji *Levene's Test* digunakan untuk mengetahui homogenitas data. Data yang didapatkan normal dianalisis dan homogen maka diuji beda *Kruskal Wallis*. Hasil analisis terdapat perbedaan signifikan apabila didapatkan nilai *p value*  $<0,05$ . Dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok penelitian. Nilai signifikansi  $p < 0,05$  menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data menggunakan aplikasi SPSS versi 26.0 Windows.

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Hasil Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) pada bulan November – Desember 2024. Keseluruhan sampel pada penelitian ialah 40 ekor mencit yang terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu Kelompok Sehat; Kelompok K- (luka diabetik + base gel); Kelompok K+ (luka diabetik + gentamycin); Kelompok K1 (luka diabetik+gel SH-MSc dosis 200 $\mu$ L/KgBB); Kelompok K2 (luka diabetik+gel SH-MSc dosis 400 $\mu$ L/KgBB).

##### 4.1.1. Isolasi Sekretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs)

Sel-sel induk mesenkimal diperoleh melalui proses isolasi di Laboratorium SCCR Semarang. Isolasi ini dilakukan dengan memanfaatkan tali pusar yang berasal dari tikus bunting berumur 21 hari. Pasca-isolasi, sel-sel tersebut ditumbuhkan dalam cawan petri yang telah dilengkapi dengan media khusus yang diformulasikan secara spesifik untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel-sel induk. Sepanjang proses kultur berlangsung, dilakukan pengawasan dan perawatan secara cermat terhadap sel-sel tersebut untuk menjamin kondisi tumbuh yang optimal.

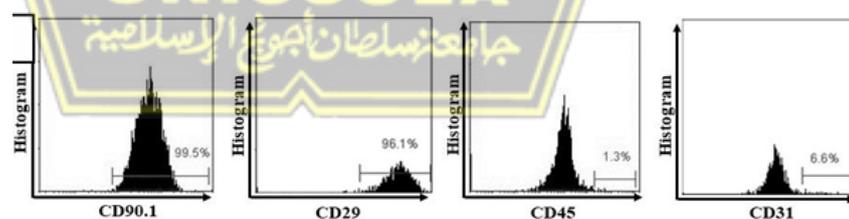
Ketika telah mencapai tahap pasase ke-5, sel-sel tersebut menampakkan kemampuan adhesi pada permukaan dasar cawan petri. Ketika diamati menggunakan mikroskop, sel-sel ini memperlihatkan bentuk morfologi menyerupai kumparan (spindle). Penampakan ini merupakan ciri karakteristik yang khas dari sel-sel induk mesenkimal yang berada dalam kondisi sehat dan aktif, sebagaimana yang ditunjukkan pada ilustrasi dalam Gambar berikut:



**B**

Gambar 4. 1. Hasil Analisis

Morfologi MSC berbentuk fibroblas-like dengan pembesaran 100x



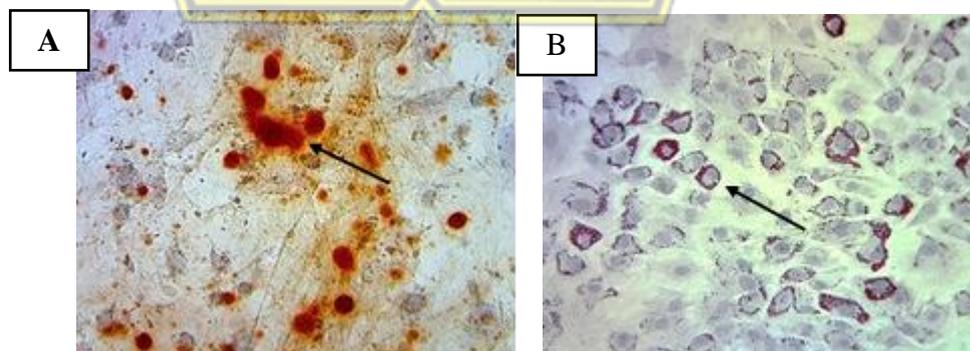
**Gambar 4.2.** Hasil Analisis

A : Morfologi MSC berbentuk fibroblas-like dengan pembesaran 100x; B : Analisis Flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31.

Pada penelitian ini melakukan validasi terhadap MSCs menggunakan analisis *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan dari MSCs dalam mengekspresikan berbagai penanda permukaan

spesifik MSCs. Pada penelitian ini menunjukkan kemampuan dari MSCs dapat mengeskpresikan CD29 (96,10%), CD90 (99,50%), CD45 (1,30%) dan CD31 (6,60%).

Penelitian ini meliputi evaluasi kemampuan diferensiasi dari sel punca mesenkimal (MSCs) menjadi beberapa jenis sel dewasa yang spesifik. Para peneliti menggunakan pendekatan yang sistematis dengan mengkultur MSCs dalam dua jenis medium penginduksi yang berbeda - satu untuk mengarahkan diferensiasi menjadi osteosit (sel pembentuk tulang) dan yang lainnya untuk diferensiasi menjadi adiposit (sel lemak). Hasil penelitian ini menunjukkan bukti yang meyakinkan bahwa sel-sel yang berhasil diisolasi memiliki potensi multipoten yang diharapkan. Sel-sel tersebut berhasil berdiferensiasi menjadi osteosit yang diverifikasi melalui deteksi endapan kalsium menggunakan pewarnaan khusus Alizarin Red dan adiposit yang dikonfirmasi dengan visualisasi akumulasi lemak intraselular melalui teknik pewarnaan Oil Red O.



**Gambar 4.3.** Hasil Uji Kemampuan Diferensial MSCs  
 A : Berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarnaan *alizarin red* dan  
 B : Berdiferensiasi menjadi adiposit pada pewarnaan *oil red o*.

Sel punca mesenkimal (MSCs) diekspos pada lingkungan hipoksia dengan tingkat oksigen 5% yang dijaga selama periode 24 jam dengan menggunakan perangkat khusus hipoksia. Pascainkubasi, media kultur yang mengandung sekretom MSC diakumulasi dan selanjutnya diproses melalui teknik filtrasi aliran tangensial (TFF). Proses filtrasi ini diterapkan secara selektif berdasarkan parameter berat molekul, yang memungkinkan isolasi fraksi spesifik yang mengandung molekul-molekul dengan rentang berat 100-500 kDa. Fraksi molekuler ini telah terkonfirmasi mengandung eksosom.

#### 4.1.2. Hasil Validasi Diabetes

Pada penelitian ini tikus yang telah menjadi sampel penelitian akan diberikan injeksi streptozotocin dengan dosis 65mg/kgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,0 selama 1 minggu secara intraperitoneal untuk membuat model tikus model diabetes. Selanjutnya pada hari ke-7 akan dilakukan penilaian kadar gula untuk mengvalidasi sampel pada penelitian ini sudah mengalami diabetes.

Tabel 4.1. Validasi Gula Darah Tikus

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

Tikus yang telah divalidasi mengalami diabetes kemudian diberikan luka pada bagian punggung menggunakan metode *punch insisi* dan diberi perlakuan biofilm selama 5 hari. Setelah tikus mengalami diabetes dan luka, mereka dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok KS (kelompok tikus sehat), kelompok K- (luka

diabetik+base gel 200 mg), kelompok K+ (luka diabetik+gentamisin 200 mg), kelompok P1 (luka diabetik+gel SH-MSCs dosis 200  $\mu$ L/200 mg gel), dan kelompok P2 (luka diabetik+gel SH-MSCs dosis 400  $\mu$ L/200 mg gel). Setelah 10 hari perlakuan, sampel jaringan di area luka diambil untuk dianalisis ekspresi IL-6 menggunakan metode RTq-PCR.

#### 4.1.3. Pengaruh Pemberian Gel Sekretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs) Terhadap Ekspresi Gen IL-6

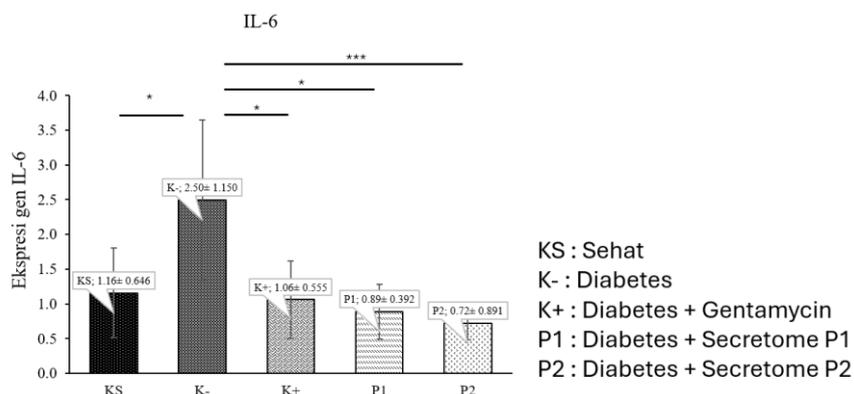
Tabel 4.2. Kadar rata-rata, normalitas dan homogenitas data, uji *one way anova* ekspresi gen IL-6 antar kelompok perlakuan

	Kelompok					<i>P</i> value
	KS	K-	K+	P1	P2	
Kadar IL-6	1.156 $\pm$ 0.646	2.496 $\pm$ 1.150	1.062 $\pm$ 0.555	0.890 $\pm$ 0.392	0.722 $\pm$ 0.891	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.876	0.826	0.249	0.764	0.762	
<i>Levene Test</i>						0.068
<i>One Way Anova</i>						0.004

Keterangan :

\*Uji Shapiro Wilk ( $p > 0,05$  = Normal)

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



**Gambar 4.3.** Grafik Rerata Kadar Ekspresi Gen IL-6 Antar Kelompok

Berdasarkan hasil tabel 4.2 dan gambar 4.3 didapatkan rerata

kadar ekspresi gen IL-6 pada kelompok KS sebesar  $1.156 \pm 0.646 \mu\text{L}$ .

pada kelompok K- memiliki rerata kadar ekspresi gen IL-6 tertinggi

dibandingkan kelompok lainya sebesar  $2.496 \pm 1.150 \mu\text{L}$ . Kelompok

K+ yang diberikan gentamicin menunjukkan penurunan kadar ekspresi

gen IL-6 dibandingkan dengan kelompok K- dan KS sebesar  $1.062 \pm$

$0.555 \mu\text{L}$ , sedangkan kelompok yang diberikan perlakuan SH-MSCs

menunjukkan rerata kadar ekspresi gen IL-6 terendah dibandingkan

dengan kelompok lainya berupa kelompok P1 diberikan gel SH-MSCs

dosis  $200 \mu\text{L}/200 \text{ mg}$  sebesar  $0.890 \pm 0.392 \mu\text{L}$  dan kelompok P2

diberikan gel SH-MSCs dosis  $400 \mu\text{L}/200 \text{ mg}$  sebesar  $0.722 \pm 0.891$

$\mu\text{L}$ . Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas data didapatkan

nilai  $p > 0,05$  yang berarti data terdistribusi normal dan homogen.

Pada uji *one way anova* didapatkan nilai  $p \text{ value} < 0,05$  yang

menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok

penelitian.

Tabel 4.3. Hasil Uji *Post LSD* Perbandingan Rerata Kadar Gen Ekspresi IL-6

Kelompok 1	Kelompok 2	<i>p-value</i>
KS	K-	0.005*
	K+	0.827
	P1	0.539
	P2	0.320
K-	K+	0.003*
	P1	0.001*
	P2	0.000*
K+	P1	0.690
	P2	0.434
P1	P2	0.697

Keterangan: \*=perbedaan bermakna

Berdasarkan hasil analisis *Post LSD* terhadap kelompok penelitian didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rerata kadar ekspresi gen IL-6 antara kelompok K(-) dengan kelompok lain terhadap kadar ekspresi gen IL-6 ( $p < 0,05$ ). Pada kelompok kontrol K- (luka diabetik + gel base) menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok KS (kelompok sehat). Pada kelompok yang diberikan perlakuan kelompok K+, P1 dan P2 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada kadar ekspresi gen IL-6.

#### 4.2. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian gel Sekretomes Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (SH-MSCs) terhadap ekspresi IL-6 pada tikus Wistar model luka diabetik. Penelitian yang telah dilaksanakan dengan pemberian injeksi streptozotocin dengan dosis 65mg/kgBB yang telah dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,0 selama 1 minggu secara intraperitoneal dapat membuat model tikus model diabetes. Hasil penelitian pada hari ke-7 saat dilakukan penilaian kadar gula menunjukkan tikus yang diberikan injeksi STZ 238 11.6 mg/dL, sementara gula dara tikus tanpa injeksi STZ 120 5.9mg/dL. Hal ini dikarenakan STZ dapat menginduksi DM pada tikus. Sifat sitotoksik terhadap sel  $\beta$  pankreas dan efeknya dapat terlihat 72 jam setelah pemberian STZ dan tergantung pada dosis yang diberikan. Efek toksik STZ diawali dengan masuknya STZ

ke dalam sel melalui transporter glukosa-2 (GLUT2) afinitas rendah yang terdapat di membran plasma sel  $\beta$ , sel hepatosit, dan sel tubulus ginjal. Hal ini telah dibuktikan dengan penelitian pada sel yang memproduksi insulin dan tidak mengekspresikan GLUT2 bersifat resisten terhadap induksi dengan STZ. Efek toksiknya yang selektif terhadap sel  $\beta$  pankreas dikarenakan struktur kimia STZ memiliki gugus glukosa sehingga mempermudah masuknya STZ ke sel  $\beta$  karena sel  $\beta$  pankreas lebih aktif mengambil glukosa dibanding sel lainnya. Sel lain yang mengekspresikan GLUT2 seperti hepatosit dan sel tubulus ginjal juga rentan terhadap induksi dengan STZ. Hal ini yang menyebabkan efek nefrotoksik dan hepatotoksik STZ. STZ juga menyebabkan kerusakan jantung dan jaringan lemak dan meningkatkan stres oksidatif, inflamasi dan disfungsi endotel. Kematian sel yang disebabkan oleh pemberian STZ adalah karena gugus metilnitrosourea STZ menyebabkan metilasi DNA, terutama pada posisi O6 guanin. Hal ini dapat merusak DNA sehingga menyebabkan nekrosis sel  $\beta$  pankreas melalui deplesi simpanan energi seluler. Selain itu, adanya usaha untuk memperbaiki DNA yang rusak melalui aktivasi poli ADP ribosa polimerase (PARP) akan semakin mengurangi NAD<sup>+</sup> selular (Husna et al., 2019).

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 ulkus yang terlokalisasi di ekstremitas bawah, 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).

Hasil dari penelitian tikus yang mengalami diabetes dan luka menunjukkan bahwa kelompok tikus K- (luka diabetik+base gel 200 mg) memiliki rerata kadar ekspresi gen IL-6 tertinggi dibandingkan kelompok lainnya sebesar  $2.496 \pm 1.150$ . Hal ini disebabkan oleh Interleukin-6 (IL-6) yang disintesis sehingga monosit terstimulasi, makrofag, fibroblast dan sel endotel. IL-6 merupakan sitokin pro inflamasi sebagai respon protektif yang dilakukan oleh tubuh terhadap kerusakan jaringan yang diakibatkan oleh berbagai stimulus. Penelitian terdahulu telah membuktikan adanya peningkatan ekspresi IL-6 pada keadaan hiperglikemia. Morohoshi et al., melalui studi in vitro menyatakan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan ekspresi IL-6 sebanding dengan peningkatan kadar glukosa pada darah (Surya et al., 2023).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap dosis gel SH-MSCs berhasil menurunkan ekspresi IL-6. Selain itu, aplikasi gel SH-MSCs dalam

kedua dosis yang digunakan terbukti lebih efektif dan signifikan dalam menurunkan ekspresi IL-6 dibandingkan dengan base gel. Pemberian gel SH-MSCs dengan dosis 200  $\mu$ L menunjukkan menurunkan ekspresi IL-6, sedangkan dosis 400  $\mu$ L menunjukkan peningkatan yang lebih signifikan. Didapatkan hasil penelitian bahwa efektivitas pemberian SH-MSCs dengan dosis 200  $\mu$ L tidak jauh berbeda dibandingkan dengan dosis yang lebih tinggi 400  $\mu$ L. Mayasari et al., 2023 menyatakan bahwa sitokin yang merupakan pro-inflamasi mampu menginduksi inflamasi sistemik. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan ekspresi IL-6 mRNA yang signifikan pada seluruh kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol, dimana penurunan optimum terjadi pada gel SH-MSCs dengan dosis 200  $\mu$ L. Efek terapeutik gel SH-MSCs (Secretome Human-Mesenchymal Stem Cells) terhadap luka diabetik dapat dijelaskan melalui kandungan IL-10 di dalamnya. IL-10, sebagai sitokin anti-inflamasi, memiliki kemampuan untuk menekan proses inflamasi yang berkontribusi terhadap proses penyembuhan luka, sehingga secara tidak langsung menurunkan ekspresi IL-6 yang merupakan sitokin pro-inflamasi. Untuk mengkonfirmasi efek anti-inflamasi dari SH-MSCs, dilakukan penelitian menggunakan model photoaging pada kulit tikus, dimana tikus dipilih sebagai subjek karena merupakan mamalia dengan karakteristik kulit yang memiliki kemiripan struktur dengan kulit manusia.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Pemberian gel SH-MSCs berpengaruh signifikan terhadap ekspresi gen IL-6 pada tikus putih jantan galur Wistar model luka diabetik
- 5.1.2. Terdapat perbedaan rerata kadar ekspresi gen IL-6 pada kelompok dengan pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 200  $\mu\text{L/kgBB}$  sebesar  $0.890 \pm 0.392$  dibandingkan kelompok Kontrol Sehat dan kelompok K+
- 5.1.3. Terdapat perbedaan rerata kadar ekspresi gen IL-6 pada kelompok dengan pemberian gel *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 400  $\mu\text{L/kgBB}$  sebesar  $0.722 \pm 0.891$  dibandingkan kelompok Kontrol Sehat dan kelompok K+

#### 5.2. Saran

1. Pemeriksaan lanjutan diperlukan untuk mengevaluasi ekspresi CD 163 setelah pemberian SH-MSCs pada kelompok tikus dengan model luka diabetik.
2. Penelitian berikutnya dapat mengeksplorasi hubungan antara SH-MSCs dan biomarker anti-inflamasi lainnya, seperti kadar IL-10, TGF- $\beta$ , dan jumlah sel Treg.

3. Penentuan variasi waktu pemberian SH-MSCs pada kelompok tikus model luka diabetik perlu dilakukan untuk mengoptimalkan potensi penyembuhan.



### DAFTAR PUSTAKA

- Al-Rawaf, H.A., Gabr, S.A. and Alghadir, A.H. (2019) 'Molecular Changes in Diabetic Wound Healing following Administration of Vitamin D and Ginger Supplements: Biochemical and Molecular Experimental Study', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/4352470>.
- Armstrong, D.G., Boulton, A.J.M. and Bus, S.A. (2021) 'Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence.', *The New England journal of medicine*, 376(24), pp. 2367–2375. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1615439>.
- Cho, N.H. *et al.* (2018) 'IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.
- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R. and Herman, I.M. (2012) 'Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care.', *Advances in skin & wound care*, 25(7), pp. 304–314. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0>.
- Deng, L. *et al.* (2021) 'The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing.', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, p. 8852759. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/8852759>.
- Detty, A.U. *et al.* (2020) 'Karakteristik Ulkus Diabetikum Pada Penderita Diabetes Melitus', *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 11(1), pp. 258–264. Available at: <https://doi.org/10.35816/jiskh.v11i1.261>.
- 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. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100069>.
- Falanga, V. (2021) 'Wound healing and its impairment in the diabetic foot.', *Lancet (London, England)*, 366(9498), pp. 1736–1743. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67700-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67700-8).
- Gantwerker, E.A. and Hom, D.B. (2011) 'Skin: histology and physiology of wound healing.', *Facial plastic surgery clinics of North America*, 19(3), pp. 441–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.06.009>.
- Hachisuka, J., Chiang, M.C. and Ross, S.E. (2019) 'Itch and neuropathic itch.', *Pain*, 159(3), pp. 603–609. Available at: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001141>.
- Hirano, T. (2021) 'IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer', *International*

- immunology*, 33(3), pp. 127–148. Available at: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>.
- Jahandideh, S. *et al.* (2018) ‘Anti-inflammatory effects of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells secretome preconditioned with diazoxide, trimetazidine and MG-132 on LPS-induced systemic inflammation mouse model’, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2), pp. 1178–1187. Available at: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1481862>.
- Jhamb, S., Vangaveti, V.N. and Malabu, U.H. (2019) ‘Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review.’, *Journal of tissue viability*, 25(4), pp. 229–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.06.005>.
- Johnson, B.Z. *et al.* (2020) ‘The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing’, *Biomedicines*, 8(5), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8050101>.
- Kareem, N.A., Aijaz, A. and Jeschke, M.G. (2021) ‘Stem cell therapy for burns: Story so far’, *Biologics: Targets and Therapy*, 15, pp. 379–397. Available at: <https://doi.org/10.2147/BTT.S259124>.
- Khamaisi, M. and Balanson, S.E. (2019) ‘Stem Cells for Diabetes Complications: A Future Potential Cure.’, *Rambam Maimonides medical journal*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10283>.
- Kusnadi, A. *et al.* (2019) ‘The Cytokine TNF Promotes Transcription Factor SREBP Activity and Binding to Inflammatory Genes to Activate Macrophages and Limit Tissue Repair.’, *Immunity*, 51(2), pp. 241-257.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.005>.
- De Luca, M. *et al.* (2019) ‘Advances in stem cell research and therapeutic development’, *Nature Cell Biology*, 21(7), pp. 801–811. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0344-z>.
- Mansoor, Z. and Modaweb, A. (2022) ‘Predicting Amputation in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review’, *Cureus*, 14(7). Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.27245>.
- Noronha, N.D.C. *et al.* (2019) ‘Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies (Stem Cell Research and Therapy (2019) 10 (131) DOI: 10.1186/s13287-019-1224-y)’, *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1259-0>.
- Palmer, D. (2022) ‘Physiotherapy Wound Care Programme (Factors Affecting Wound Healing)’.
- Payne-James, J. and Jones 1945- TA - TT -, R.M. (2019) ‘Simpson’s Forensic Medicine’. Milton: CRC Press LLC. Available at: <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/1124609372>.

- Reinke, J.M. and Sorg, H. (2012) 'Wound repair and regeneration.', *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 49(1), pp. 35–43. Available at: <https://doi.org/10.1159/000339613>.
- Rendra, E., Scaccia, E. and Biebac, K. (2020) 'Recent advances in understanding mesenchymal stromal cells', *F1000Research*, 9, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.12688/f1000research.21862.1>.
- Revilla, G. (2019) 'Pengaruh Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Terhadap Sekresi VEGF pada Penyembuhan Luka Bakar Tikus', *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(3), p. 702. Available at: <https://doi.org/10.25077/jka.v6i3.761>.
- Roep, B.O. *et al.* (2021) 'Type 1 diabetes mellitus as a disease of the  $\beta$ -cell (do not blame the immune system?)', *Nature Reviews Endocrinology*, 17(3), pp. 150–161. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00443-4>.
- Saputra, M.K.F. *et al.* (2023) 'Analysis of the Occurrence of Diabetic Wounds in People with Diabetes Mellitus', *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 12(1), pp. 143–149. Available at: <https://doi.org/10.35816/jiskh.v12i1.915>.
- Sari, M.I. *et al.* (2023) 'The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis', *Biomedicines*, 11(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082325>.
- Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. (2021) 'Endosomes as Signaling Platforms for IL-6 Family Cytokine Receptors', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(June), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.688314>.
- Sjamsuhidajat, R. and De Jong, W. (2017) 'Buku ajar ilmu bedah, sistem organ dan tindak bedahnya', *Edisi ke-4. Jakarta: EGC* [Preprint].
- Solís-Martínez, R. *et al.* (2018) 'Regulation of immunophenotype modulation of monocytes-macrophages from M1 into M2 by prostate cancer cell-culture supernatant via transcription factor STAT3', *Immunology Letters*, 196, pp. 140–148.
- Sorg, H. *et al.* (2017) 'Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts.', *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 58(1–2), pp. 81–94. Available at: <https://doi.org/10.1159/000454919>.
- Valero, C. *et al.* (2020) 'Challenges in the Modeling of Wound Healing Mechanisms in Soft Biological Tissues.', *Annals of biomedical engineering*, 43(7), pp. 1654–1665. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1200-8>.
- Walter, M.N.M. *et al.* (2020) 'Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and

- keratinocyte scratch assays.’, *Experimental cell research*, 316(7), pp. 1271–1281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.026>.
- Wang, J. *et al.* (2020) ‘Extensive serum biomarker analysis before and after treatment in healing of diabetic foot ulcers using a cytokine antibody array.’, *Cytokine*, 133, p. 155173. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155173>.
- Wang, M., Yuan, Q. and Xie, L. (2022) ‘Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application.’, *Stem cells international*, 2018, p. 3057624. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>.
- Wang, N. *et al.* (2023) ‘The impact of psychological interventions on surgical site wound healing post-surgery in psoriasis patients: A meta-analysis’, *International Wound Journal*, (November 2023), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1111/iwj.14509>.
- Wang, P.-H. *et al.* (2018) ‘Wound healing’, *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2). Available at: [https://journals.lww.com/jcma/fulltext/2018/02000/wound\\_healing.3.aspx](https://journals.lww.com/jcma/fulltext/2018/02000/wound_healing.3.aspx).
- Wechsler, M.E. *et al.* (2021) ‘Engineering the MSC Secretome: A Hydrogel Focused Approach’, *Advanced Healthcare Materials*, 10(7), pp. 1–32. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.202001948>.
- Weng, T. *et al.* (2020) ‘Regeneration of skin appendages and nerves: Current status and further challenges’, *Journal of Translational Medicine*, 18(1), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02248-5>.
- Wintoko, R. and Yadika, A.D.N. (2020) ‘Manajemen Terkini Perawatan Luka’, *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung*, 4(2), pp. 183–189.
- Wojciech Zakrzewski<sup>1</sup>, Maciej Dobrzyński<sup>2</sup>, M.S. and Z.R. (2019) ‘Stem cells: past, present, and future’, *Stem cell research & therapy*, 128(5), pp. 329–332. Available at: <https://doi.org/10.1541/ieejfms.128.329>.
- Xu, Z. *et al.* (2022) ‘Secretome of Mesenchymal Stem Cells from Consecutive Hypoxic Cultures Promotes Resolution of Lung Inflammation by Reprogramming Anti-Inflammatory Macrophages.’, *International journal of molecular sciences*, 23(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23084333>.
- 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. Available at: <https://doi.org/10.18051/univmed.2019.v38.164-171>.
- Zheng, Q. *et al.* (2021) ‘The Unique Immunomodulatory Properties of MSC-Derived Exosomes in Organ Transplantation’, *Frontiers in Immunology*, 12(April), pp. 1–14. Available at:

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.659621>.

