KARYA AKHIR

EFEK KOMBINASI *PLATELET RICH PLASMA* DAN *STROMAL VASCULAR FRACTION* TERHADAP KADAR *EPIDERMAL GROWTH FACTOR* SERUM DALAM PENYEMBUHAN TRAUMA ANUS PADA MODEL TIKUS WISTAR

THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA AND STROMAL VASCULAR FRACTION COMBINATION ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR SERUM LEVEL FOR ANAL TRAUMA HEALING IN THE WISTAR RAT MODEL

IVANNA SIROWANTO

C104216102

PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS 1 (SP 1)
PROGRAM STUDI ILMU BEDAH
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

KARYA AKHIR

EFEK KOMBINASI *PLATELET RICH PLASMA* DAN *STROMAL VASCULAR FRACTION* TERHADAP KADAR *EPIDERMAL GROWTH FACTOR* SERUM DALAM PENYEMBUHAN TRAUMA ANUS PADA MODEL TIKUS WISTAR

THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA AND STROMAL VASCULAR FRACTION COMBINATION ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR SERUM LEVEL FOR ANAL TRAUMA HEALING IN THE WISTAR RAT MODEL

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Dokter Spesialis Bedah

Program Studi Ilmu Bedah

Disusun dan Diajukan Oleh

IVANNA SIROWANTO

C104216102

Kepada

PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
PROGRAM STUDI ILMU BEDAH FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

Pernyataan keaslian karya akhir

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	:	Ivanna Sirowanto
Nomor Induk mahasiswa	:	C104216102
Program studi	:	Ilmu Bedah

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 3 Agustus 2021

Yang membuat pernyataan,

Ivanna Sirowanto

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

EFEK KOMBINASI *PLATELET RICH PLASMA* DAN *STROMAL VASCULAR FRACTION* TERHADAP KADAR *EPIDERMAL GROWTH FACTOR* SERUM DALAM PENYEMBUHAN TRAUMA ANUS PADA MODEL TIKUS WISTAR

Disusun dan diajukan oleh

Ivanna Sirowanto
C104210102

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 02 Juni 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui :

Pembimbing Utama	Pembimbing Pendamping
Dr. Sulmiati, Sp.BA	**Dr.dr. Andi Alfian Zainuddin, M.KM, Ph.D**
NIP. 197312062006042007	**NIP. 19830727200912100**

Ketua Program Studi	Dekan Fakultas Kedokteran
Dr. dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk.M.Kes	**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K),M.MedEd**
NIP. 197406292008121001	**NIP. 196612311995031009**

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa berkat karunia dan kemurahan-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan penyususnan karya akhir ini sebagai salah satu prasyarat dalam Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

Saya menyadari banyak hambatan dan tantangan yang saya hadapi dalam penyusunan karya akhir ini tetapi atas kerja keras, bantuan yang tulus, serta semangat dan dukungan yang diberikan pembimbing saya, dr. Sulmiati, SpBA, dr. Ahmadwirawan, Sp.BA(K)BA dan Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM serta Dr. dr. Fonny Josh SpBP-RE (K) B. Mikro sehingga penulisan karya ini dapat selesai sesuai dengan waktunya.

Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Dwia Aries Tina Palubuhu, MA selaku Rektor Universitas Hasanuddin; dr. Uleng Bahrun, Sp.PK(K), Ph.D selaku Manajer Program Pasca Sarjana Unhas; serta Prof. dr. Budu, PhD, SP.M (K) sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Unhas; Dr. dr Irfan Idris, M.Kes. sebagai Wakil Dekan Bidang Akademik, Riset dan Inovasi; dan Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K) sewaktu menjabat sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Unhas yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Juga kepada Dr. dr. Warsinggih, SpB.-KBD, Dr. dr. William Hamdani, SpB(K)Onk dan Dr. dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk sebagai Ketua Bagian Ilmu Bedah, saat menjabat sebagai Ketua Program Studi Ilmu Bedah dan sebagai Ketua Program Studi Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang dengan sabar mendidik, membimbing serta menanamkan rasa percaya diri dan profesionalisme yang kuat dalam diri saya.

Terima kasih penulis juga ucapkan kepada para Guru Besar dan seluruh Staf Dosen Departemen Ilmu Bedah terutama Marlina Rajab dan Nunung Mujiwiyanti yang telah mendidik dan membimbing kami dengan sabar dalam meningkatkan ilmu dan keterampilan pada diri kami.

Terima kasih kepada para sejawat Residen Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan bantuan, semangat dan doa sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Secara khusus saya ucapkan terima kasih kepada teman seperjuangan dan saudara Residen Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Periode Juli 2016, terima kasih untuk dukungan dan semua bantuan yang telah diberikan.

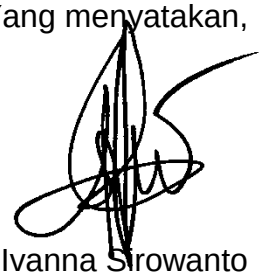
Terima kasih juga saya sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian karya akhir ini namun tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Ungkapan teristimewa saya haturkan kepada Ayahanda Herik Sirowanto dan Ibunda Elly Uchee, dan kepada saudari Inneke Sirowanto yang senantiasa memberi dukungan dan semangat untuk menyelesaikan penelitian saya.

Sebagai penutup, penulis selalu mendoakan semoga Tuhan Yang Maha Esa melimpahkan karunia-Nya kepada semua pihak yang mencurahkan budi baik, pengorbanan dan bantuan kepada saya selama pendidikan, penelitian dan penulisan karya akhir ini.

Makassar, 3 Agustus 2021

Yang menyatakan,



Ivanna Sirowanto

ABSTRAK

IVANNA SIROWANTO. *Efek Kombinasi Platelet Rich Plasma dan Stromal Vascular Fraction terhadap Kadar Epidermal Growth Factor Serum Dalam Penyembuhan Trauma Anus Pada Model Tikus Wistar* (dibimbing oleh Sulmiati, Ahmadwirawan, Andi Alfian Zainuddin).

Penelitian ini bertujuan menginvestigasi efek dari kombinasi SVF dan PRP terhadap kadar EGF pada model trauma anus. Sebanyak 28 ekor tikus yang dibagi kedalam 3 kelompok: Kelompok A terdiri dari tikus normal sebagai kelompok kontrol normal, kelompok B dan C adalah kelompok yang mendapatkan perlakuan trauma dan penanganan pembedahan anal. Kelompok B hanya diterapi dengan cairan salin dan kelompok C diterapi dengan injeksi lokal kombinasi SVF dan PRP setelah perlakuan. Kadar EGF lalu dinilai pada hari pertama, ketujuh dan keempat belas. Kadar EGF secara umum meningkat pada kelompok C dibandingkan dengan kelompok B.

Hasil pengujian one way ANOVA menunjukkan peningkatan signifikan kadar EGF pada hari ketujuh (p=0,038) dan hari keempat belas (p=0,018). Berdasarkan hasil uji regresi, pemberian injeksi lokal PRP dan SVF setelah perlakuan dapat meningkatkan kadar EGF sebesar 36,9% pada kelompok C dibandingkan kelompok B. Kombinasi PRP dan SVF dapat meningkatkan kadar EGF pada proses penyembuhan luka pada trauma anal. EGF memiliki peran penting dalam proses penyembuhan trauma.

Kate kunci: PRP, SVF, EGF, Trauma Anak, Penyembuhan Luka.

UNIVERSITAS HASANUDDIN
PUSAT BAHASA
2021

ABSTRACT

IVANNA SIROWANTO. *The Effect of Platelet-Rich Plasma and Stromal Vascular Fraction Combination on Epidermal Growth Factor Serum Level for Anal Trauma Healing in The Wistar Rat Model* (Supervised by **Sulmiati, Ahmadwirawan,** and **Andi Alfian Zainuddin**)

This study aims to investigate the effect of an AVFs and PRP combination on EGF levels in the anal trauma model.

Twenty-eight adult wistar rats were divided into 3 groups. Group A consisted of healthy rats as a normal control group. Group B and C underwent modified anal surgical trauma and repair. Group B was treated with saline only and group C was treated with local injection of a combination of SVFs and PRP after anal surgical repair. The EGF level was subsequently assessed on days 1, 7, and 14.

EGF levels are generally increased in group C compared group B. A one-way ANOVA test result shows significantly increased EGF levels on day 7 ($p=0.038$) and 14 ($p=0.018$). Based on the linear regression test results, we find that local injection of PRP and SVFs after anal repair on an anal surgical trauma model can increase the EGF level in group C by 36.9% more than that of group B.

The combination of PRP and SVFs can increase the EGF level in the wound healing process of anal trauma. EGF is critical in the anal trauma healing process.

Keywords: PRP, SVFs, EGF, anal trauma, wound healing

DAFTAR ISI

Sampul i
Lembar Pengesahan iii
Pernyataan Keaslian iv
Kata Pengantar v
Abstrak vii
Daftar Isi ix
Daftar Tabel dan Bagan xi
Daftar Gambar xii
Bab I 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 6
1.3 Tujuan Peneltitian 7
1.3.1 Tujuan Umum 7
1.3.2 Tujuan Khusus 7
1.4 Manfaat Penelitian 7
Bab II 8
2.1 Telaah Pustaka 8
2.1.1 Anatomi Dan Fisiologi Anus Dan Rektum 8
2.1.2 Trauma Anus Dan Rektum 13
2.1.3 Fase Penyembuhan Intestinal 19
2.1.4 Epidermal Growth Factor 38
2.1.5 Platelet Rich Plasma 44
2.1.6 Stromal Vascular Fraction 45
2.2 Kerangka Teori 49
2.3 Kerangka Konsep 50
2.4 Hipotesis 50
Bab III Metode Penelitian 51
3.1 Rancangan Penelitian 51
3.2 Lokasi Dan Waktu 51
3.3 Populasi Dan Teknik Sampel 51
3.3.1 Metode Penarikan Sampel 52
3.3.2 Proses Penelitian 53
3.3.2.1 Preparasi Sampel 53
3.3.2.2 Preparasi *Platelet Rich Plasma* 55
3.3.2.3 Preparasi *Stromal Vascular Fraction* 55
3.3.2.4 Preparasi PRP + SVF 56
3.3.2.5 Perlakuan Sampel 56
3.3.2.6 Cara Sacrifice 58
3.4 Kriteria Inklusi Dan Eksklusi 59

3.5 Definisi Operasional 59
3.6 Instrumen Pengumpul Data 61
3.7 Metode Pemeriksaan 64
3.8 Analisis Data 64
3.9 Alur Penelitian 65
Bab IV Hasil Penelitian 66
4.1 Hasil Penelitian 66
4.2 Pembahasan 72
4.3 Kelemahan Dan Kekuatan Penelitian 78
Bab V Penutup 79
5.1 Kesimpulan 79
5.2 Saran 79
Daftar Pustaka 80

DAFTAR TABEL DAN BAGAN

Tabel 1. Beberapa Faktor Pemicu Atau Penghambat Proses Penyembuhan Luka Epitel Intestinal Dan Mukosa 29

Tabel 2. Beberapa Faktor Dan Alur Sinyal Yang Berkontribusi Dalam Proses Penyembuhan Luka Sel Epitelial Intestinal Dan Mukosa Intestinal 30

Tabel 3. Karakteristik Sampel Penelitian Berdasarkan Analisis Univariat 66

Tabel 4. Uji One-Way ANOVA Pada Kelompok Kontrol, Dengan Terapi Dan Tanpa Terapi Secara Umum 68

Tabel 5. Pengujian EGF Berdasarkan Hari Terhadap Masing-Masing Kelompok 69

Tabel 6. Uji Regresi pada kelompok pemberian terapi PRP dan SVF 71

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Anatomi Muskulatur Anus Dan Rektum 9
Gambar 2. Anatomi Sphincter Anus Dan Persarafan Anus 10
Gambar 3. Jaras Kontrol Volunter Defekasi Dan Kontinensi Feses 11
Gambar 4. Vaskularisasi Kolon, Rektum Dan Anus 12
Gambar 5. Jalur Myofibroblast 32
Gambar 6. Mekanisme Migrasi Myofibroblast 35
Gambar 7. Skema Representasi Efek Fibroblasts 36
Gambar 8. Jalur Sinyal Induksi EGFR 42
Gambar 9. Sampel Tikus Wistar 54
Gambar 10. Proses Pengambilan Donor PRP Dan SVF 54
Gambar 11. Prosedur Perlakuan Sampel 58
Gambar 12. Proses Pengujian Sampel 60
Gambar 13. Perbandingan rerata kadar EGF 67

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Trauma anorektal diasosiasikan dengan morbiditas fisik dan emosional. Terkecuali pada kasus *straddle injury*, pelecehan anak atau aktivitas penyimpangan seksual menjadi penyumbang angka trauma anus terbanyak, penyebab lain yang sering disebutkan antara lain perubahan pada pola defekasi seperti diare dan konstipasi. Trauma yang dapat terjadi beragam, mulai dari laserasi anal yang simpel dan kontusio perineal hingga destruksi rektum dan terbentuknya fistula rektovesika. Mayoritas korban dewasa menderita trauma anorektal non iatrogenik adalah akibat trauma penetrans, tetapi kasus seperti demikian jarang ditemui pada anak-anak. Terkadang pada beberapa negara kasus trauma pada anus dan rektum pada anak tidak sering dilaporkan. (Black et al, 1982; Samuk et al, 2015)

Sejalan dengan perkembangan zaman, pengalaman dan evolusi ilmu pengetahuan, diagnosis dan penanganan trauma anus berkembang hingga zaman modern sekarang ini. Diagnosis trauma anorektal perlu segera ditegakkan pada kasus gawat darurat guna mencegah terjadinya komplikasi. Penanganan disesuaikan dengan waktu, derajat keparahan trauma yang terjadi dan ekstensi perlukaan yang terjadi baik intra ataupun ekstraperitoneal. Penentuan terapi ditentukan berdasarkan ekstensi dan

lokasi dari trauma yang terjadi (Akakpo-Numado et al, 2015; Samuk et al, 2015)

Seorang ahli bedah harus memiliki kesiapan untuk menangani akibat dari segala bentuk trauma dan mampu melakukan prevensi komplikasi pasca operasi seperti perdarahan, inkontinensia, dehisensi luka, striktur dan fistula. Penyebab lain yang mampu menyebabkan perubahan struktur anus adalah akibat iritasi berulang karena pola defekasi yang berubah sehinga menyebabkan robekan hingga fisura yang mengakibatkan perdarahan. (Mahan et al, 2020; Black et al, 1982)

Komplikasi tersebut dapat timbul sebagai bagian dari proses penyembuhan luka baik itu luka akibat operasi ataupun bukan. Untuk itu pemahaman tentang mekanisme penyembuhan luka perlu diketahui. Mekanisme penyembuhan luka secara umum menjadi pusat perhatian dalam perkembangan teknologi dan pengobatan terkini. Serangkaian proses melibatkan regenerasi dan regulasi jaringan menjadi hal penting dalam homeostasis organ. Perbaikan yang kurang ataupun berlebihan dapat mempengaruhi fungsi organ tersebut. Pembentukan fistula dan ulkus di satu pihak dan pihak lain bisa terjadi fibrosis dan striktur melambangkan dua sisi koin dalam penyembuhan luka gastrointestinal. (Rieder et al, 2007)

Sejauh ini, proses penyembuhan luka intestinal masih sebagian dimengerti. Pada saat fase inflamasi, makrofag dan neutrofil menginduksi kerusakan jaringan lokal dangan mensekresikan zat kimiawi dan enzim

yang kemudian memicu pelepasan sitokin pro inflamasi dan peptida pengaktifasi sel dan kemotaktik yang sebelumnya berikatan dengan matriks jaringan. Bila kerusakan jaringan cukup parah, maka myofibroblas bermigrasi ke lokasi defek yang rusak. Fungsi migrasi ini, kemampuan berkontraksi pada luka dan produksi matriks ekstraseluler oleh sel myofibroblas memiliki peran penting dalam fase inflamasi. Penanganan untuk striktur intestinal, fibrosis dan fistula masih belum memuaskan. Dibutuhkan terapi dan pencegahan yang lebih selektif dan kuat dalam mencegah kerusakan kontinyu jaringan yang mengalami penyembuhan dan perubahan modulasi migrasi myofibroblas dan sintesis matriks ekstraseluler. (Rieder et al, 2007)

Terdapat beberapa variasi faktor pertumbuhan seperti *epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF), keratinocyte growth factor (KGF), insulin-like growth factor (IGF)* yang terbukti meningkatkan kecepatan pemulihan atau proliferasi sel epitel intestinal. Keseluruhan sel tersebut berperan dalam serangkaian proses penyembuhan jaringan intestinal. (Iizuka et al, 2011)

Epidermal growth factor (EGF) adalah asam amino yang berperan penting dalam regulasi pertumbuhan sel, survival, migrasi, apoptosis, proliferasi, dan diferensiasi. EGF sangat penting dalam proses epitelisasi dalam penyembuhan luka karena menginduksi fibroblas untuk bermigrasi, bertumbuh dan mempercepat penyembuhan. Sebagai tambahan, EGF

juga telah terbukti di beberapa penelitian sebagai regulator intestinal dan faktor protektif mucosal yang membantu untuk melindungi integritas *barrier* intestinal, yang sangat esensial dalam absorbsi nutrien, maturasi sel intestinal dan memelihara homeostasis sel intestinal. (Tang X et al, 2016)

Berbagai penelitian berkembang dalam proses penyembuhan luka, salah satu yang berkembang pesat saat ini adalah terapi sel punca. Aplikasi berbagai jenis terapi sel punca terbukti dari beberapa penelitian mampu meningkatkan regenerasi dan reparasi sel secara signifikan terutama pada lingkungan jaringan yang kurang begitu baik dalam proses penyembuhan. Berbagai hipotesis dan percobaan telah dilakukan dalam membuktikan kerja dari sel punca dalam regulasi imun dan inflamasi untuk mengakselerasi penyembuhan. (Herreros et al, 2019)

Salah satu sumber EGF dan faktor pertumbuhan lainnya di beberapa penelitian yang berkembang pesat saat ini dihubungkan dengan percobaan aplikasi berbagai macam bentuk terapi, yang terkenal saat ini adalah autologous platelet seperti *Platelet Rich Plasma* (PRP) dan penggunaan sel punca. (Chae et al. 2017)

Salah satu sumber sel punca terbanyak dan sumber yang tergolong mudah didapatkan berasal dari jaringan adiposa. Dilaporkan sel punca yang berhasil diisolasi dari jaringan adiposa 40 kali lipat lebih banyak bila dibandingkan jika diambil dari sumsum tulang. Pada SVF misalnya, populasi sel yang terkandung amat bervariasi seperti fibroblast, sel

hematopoetik, sel endotelial, *pericytes*, sel preadiposit dan *mesenchymal stromal cells* (MSCs) yang dapat berdiferensiasi menjadi kondrogenik, myogenik, adipogenik dan osteogenik. Dalam *Polymerase chain reaction* (PCR) kuantitatif dan hasil *reverse transcriptase PCR* menunjukkan faktor pertumbuhan epitelisasi *epidermal growth factor* (EGF), *chemokines, stromal cell–derived factor* (SDF-1 atau CXCL12), *neutrophil-activating protein-2* (NAP-2 atau CXCL7) dan gen penyembuhan luka sangat tinggi beregulasi pada SVF. Selain itu, SVF sendiri tidak membutuhkan pemrosesan kompleks, prosedur isolasi yang rumit serta kultur yang membutuhkan fasilitas laboratorium yang lengkap sehingga tergolong lebih mudah untuk diperoleh dibanding terapi sel punca lainnya. (Chae et al, 2017; Josh et al, 2021)

Platelet Rich Plasma (PRP) sendiri adalah konsentrat autolog platelet yang melebihi nilai normal pada hitung platelet dalam plasma. Platelet dalam jumlah besar menghasilkan keuntungan klinis. Dalam platelet ditemukan faktor pertumbuhan untuk menginisiasi penyembuhan luka seperti *platelet-derived growth factor, transforming growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), epithelial growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF-I, IGF-II), fibroblast growth factor (FGF), endothelial cell growth factor (ECGF) dan platelet-derived angiogenesis factor (PDAF).* Efek terapeutik PRP telah terbukti dalam membantu mendorong percepatan penyembuhan perlukaan dan regenerasi jaringan dengan kandungannya yang kaya akan growth factor. Penggunaan PRP

yang sudah terbilang banyak dimasa modern ini mendorong kemajuan keberhasilan terapi kombinasi sel punca di berbagai aspek. (Liao et al, 2014).

Pada kasus trauma anus, pemberian terapi dengan kombinasi PRP dan SVF belum pernah dilakukan sebelumnya. Berdasakan penelitian-penelitian yang sebelumnya juga, belum pernah ada penelitian yang menilai efek kombinasi terapi terhadap kadar EGF sebagai salah satu faktor pertumbuhan yang berperan dalam proses penyembuhan. Apakah dengan pemberian SVF dan PRP dapat membantu meningkatkan faktor EGF yang baik untuk penyembuhan? Ataukah tidak ada pengaruh signifikan? Maka dalam penelitian ini, akan ditemukan jawaban tersebut dan juga harapan bila penelitian ini berhasil membuktikan kegunaan pemberian kombinasi tersebut, maka akan dapat sangat membantu dalam proses kemajuan terapi di bidang kedokteran di masa depan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan sebelumnya maka dapat dirumuskan suatu masalah yaitu:

Apakah terdapat efek kombinasi *platelet rich plasma* (PRP) dan *stromal vascular fraction* (SVF) terhadap kadar EGF dalam penyembuhan trauma anus pada model tikus wistar

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan efektivitas penggunaan kombinasi *platelet rich plasma* (PRP) dan *stromal vascular fraction* (SVF) terhadap kadar EGF dalam penyembuhan trauma anus pada model tikus Wistar

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengukur kadar EGF pada penyembuhan trauma anus pada model tikus Wistar

1.3.2.2. Membuktikan pemberian kombinasi *platelet rich plasma* (PRP) dan *stromal vascular fraction* (SVF) meningkatkan kadar EGF

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Hasil penelitian dapat digunakan sebagai dasar penelitian lanjut tentang pemanfaatan kombinasi PRP dan SVF dalam mempercepat penyembuhan trauma

1.4.2 Hasil penelitian dapat dijadikan bahan referensi penelitian lain dalam penatalaksanaan trauma anus

1.4.3. Memberikan informasi kepada masyarakat umum bahwa pemberian PRP dan SVFs dapat mempercepat penyembuhan trauma anus

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Telaah Pustaka

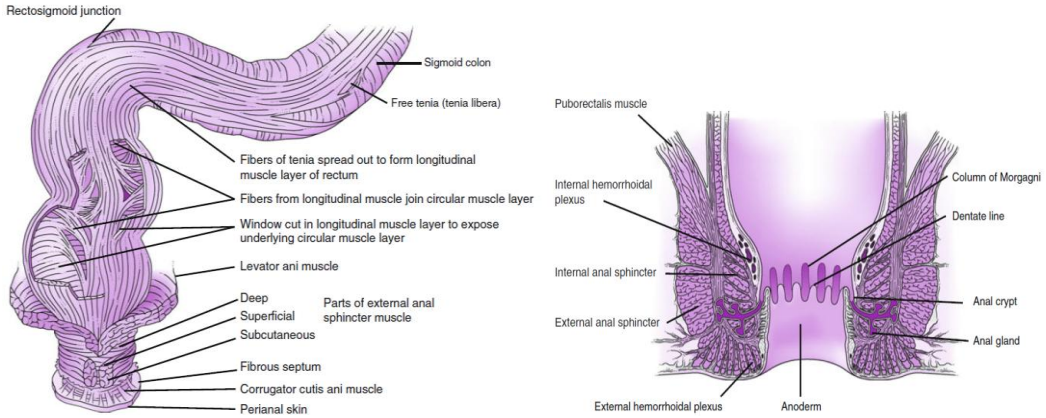
2.1.1. Anatomi dan Fisiologi Anus dan Rektum

Saluran anal adalah pars terminal dari traktus gastrointestinal. Merupakan segmen tubular pendek, sepanjang 4 cm, berada di distal rektum, yang mana di bagian internal dilapisi epitel skuamous dan transisional. Kanalis anal mulai pada bagian rektum distal dengan ujung pada orifisium anus adalah *anal verge,* atau linea anocutaneus Hilton, yang kemudian berlanjut menjadi lapisan muskular pada kavum pelvis. Bagian ini dilindungi oleh muskulus sfingter anal. (Ehrenpreis et al, 2012)

Rektum sebagai bagian yang paling terdekat dengan anus merupakan pars paling distal pada usus besar. Didefinisikan sebagai regio yang berada antara kolon sigmoid dan kanalis anal dan panjang sekitar 12-15 cm. Pada bagian sepertiga distal dari rektum masuk ke dalam refleksi peritoneal. Tidak sama pada bagian kolon yang lain, serat muskulus longitudinal dalam rektum tidak membentuk taenia tetapi melapisi seluruh rektum. Linea dentata menandai pars distal dari rektum dan memisahkan kanalis anal. Jarak antara anal verge dan linea dentata biasanya sekitar 1 sampai 2 cm. (Ehrenpreis et al, 2012)

Bagian rektum juga tersusun dari dua tipe epitel, epitel kolumner selapis pada rektum dan epitel berlapis pada kanalis anal (anoderm).

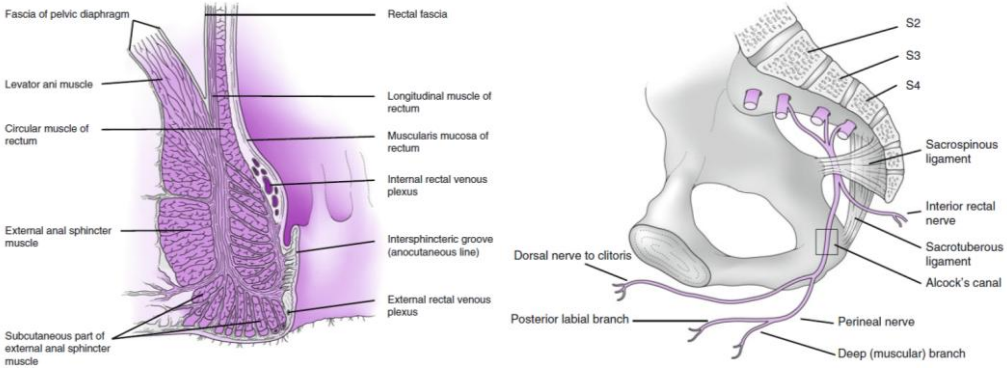
Linea dentata memiliki beberapa lapisan disebut juga kolumna Morgagni. Kripte anal dan beberapa kelenjar yang dimiliki pada kulit normal, berlokasi di dasar dari kolumna Morgagni. Kelenjar ini bisa menjadi tempat formasi fistula dan abses perianal. Rektum juga memiliki tiga lipatan disebut valvula Houston. (Ehrenpreis et al, 2012)



Gambar 1. Anatomi muskulatur anus dan rektum (Ehrenpreis et al, 2012)

Muskulatur dari sfingter anus internal adalah serat tebal yang berbentuk seperti cincin yang tersusun dari otot polos sirkuler dari colon pada pars proksimal dari kanalis anal. Sfingter anus eksterna meliputi kanalis anal pada diafragma pelvikum, distal dari orifisium anus. Sfingter anus eksterna merupakan otot rangka yang berbentuk cincin yang berekstensi ke superior puborektalis, bagian penting dari levator ani, otot utama dari dasar pelvis. Pada bagian posterior, sfingter anus eksterna melekat pada os koksigeus dan pada bagian anterior pada korpus perineal. Muskulus puborektalis melekat pada anterior os pubis dan

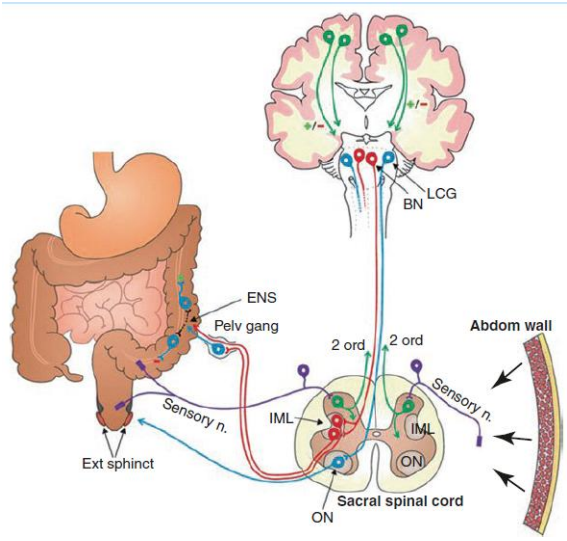
melingkupi posterior rektum membentuk *sling.* Muskulus puborektalis bertanggungjawab pada pembentukan sudut anorektal. (Ehrenpreis et al, 2012; Kukreja, 2013)



Gambar 2. Anatomi sphincter anus (kiri) dan persarafan anus (kanan). (Ehrenpreis et al, 2012)

Sfingter anus interna dipersarafi oleh serat saraf otonom ekstrinsik yang terdiri dari simpatik dan parasimpatik. Sementara sfingter anus eksterna dipersarafi oleh nervus pudendus (cabang sakralis S2, S3,dan S4). Rektum sendiri dipersarafi oleh sistem saraf simpatis melalui plexus pelvikum L1, L2 dan L3, sementara sistem saraf parasimpatisnya dipersarafi melalui nervus erigentes S2, S3 dan S4. Proses defekasi sendiri memiliki jaras persarafan sebagai berikut, pusat kortikal yang mengatur kontrol volunter menyediakan input yang antara melakukan inhibisi atau mengeksitasi neuron di batang otak, nukleus medialis (nukleus Barrington) melalui jaras otonom ke colon distal dan rektum diaktivasi dan *lateral cell group* yang mengkontrol sfingter anus eksterna. Grup neuron media memproyeksikan ke pusat defekasi spinal pada kolumna intermediolateral pada level S1. Rangkaian ini kemudian

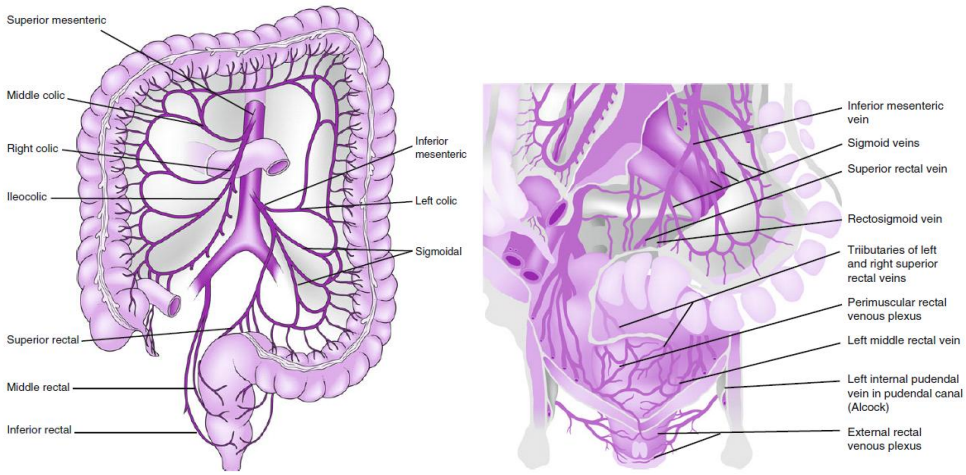
menghubungkan jaras refleks intrinsik pada sistem saraf enterik melalui ganglia pelvikum. Saraf sensorik yang mendeteksi tekanan dan iritasi mukosal pada kolon berkontribusi untuk mendorong dan neuron yang merasakan sensasi tekanan pada cavum abdomen memperkuat rangsang defekasi. Rangsang ini kemudian terhubung dengan saraf yang membuat koneksi ke medulla spinal terus ke pons dan korteks. Kemudian saraf yang turun dari sinaps pada nukleus Onuf pada neuron motorik memberikan sinyal untuk sfingter eksterna. (Ehrenpreis et al, 2012; Oliveira, 2020)



Gambar 3. Jaras kontrol volunter defekasi dan kontinensi feses (Oliveira, 2020)

Vaskularisasi anus disuplai oleh arteri rektalis superior, media dan inferior. Sementara pleksus hemoroidal internal menghubungkan vena rektalis superior yang diteruskan ke vena mesenterika inferior yang terhubung ke sistem vena porta. Sementara pleksus hemoroidalis eksterna menghubungkan vena rektal media dan vena pudendus yang

bermuara ke vena iliaka yang selanjutnya dialirkan ke vena kava inferior. Sementara suplai arteri rektum berasal dari arteri rektalis superior, media dan inferior. Arteri rektalis superior merupakan cabang dari arteri mesenterika inferior, arteri rektalis media berasal dari arteri iliaka interna atau arteri pudendus dan arteri rektalis inferior berasal dari arteri iliaka interna. Mayoritas suplai darah berasal dari arteri rektalis superior dan infeior. Drainase vena rektum oleh vena rektalis media yang terhubung ke vena kava inferior dan vena rektalis superior yang terhubung ke vena porta. (Ehrenpreis et al, 2012)



Gambar 4. Vaskularisasi Kolon, rektum dan anus (Ehrenpreis et al, 2012)

Sistem limfatik anorektal sendiri terbagi menjadi tiga grup yaitu perianal, anorektal dan ekstrarektal. Dimana grup perianal mendapatkandrainase dari lapisan superfisial dan profunda dari lapisan kulit perineal dan berakhir pada grup nodus inguinal inferolateral. Sementara grup anorektal terbagi menjadi porsi anal yang terdiri dari tiga

pleksus pada lapisan mukosa, submukosa dan intermuskular serta porsi rektal yang menghubungkan pleksus ini ke grup ekstarektal. Yang terakhir, grup ekstrarektal tersebar sepanjang ramifikasi dari pembuluh hemoroidal inferior yang mencapai fasia obturator dan nodus hipogastrik. (Kukreja, 2013.)

Sebagai fungsinya, anatomi neuromuskular rektum dan anus didesain untuk preservasi kontinensia feses dan memfasilitasi defekasi: menahan feses hingga bisa dikeluarkan sesuai keinginan. Muskulus puborektalis tetap berkontraksi pada saat istirahat membentuk sudut anorektal, sudut yang terbentuk (sekitar 90 derajat) menjaga agar feses tidak keluar dari rektum. Sfingter anal kemudian lebih jauh lagi menjaga agar tidak ada pasase udara, cairan dan feses padat keluar lewat anus.(Ehrenpreis et al, 2012; Oliveira, 2020)

2.1.2. Trauma Anus dan Rektum

Trauma sendiri memiliki arti yang kompleks dan problematik. Tidak adanya bukti ilmiah yang bisa membedakan antara perbedaan penyakit dan cedera terhadap jaringan membuat pengertiannya menjadi rancu. Sehingga beberapa peneliti sepakat mengorientasikan trauma atau cedera dengan mendeskripsikan penyebab kerusakan dan kelainan patologi yang terjadi yang diakibatkan oleh perubahan momentum atau energi yang terjadi pada tubuh. Oleh karena itu penyebab energi sendiri sering dikaitkan dengan ilmu kinematik. Kemudian untuk membedakannya

dengan jelas bila dibandingkan dengan cedera lainnya, perlu dikaji lebih lanjut penyebab cedera itu sendiri. (Langley et al, 2004; Wesson et al, 2017)

Trauma anorektal sendiri merupakan kasus yang jarang terjadi pada anak-anak. Beberapa publikasi merupakan laporan kasus atau kasus serial yang terbatas. Kebanyakan kasus dilaporkan sebagai akibat dari penyulaan, kekerasan seksual, kecelakaan lalu lintas. Trauma pada pelvis dan abdominal seringkali menyertai trauma anorektal dan dapat mengancam nyawa sang anak. Diagnosis tepat seringkali sulit dilakukan dan trauma penyertanya seringkali tidak mudah segera diketahui. Padahal hal tersebut harus segera ditangani karena memiliki komplikasi yang perlu segera dihindari. Penyebab lain yang sering disebutkan antara lain perubahan pada pola defekasi seperti diare dan konstipasi. (Black et al, 1982; Akakpo-Numado et al, 2015)

Insidensi trauma yang tercatatat pada pusat trauma di Amerika, dikatakan sekitar 85% kasus akibat luka tembakan dan sebanyak 5 % akibat trauma tajam. Penyebab lain kasus trauma tajam penetrans adalah akibat cedera iatrogenik dari urologik dan prosedur endoskopi menyamai jumlah kasus akibat trauma benda asing. Trauma tumpul hanya sekitar 5-10% dan biasanya dengan disertai trauma lain. (Vane et al, 2006; Wesson et al, 2017)

Beberapa penyebab lain trauma pada anus anak ialah akibat dari perubahan pola defekasi. Diare yang terjadi berulang ataupun konstipasi

berulang membuat iritasi pada mukosa rektum bahkan sampai terjadinya fisura, biasanya paling sering pada bagian midline anterior ataupun posterior. Fisura ani dapat menyembuh secara cepat, tetapi bila hal ini terjadi berulang, dapat menyebabkan terjadinya edematosa tepat di bagian luar fisura dan biasa disebut ‘sentinel pile’. Diagnostik kasus ini dapat dinilai langsung dengan secara lembut dilakukan eksposur ke lateral pada bagian anus untuk menilai mukosa terutama pada bagian anterior dan posterior. (Beasley, 2005)

Stenosis ani merupakan salah satu komplikasi dari trauma anus dan rektum maupun akibat pembedahan anorektal. Stenosis ani merupakan penyempitan dari kanalis anal sebagai akibat dari striktur anatomikal atau muskulus dan stenosis fungsional. Pada stenosis anus anatomikal, anodermal yang lunak tergantikan menjadi jaringan sikatriks restriktif. Stenosis menyebabkan alterasi morfologikal dari kanalis anal dan sebagai konsekuensi terjadi reduksi fungsi regional menyebabkan kesulitan ataupun nyeri saat defekasi. (Brisinda et al, 2009)

Evaluasi inisial pada anak tidaklah jauh berbeda dibandingkan orang dewasa. Penilaian perlu dilakukan secara sistematik dan berdasarkan prinsip penanganan trauma yang dianut dalam *Advanced Trauma Life Support* (ATLS). Mayoritas trauma anus dan rektum biasanya diasosiasikan dengan trauma lain yang berada pada segmen intraperitoneal. Prinsip diagnostik untuk bagian rektum dan anus hampir sama dengan pada kolon. Meskipun demikian, untuk trauma penetrans,

trauma dapat terjadi pada segmen intra maupun ekstraperitoneal dari rektum yang menambah rumitnya penentuan diagnosis. Karena trauma ekstraperitoneal biasanya terlokalisir pada jaringan retroperitoneal, iritasi peritoneal bisa saja tidak tampak dan dibutuhkan bantuan endoskopi, CT scan untuk membantu visualisasi untuk diagnostik. (Wesson et al, 2017; Nance et al, 2014)

Penanganan yang berkembang saat ini pun beragam, mulai dari *wound care* lokal, kolostomi diversi sampai pada rekonstruksi rektal sekunder dengan prosedur *endorectal pull-through*. Pada tahun 1860, meskipun pasien dengan trauma kolorektal ditangani dengan baik pun tetapi luka kebanyakan bersifat fatal. Sejak zaman perang dunia I, penanganan operatif menjadi pilihan utama karena mampu menurunkan tingkat mortalitas menjadi 60-75%. Selama zaman perang dunia II, Sir William Ogilve mengarahkan ahli bedah Inggris untuk melakukan diversi fekal sebagai bentuk penanganan trauma kolorektal dan segera setelahnya, Amerika Serikat pun mengikuti dengan melakukan kolostomi atau "*exteriorization*". Laporan awal menunjukkan tingkat mortalitas menjadi 53 dan 59%, dengan kombinasi yang baik dalam perawatan perioperatif, tingkat mortalitas pun dapat turun menjadi 22% hingga 35%. Kemudian di Vietnam, Lavenson dan Cohen memperkenalkan *distal rectal washout* yang kemudian menyebabkan penurunan jauh angka mortalitas. Sehingga dikenal istilah *"four D"* yang mewakili *debridement, diversion, drainage* dan *distal washout* yang menjadi dasar penanganan pada

trauma anorektal. Meskipun demikian, terjadi perbedaan signifikan antara data militer dan data kependudukan sipil berdasarkan mekanisme trauma, ketersediaan sumber dan beban medis melalui evakuasi di beberapa tempat dan ahli bedah. Tantangan ini ditunjukkan pada tingginya tingkat operasi *damage control* dan laporan tingkat mortalitas sebanyak 14% untuk trauma anorektal. Komplikasi dilaporkan sebanyak lebih dari setengah keseluruhan kasus trauma rektal. Shannon dkk menekankan keuntungan besar dari *distal rectal washout* pada pasien dengan mekanisme trauma energi tinggi pada pelvis atau trauma tembakan/ledakan. Welling dkk mengusulkan diversi pada mekanisme trauma yang tidak diketahui tingkat energinya yang berpotensi merancukan viabilitas anastomosis. Hal ini didukung dari data laporan trauma kolorektal dari Iraq dan Afghanistan dengan kegagalan sebanyak 13% pada anstomosis primer yang lalu akhirnya dikonversi menjadi ostomi. Analisis retrospektif pada 251 kasus mengemukakan terdapat 56,2% rasio diversi dengan mortalitas rendah pada kasus trauma kolorektal jenis apapun (3,7% vs 10,8%). Tinjauan pada 57 pasien dengan trauma ekstraperitoneal, terdapat 7% yang membutuhkan penanganan seluruh tahap *four D*, 100% diversi, 26% *distal washout* dan *drainage presacral* sebanyak 21%. (Clemens et al, 2018)

Oleh Stone dan Fabian yang melakukan uji coba acak (*randomized trial*) mendemonstrasikan rendahnya mortalitas pada pasien dengan *primary colon repair*. Hal ini memicu beberapa evaluasi efektifitas tiap

aspek penanganan pembedahan untuk trauma anorektal. Pengenalan teknik *damage control* membolehkan operasi tahap kedua dengan beberapa kesempatan untuk mempertimbangkan keputusan terbaik tindakan pembedahan selanjutnya. Stone dan Fabian ini kemudian menganjurkan keputusan *primary repair* ataupun diversi didasarkan pada keadaan klinis tiap individu dan menjalankan operasi dalam dua tahap sehingga dapat memberikan penilaian yang lebih baik untuk jaringan yang mengalami trauma. Sebagai tambahan, operasi *damage control* memberikan kesempatan untuk stabilisasi untuk keadaan pasien yang non stabil, koagulopati atau hipotermia yang tidak mampu langsung mendapatkan operasi definitif pada awal penanganan. (Clemens et al, 2018; Mahan et al, 2020)

Berikut adalah *grading* trauma berdasarkan AAST Skala trauma organ rektal (Demetriades et al, 2017)

Grade	Deskripsi Trauma
I a	Kontusio atau hematoma tanpa devaskularisasi
I b	Laserasi dengan ketebalan parsial (*partial thickness*)
II	Laserasi ≤ 50% sirkumferensial
III	Laserasi ≥ 50% sirkumferensial
IV	laserasi ketebalan penuh (*full-thickness*) dengan ekstensi ke perineum
V	Segmen devaskularisasi

2.1.3. Fase Penyembuhan Intestinal

Permukaan traktus gastrointestinal ditutupi oleh sel epitelial yang berfungsi dibawah kondisi fisiologis sebagai lapisan pertahanan yang mencegah antigen luminal masuk ke dalam tubuh. Pada saat terjadi trauma, epitel intestinal akan mengalami proses penyembuhan. Penyembuhan luka intestinal bergantung pada keseimbangan migrasi, proliferasi dan diferensiasi dari struktur sel pada daerah yang terluka. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan beberapa peptida regulator yang beragam, termasuk faktor pertumbuhan dan sitokin, memodulasi epitel intestinal dalam penyembuhan luka. Beberapa penelitian terkini menunjukkan faktor pentng, termasuk *toll-like receptors* (TLR), peptida regulator, beberapa faktor makanan dan beberapa agen gastroprotektif, juga turut berperan dalam memodulasi perbaikan epitelial. Sebagai tambahan, telah dibuktikan aktivasi dari beberapa jaras sinyal spesifik terlibat dalam penyembuhan luka intestinal. (Iizuka et al, 2011)

Sel epitel intestinal membentuk lapisan pertahanan yang memiliki permeabilitas selektif yang memisahkan konten intraluminal dari jaringan di bawahnya. Lapisan epitel gastrointestinal terdiri dari lapisan sel kolumner. Lapisan ini bergerak dengan kecepatan 5-10 μm/h dan diperbaharui tiap 2 hingga 5 hari. Lapisan ini penting dijaga untuk kepentingan pertumbuhan normal, perkembangan dan prevensi penyakit yang mungkin terjadi. Normalnya, lapisan intestinal ini berfungsi sebagai barrier yang mencegah cairan, mikroorganisme, virus dan antigen luminal

memasuki tubuh. Beberapa elemen yang turut berpartisipasi dalam fungsi pertahanan termasuk sel epitelial sendiri dengan jaringan penyambung yang erat *(tight junction)*, adherens *(adherens junction)* dan sekresi luminal seperti mukus. (Iizuka et al, 2011)

Tight junction berfungsi sebagai pintu semi permeabel yang meregulasi pergerakan pasif dari cairan intraluminal melalui jalur paraseluler dan membatasi difusi pasif protein dan lipid diantara membran plasma apikal dan basolateral. Sementara adherens junction penting dalam regulasi adhesi interseluler. Baik *tight junction* dan *adherens junction* berada pada ujung apikal dari membran plasma lateral dan terhubung satu sama lain untuk membantu regulasi dan menjalankan fungsinya. Kedua *junction* ini disebut juga dalam *apical junctional complex* (AJC). (Iizuka et al, 2011)

Meskipun fungsinya sebagai lapisan pertahanan, lapisan pertahanan ini membolehkan beberapa bakteria usus non patologikal (komensal) mengakses sistem imun, yang kemudian membantu dalam menciptakan maturasi sistem imun dan evolusi dari toleransi imun seperti respon inflamasi dan memelihara fungsi homeostasis. (Iizuka et al, 2011)

Sel epitel intestinal *(intestinal epithelial cells*; IEC) dapat dicederai oleh substansia toksik intraluminal, digesti normal, inflamasi, interaksi mikroba, stres oksidatif dan farmaka. Penyembuhan intestinal bergantung pada keseimbangan migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel epitel pada area luka. Tahap pertama, sel epitelial di sekitar area luka akan

kehilangan polaritas selnya sehingga mengalami perubahan morfologi dan melakukan migrasi dengan cepat ke area denudasi untuk tetap menjaga integritas lapisan yang rusak. Proses ini disebut *"epithelial restitution".* Restitusi mulai dalam hitungan menit hingga jam dari trauma dan tidak bergantung pada proses proliferasi. Kemudian, proliferasi epitel mukosa meningkatkan akumulasi eritrosit sehingga dapat menutup defek trauma yang terjadi dalam hitungan jam hingga hari. Terakhir, maturasi dan diferensiasi sel epitelial dibutuhkan untuk menjaga fungsi lapisan mukosa. (Iizuka et al, 2011)

Inflamasi diasosiasikan dengan infiltrasi dari sel imun seperti sel T, makrofag dan neutrofil dan sering juga dikaitkan sebagai penyebab perburukan kerusakan yang terjadi pada jaringan trauma. Pada mukosa intestinal, inflamasi yang berat diikuti dengan hilangnya sel epitel dan degradasi ECM pada lamina propia yang kemudian menyebabkan terjadinya ulserasi. Enzim dan mediator sebagian besar disekresikan oleh monosit, makrofag intestinal dan granulosit. Inflamasi yang berlangsung terus menerus dan degradasi jaringan akan mengarah terjadi fibrosis dan pembentukan striktur. Zat oksidan adalah kontributor penting terhadap destruksi mukosa, submucosa dan jaringan. Metabolit oksigen seperti oksigen atau radikal hidroksida, diproduksi dalam jumlah besar sebagai akibat dari infiltrasi leukosit pada mukosa yang mengalami inflamasi. Dinding intestinal normal memiliki jumlah enzim anti oksidatif yang relatif kecil. Produksi super oksida dan oksigen reaktif lainnya dikatalisasi oleh

membrane-associated nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) *oxidase*. Sistem enzim yang bertanggung jawab terhadap pembentukan superoksida membentuk sistem transpor elektron transmembran yang kemudian menjadi oksidasi NADPH pada permukaan sitoplasma dan superoksida pada membran luar sel. Ini adalah bentuk heterodimer yang tersusun dari glikoprotein 91-kDa dan polipeptida 22-kDa. Sebagai tambahan, sitokrom β heterodimer, 4 faktor sitosolik (p47-phox, p67-phox, p40- phox dan p21 Rac) dibutuhkan untuk aktifitas oksidasi NADPH. Enzim ini dorman pada sel yang beristirahat dan aktif bila terjadi stimulasi. Induksi ekspresi oksidasi NADPH dalam makrofag intestinal dalam mukosa yang mengalami inflamasi dihubungkan dengan peningkatan aktivitas oksidatif. (Rieder et al, 2007)

Selain formasi radikal, infiltrasi dan aktivasi lokal sel imun juga berespon terhadap inflamasi intestinal akibat sekresi perubahan ECM dan enzim degradasi ECM. Hal ini menyebabkan infiltasi dari sel imun dan non imun ke area yang mengalami inflamasi yang akhirnya menyebabkan migrasi dari myofibroblas. Dua grup proteinase mayor yaitu protease serine seperti elastase dan kolagenase (elastin, fibronektin, laminin, kolagen dan proteoglikan) dan matriks metalloproteinase (MMP). Golongan enzim MMP setidaknya terdiri dari 15 jenis dimana 9 diantaranya diekspresikan dalam leukosit. Seluruh MMP mampu mendegradasi komponen ECM. Aktivitas ini diregulasi oleh enzim yang menginhibisi *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP). Keseimbangan

antara degradasi jaringan akibat MMP dan inhibitornya berperan penting dalam kerusakan dinding intestinal selama inflamasi. (Rieder et al, 2007)

Dibawah kondisi normal, proses kerusakan jaringan akibat inflamasi akan berakhir dan diikuti dengan penyembuhan hingga terjadi *restitutio ad integrum*. Bila membran basalis intak, sel epitel residu akan bergerak hingga bertemu dengan sel epithelial yang lain dan membetuk *tight junction*. Proses ini disebut proses restitusi yang dibantu oleh *Growth factor*. Bila defek lebih dalam dan terjadi dengan kerusakan subepitelial, area di bawah membrana basalis akan menggantikan jaringan epithelial yang berada di permukaan. Satu kejadian penting dalam proses ini adalah terjadinya kontraksi dari lamina propia yang berada di bawahnya yang menutupi kerusakan. Penutupan defek yang cepat terjadi penting untuk menurunkan waktu dari berfungsinya kembali lapisan barrier dinding intestinal. Beberapa penelitian terkini telah membuktikan beberapa bentuk translokasi bakteri yang tidak terkontrol dan berlangsung lama dari lumen usus ke dinding mukosa. Proses penyembuhan ini penting dimengerti untuk mencegah translokasi bakteri dan mendeteksi kerusakan lebih dini. Beberapa temuan klinis menyatakan beberapa pasien memiliki angka terjadinya striktur sementara di kasus lain bisa tidak terjadi striktur meskipun inflamasi sedang berlangsung. Tetapi tidak ada bukti autentik yang menunjukkan adanya hubungan langsung antara penyembuhan intestinal dan pembentukan striktur. (Rieder et al, 2007)

Pada saat restitusi, reorganisasi ekstensif aktin sitoskeleton sangat diperlukan. Organisasi dan remodelling dari aktin sitoskeleton dikontrol oleh famili Rho dari GTPase termasuk Rho, Rac, dan Cdc42. Protein ini diimplikasikan dalam formasi *stress fibers,* lamellipodia (proyeksi aktin protein sitoskeletal yang bergerak pada tepi sel) dan filopodia (proyeksi sitoplasmik yang pipih, mirip lamellipodia, yang ekstensi dari tepi sel migrasi yang paling depan). Detailnya, Rho meregulasi *stress fibers* dan adhesi fokal terjadi, Rac meregulasi formasi protrusi lamellipodia dan tepi membran serta Cdc42 memicu ekstensi filopodial pada periferal sel. (Iizuka et al, 2011)

Kemokin dapat dibagi menjadi subset inflamatori dan homeostatik dengan tahap homeostatik diregulasi minimal oleh stimulasi sitokin pro inflamasi. Telah ditunjukkan pada leukosit bahwa Rho-GTPase meregulasi reseptor kemokin homeostatis CXCR4 memediasi kemotaksis atau metastasis pada situs produksi ligan CXCL12 yang asalnya sama. Moyer dkk mendemonstrasikan CXCL12 meningkatkan Rho-GTP dan lokalisasi F-actin pada tepi situs sel epitel yang terluka dan lapisan T84. Sejak Rho-GTP diketahui diperlukan untuk protrusi membran dalam lapisan sel intestinal, dipostulasikan bahwa aktivasi CXCR4 dan lokalisasi Rho dapat memfasilitasi formasi lamella yang dibutuhkan pada proses penyembuhan. Diperkirakan pula fungsi CXCR4 dan CXCL12 sebagai mukosa autokrin dan parakrin mengirim sinyal yang meregulasi

kompetensi lapisan epitelial yang mampu bertahan dari trauma dan mediasi perbaikan setelah perlukaan. (Iizuka et al, 2011)

Defensin merupakan molekul penting yang berpartisipasi sebagai host pertahanan dalam membunuh mikroba. Seperti reseptor kemokin homeostatik CXCR4, reseptor kemokin CCR6 diekspresikan oleh sel dendritik imatur dan sel T yang bersirkulasi, yang menuntun untuk mencari jejak dimana perlukaan dan inflamasi yang selanjutnya berikatan dengan ligan kemokin CCL20. Vongsa dkk mendemonstrasikan β-defensin pada manusia dan CCL20 menstimulasi akumulasi F-actin, fosforilasi dari rantai ringan myosin dan RhoA dan migrasi restitutif dari sel IEC-6. Temuan ini menunjukkan kemokin dan β-defensin merupakan molekul pertahanan host yang protektif yang berfungsi tidak hanya merekrut sel imun dan membunuh mikroba tetapi juga meningkatkan efisiensi penyembuhan luka pada usus. Annexin 2 adalah protein terikat fosfolipid dependen kalsium yang juga memainkan peran dalam regulasi aktin sitoskeleton dan diimplikasikan dalam migrasi sel. Telah ditunjukkan bahwa annexin 2 meregulasi migrasi IEC dan penutupan luka melalui jaras sinyal Rho dan remodelling aktin sitoskeleton yang berhubungan. (Iizuka et al, 2011)

Beberapa penelitian sebelumnya telah mengemukakan beberapa *growth factor* seperti transforming growth factor (TGF)-α dan TGF-β, *epidermal growth factor* (EGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *keratinocyte growth factor* (KGF), *insulin-like growth factor* (IGF)-I dan IGF-II], sitokin interleukin (IL)-1β dan IL-2, dan peptida

trefoil meningkatkan restitusi dan proliferasi dari IEC. Sebagai kontras, *platelet-derived growth factor* (PDGF), IL-6, dan *tumor necrosis factor* (TNF)-α tidak memiliki efek pada migrasi sel. Proses angiogenesis sendiri dipicu oleh VEGF, FGF, PDGF-B dan TGF-β. Dengan bantuan interferon (IFN)-γ, dari penelitian sebelumnya, menunjukkan IFN-γ meningkatkan restitusi sel hingga 3,8 kali lipat. Meskipun demikian, IFN-γ juga menginhibisi migrasi enterosit dengan mencegah komunikasi inter-enterosit *gap junction*. (Iizuka et al, 2011)

Beberapa kerja dari peptida regulatori yang berperan dalam penyembuhan luka antara lain TGF-β diketahui sebagai faktor sentral yang berkontribusi secara intrinsik dalam restitusi dari IEC yang cedera, meskipun dia menginhibisi proliferasi IEC. Penting diketahui bahwa sitokin (IL-1β, lL-2), EGF, FGF, HGF dan TGF-α mempromosikan restitusi sel epitelial melalui produksi bioaktif TGF-β yang selanjutnya masuk dalam jaras dependen TGF-β. Sedangkan TGF-α memediasi efek stimulasinya pada proliferasi dan restitusi dari IEC melalui mekanisme yang berbeda. Keduanya ini melalui jarasnya masing-masing lalu memicu proliferasi IEC melalui aktivasi *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/ERK2 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). (Iizuka et al, 2011)

Telah dibuktikan beberapa aktivasi dari sinyal yang berbeda terlibat dalam perbaikan cedera epitel intestinal. El-Assal dkk mendemonstrasikan *heparin binding epidermal growth factor-like growth factor* (HBEGF) meningkatkan restitusi intestinal in vivo dan in vitro dalam model

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt- dan *MAPK/ERK kinase (MEK)/ERK1/2-dependent.* Oleh Dise dkk, menggunakan model tikus, pada lapisan epitel, menunjukkan PI3K dan kaskade sinyal Src bekerja sama dengan Rac dan memicu migrasi IEC sebagai respon terhadap EGF. Pada penelitian lain ditunjukkan aktivasi ERK1/2 MAPK atau PI3/Akt memainkan peran penting dalam regulasi proliferasi epitel intestinal, pertahanan dan penyembuhan. Penelitian terbaru menunjukkan *nuclear factor* (NF)-κB tidak hanya sebagai pro inflamatori tetapi juga memiliki fungsi proteksi jaringan pada IEC. Sebagai tambahan, Pickert dkk melaporkan dengan menggunakan pemodelan tikus yang dibuat pingsan dengan penghambatan transduser sinyal spesifik IEC dan aktivator transkripsi (STAT)3 yang meregulasi homeostasis imun pada pencernaan dengan memicu IL-22 dalam penyembuhan luka mukosal. Trem2 merupakan reseptor permukaan sel yang spesifik menginduksi makrofag oleh IL-4/IL-13. Seno dkk menunjukkan sinyal Trem2 memicu penyembuhan luka yang efisien dari cedera mukosa colon dengan menghambat sitokin yang dapat meningkatkan aktivasi makrofag M1 dan dengan memicu sitokin yang bisa memicu aktivasi makrofag M2. (Iizuka et al, 2011)

Penelitian terdahulu menunjukkan prostaglandin (PG)E2 memainkan peran mayor dalam regenerasi kripte epitelial dan prevensi penurunan proliferasi sel epitel setelah radiasi atau cedera intestinal akibat induksi dextran sodium sulfat (DSS). Prostaglandin mukosal

disintesis dari arakidonat oleh *cyclooxygenase* (COX)-1 atau COX-2. Oleh karenanya, dikatakan pula COX-1 dan COX-2 memainkan peran krusial dalam pertahanan mukosa intestinal. Brun dkk menunjukkan *neuropeptide neurotensin* (NT) secara signifikan meningkatkan level mRNA COX-2 dan menstimulasi pelepasan PGE2 dalam sel colonic HT29. Dibuktikan pula NT secara signifikan meningkatkan migrasi sel HT-29 ke area denudasi. Ini menunjukkan PGE2 menurunkan apoptosis dalam intestinal melalui transaktivasi EGFR, meningkatkan aktivasi Akt dan menurunkan translokasi Bax dari sitoplasma ke mitokondria. (Iizuka et al, 2011)

Interaksi mesenkimal-epitelial penting untuk morfogenesis usus yang tepat. Interaksi ini memainkan peran penting dalam penyembuhan epitel intestinal. Epimorphin diekspresikan pada permukaan sel mesenkimal pada beberapa organ, termasuk mukosa intestinal dan diduga memainkan peran pula dalam morfogenesis sel epitel. Ditemukan bahwa epimorphin memiliki fungsi penting dalam restitusi IEC di bawah stres oksidatif melalui aktivasi reseptor EGF dan MEK/ERK, PI3K/Akt. Kemudian HGF, FGF dan KGF juga disekresikan oleh sel mesenkimal. Goke dkk menunjukkan fibroblas, yang berasal dari mesenkimal primitif, memicu proliferasi intestinal disamping mempengaruhi respon sekretori, diferensiasi dan morfogenesis serta fungsi ini secara predominan dimediasi oleh kerja parakrin HGF. Pada salah satu penelitian ditunjukkan bahwa domain *Muc3 mucin cysteine-rich, hypoxia-inducable factor* (HIF)

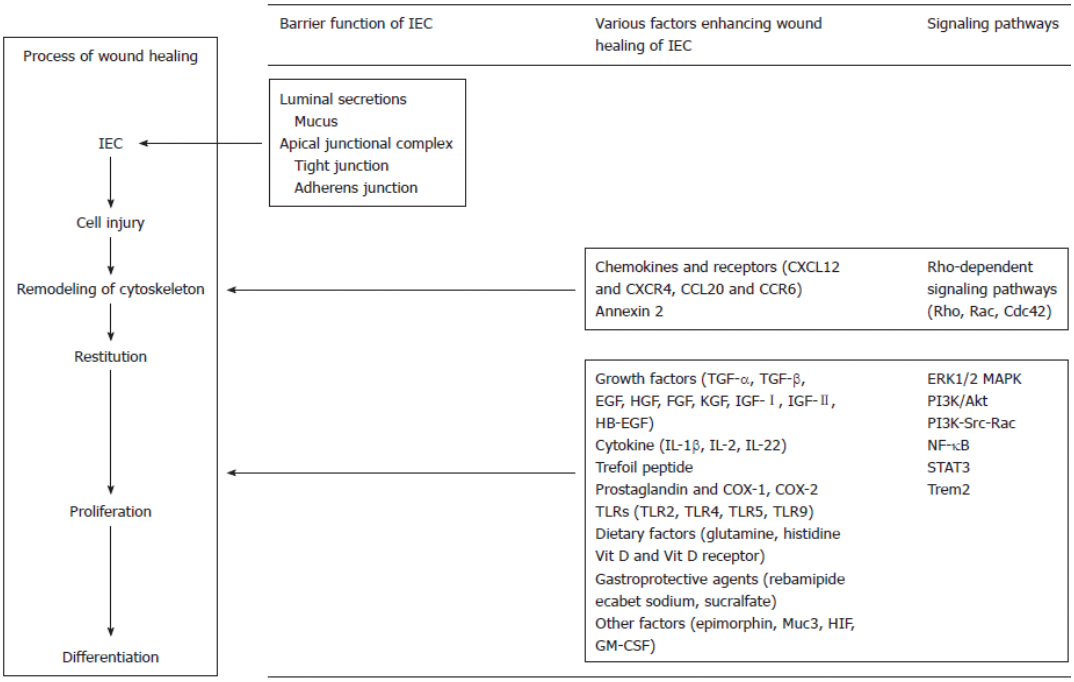
dan *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) memperbaiki penyembuhan luka dari mukosa kolon. (Iizuka et al, 2011)

Tabel 1. Beberapa faktor pemicu atau penghambat proses penyembuhan luka epitel intestinal dan mukosa (Iizuka et al, 2011)

Categories	Factors	Promoting effect	Inhibitory effect	No effect	Models
(Chemokines)	CXCL12	+			Cells[2]
	CCL20, defensins	+			Cells[19]
Annexin 2		+			Cells[33]
(Growth factors)	TGF-α	+			Cells[21,44]
	TGF-β	+			Cells[40]
	EGF, HB-EGF	+			Cells[11,21]
	HGF	+			Cells[36]
	FGF	+			Cells[35]
	KGF	+			Cells[35], rat[37]
	IGF- I , - II	+			Mice[38], cells[39]
(Cytokines)	IL-1β	+			Cells[21]
	IL-2	+			Cells[41]
	IFN-γ	+[21]	+[5]		Cells[21], mice and cells[5]
	PDGF, IL-6, TNF-α			+	Cells[21]
Trefoil peptide		+			Cells[42]
Prostaglandin, COX-1, COX-2		+			Mice[51-54]
(Toll-like receptors)	TLR2	+			Mice and cells[92-94,97]
	TLR3	+[95]	+[96]		Mice[95], cells[96]
	TLR4	+[97-99]	+[100]		Mice[97-99] and cells[100]
	TLR5	+			Mice and cells[101,102]
	TLR9	+			Mice[103-105]
(Dietary factors)	Glutamine	+			Rats[6], cells[68]
	Histidine	+			Mice[7]
	Vit D	+			Mice and cells[72]
(Gastroprotective agents)	Rebamipide	+			Rats[8,77]
	Ecabet sodium	+			Cells[9] and rats[79]
	Sucralfate	+			Cells[10]
(Other factors)	Epimorphin	+			Cells[60]
	Muc3	+			Mice and cells[62]
	HIF	+			Mice[63]
	GM-CSF	+			Mice[64]

Keterangan: COX: Cyclooxygenase; TGF: Transforming growth factor; EGF: Epidermal growth factor; HB-EGF: Heparin-binding epidermal growth factor; HGF: Hepatocyte growth factor; FGF: Fibroblast growth factor; KGF: Keratinocyte growth factor; IGF: Insulin-like growth factor; IL: Interleukin; IFN: Interferon; PDGF: Platelet-derived growth factor; TLR: Toll-like receptor; HIF: Hypoxia-inducible factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor; TNF: Tumor necrosis factor

Tabel 2. Beberapa faktor dan alur sinyal yang berkontribusi dalam proses penyembuhan luka sel epitelial intestinal dan mukosa intestinal (Iizuka et al 2011)



Keterangan: IEC: Intestinal epithelial cell; TGF: Transforming growth factor; EGF: Epidermal growth factor; HGF: Hepatocyte growth factor; FGF: Fibroblast growth factor; KGF: Keratinocyte growth factor; IGF: Insulin-like growth factor; HB-EGF: Heparin-binding epidermal growth factor; IL: Interleukin; COX: Cyclooxygenase; TLR: Toll-like receptor; HIF: Hypoxia-inducible factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; MAPK: Mitogen-actiBvated protein kinase; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; NF: Nuclear factor; STAT: Signal transducer and activator of transcription

Setelah terjadi perlukaan, proses perbaikan jaringan dan penyembuhan luka akan terus berlangsung hingga terjadinya pembentukan jaringan baru ataupun *scar*. Terkait dengan kemampuan kontraktil dan migrasi dan kemampuan protein matriks mensekresi dan peran dari *growth factor*, fibroblast, myofibroblast dan sel otot polos

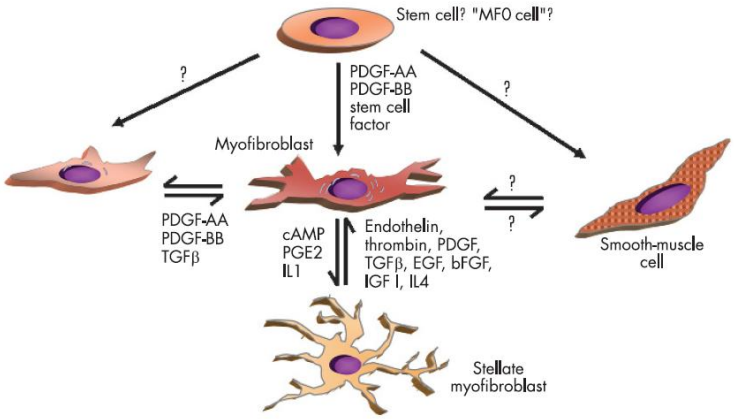
memiliki peran penting dalam rekonstruksi dan porses penyembuhan. (Rieder et al, 2007)

Beberapa tahun terakhir terdapat bukti adanya fenotip herediter diantara fibroblast secara umum beredar dan fibroblast yang secara khusus berada diantara dinding usus. Beberapa tipe fibroblast memiliki sifat seperti sel otot polos. Sel-sel ini kemudian disebut myofibroblast. Myofibroblast berperan penting dalam pertumbuhan jaringan dan perkembangan diferensiasi jaringan. Dalam hal ini, myofibrolast menjadi bagian penting dari penyembuhan luka dan bisa juga menjadi pencetus terjadinya fibrosis dan stenosis. (Rieder et al, 2007)

Pada mukosa usus, ada dua tipe fibroblast yang ditemukan memiliki fungsi fisiologis. Disamping myofibroblast subepitelial, sel interstitial “Cajal” memiliki fenotip myofibroblast. Sel Cajal terletak di submukosa dan muskularis propria yang berhubungan dengan lapisan otot polos dari usus. Tetapi belum diketahui apakah myofibroblast subepitelial dan sel Cajal berdiferensiasi dari sel prekursor yang sama. Kedua tipe myofibroblast ini membentuk sebuah jaringan atau “*syncytium”,* meskipun belum jelas apakah ada hubungan antara kedua sel ini. Myofibroblast subepitelial kebanyakan terletak di dasar kripte usus pada lamina propria memiliki morfologi dan karakteristik khusus. Kapasitas fungsional mereka belum banyak diketahui. Mereka membentuk jaringan tiga dimensi dan berkomunikasi melalui *gap* dan *adherens junction,* tetapi juga memiliki koneksi dengan sel epithelial melalui fenestrasi pada

membran basalis. Mereka juga berinteraksi dengan makrofag usus. (Rieder et al, 2007)

Sel Cajal interstitial memiliki fenotip V atau VM, myofibroblast subepitelial memiliki tipe VA. Keberadaan PDGF esensial dalam diferensiasi dan perkembangan myofibroblast. Disamping PDGF dan TGF β, *Insulin Like Growth Factor 1* dan IL-4 bisa menjadi faktor yang relevan untuk transdiferensiasi dari fibroblast menjadi myofibroblast. (Rieder et al, 2007)



Gambar 5. Jalur myofibroblast. Myofibroblast subepitelial dan sel intestitial Cajal-like T cells berdiferensiasi dari prekursor umum. Myofibroblasts aktif dapat bertransdiferensiasi menjadi sel stellata. (bFGF, *basic fibroblast growth factor*; EGF, *epidermal growth factor;* IGF, *insulin-like growth factor*; IL, *interleukin;* PDGF, *platelet-derived growth factor;* PGE2, *prostaglandin E2*; TGF, *transforming growth factor*) (Rieder et al, 2007)

Aktivasi singkat dari myofibroblast atau fibroblast membutuhkan dukungan oleh adanya molekul ECM. Degradasi fibronektin oleh MMP yang disekresi oleh makrofag dapat menyokong interaksi dari fibroblast atau myofibroblast dengan *extra* domain (ED)-A dari fibronektin, diikuti dengan stimulasi singkat dari sel mesenkimal. Domain ED-A dari

fibronektin muncul saat terjadi kerusakan jaringan bahkan dapat dipicu oleh TGF-β dari α-SMA. Variasi dari fibronektin, ED-A merupakan faktor induksi penting terjadinya migrasi. Analisis protein fibrinektin dalam mukosa intestinal dengan pemeriksaan imunohistokimia menunjukkan penurunan jumlah dari fibronectin ED-A dan ED-B pada pasien dengan penyakit inflamasi intestinal. Pada kasus fistula, ED-A dan ED-B tidak ditemukan. Pada mukosa yang mengalami fibrotik, protein yang isoform ini meningkat. (Rieder et al, 2007)

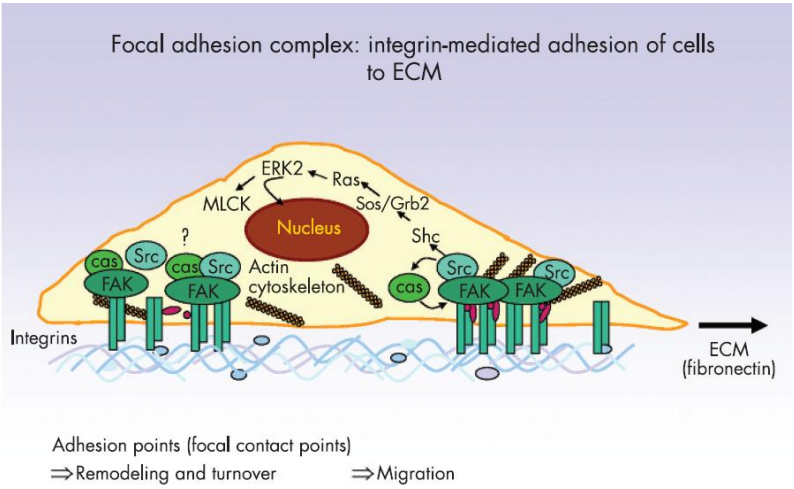
Tipe myofibroblast fibrogenik diduga kuat terdapat pada fibrosis intestinal. Beberapa temuan klinis dan eksperimental menunjukkan pada penyembuhan luka normal, fibroblast dapat mempengaruhi morfologi dan biokimiawi sel otot polos termasuk ekspresi α-SMA. (Rieder et al, 2007)

Migrasi myofibroblast pada ECM merupakan kejadian fundamental pada fase awal penyembuhan luka. Setelah terjadinya penyembuhan luka dan gradien kemotaktik disekresikan oleh mediator inflamasi telah menurun, migrasi fibroblast akan mereda. Migrasi myofibroblast subepitelial dapat distimulasi oleh faktor autokrin dan parakrin. PDGFA, PDGFB, TBGβ-1, IGF1 dan EGF dapat meningkatkan migrasi myofibroblast intestinal. Seluruh faktor ini dapat menyebabkan peningkatan jumlah migrasi myofibroblast. Sebagai tambahan efek kemotaktik, *growth factor* juga menstimulasi terjadinya kemotaksis. *Growth factor* sendiri tidak dapat menginduksi migrasi myofibroblast intestinal. Fibronektin bisa disintesis oleh myofibroblast dalam jumlah besar,

bertanggung jawab terhadap induksi autokrin dalam migrasi myofibroblast intestinal. Myofibroblast dari mukosa normal memiliki nilai migrasi yang bisa diinduksi dengan inkubasi TNF atau Interferon-γ. Pada organ lain, potensi migrasi fibroblast pada jaringan yang rusak bergantung pada tipe penyakitnya. Fibroblast dari jaringan fibrosis yang padat menunjukkan potensi migrasi yang tinggi terhadap PDGF. Pontz dkk menunjukkan strain fibroblast yang diperiksa dari pasien dengan mukopolisakaridosis menunjukkan stimulasi kemotaktik yang sangat rendah. Penelitian ini menunjukkan perubahan potensi migrasi sel mesenkimal dihubungkan dengan perkembangan fibrosis tergantung pada tiap-tiap organ. Mereka juga menunjukkan pathogenesis tiap penyakit memiliki potensi migrasi yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan fibroblast dan myofibroblat berespon sebagai program dan bukan sebagai penyebab fibroblast. (Rieder et al, 2007)

Tyrosine phosphorylation dari *p125 focal adhesion kinase* (FAK) adalah regulator utama migrasi sel pada tubuh. FAK merupakan non-reseptor protein tirosin kinase yang terlibat dalam kontrol yang dimeidasi integrin dalam perilaku sel. Jumlah protein FAK sitosolik dan fosforilasinya, normalnya meningkat pada saat migrasi sel. FAK mengalami fosforilasi di beberapa tempat, termasuk tirosin 397 yang merupakan marker aktivasi FAK. Fosforilasi pada residu ini akan menghasilkan ikatan Src homolog untuk protein adpator dan sinyal yang berbeda. Defisiensi fibroblast FAK akan menyebabkan defek jumlah

migrasi dan peningkatan jumlah tempat kontak substrat sel. (Rieder et al, 2007)

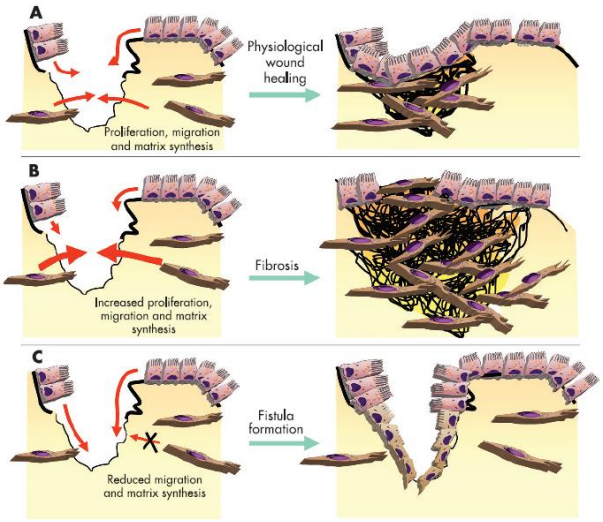


Gambar 6. Mekanisme migrasi myofibroblast. Reseptor integrin ekstraseluler melakukan kontak langsung dengan ECM dan menyediakan sinyal ECM untuk induksi migrasi. *Focal adhesion kinase* (FAK) dihubungkan dengan kerja integrin dan setelah mengalami fosforilasi aktif kemudian akan masuk ke dalam kaskade transduksi sinyal. Kemudian aktin sitoskeleton terbentuk dan titik kontak fokal yang memiliki jumlah molekul integrin banyak akan bermigrasi. (Rieder et al, 2007)

Perubahan myofibroblast intestinal mengalami perubahan fungsional persisten ditandai oleh berkurangnya potensi migrasi yang ditunjukkan dengan reduksi protein FAK dan fosdorilasi FAK. Juga efek dari TNF dan IFN γ. (Rieder et al, 2007)

Sementara itu, dalam patofisiologi terjadinya formasi striktur intestinal, peningkatan proliferasi lokal dari myofibroblast mukosa bisa terjadi. Peningkatan rasio proliferasi tetapi rendahnya potensi migrasi bisa menyebabkan hal tersebut. Sebagai konsekuensi, hal ini bisa memicu terjadinya kontraksi dari jaringan luka yang inefektif dan peningkatan deposit ECM yang lalu akhirnya menjadi jaringan fibrotik. Di lain pihak,

pada keadaan dimana potensi migrasi yang menurun pada area transmukosa yang mengalami inflamasi kronik, diikuti proliferasi dari sel epitelial dapat memicu terjadinya fistula. Dari sini dapat disimpulkan bahwa inflamasi kronik maupun rekuren dapat memicu kerusakan jaringan yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis. (Rieder et al, 2007)



Gambar 7. Skema representasi dari (A) penyembuhan luka normal, (B) fibrosis dan (C) formasi fistula, dengan efek fibroblasts. Pada kasus fibrosis, peningkatan proliferasi, migrasi dan sintesis matriks muncul. Pada patogenesis fistula, penurunan migrasi myofibroblast dan sintesis ECM menjadi masalah. (Rieder et al, 2007)

Sintesis kolagen dan deposit matriks kemudian diinduksi oleh TGF. TGFβ merupakan mediator pro-fibrogenik terkuat dan terdistribusi secara meluas di tubuh. Perannya pun esensial dalam respon fisiologi jaringan yang trauma dan terlibat dalam fibrosis patologik. Peningkatan level TGFβ untuk fibrogenesis jaringan di beberapa kasus penyakit dan diperkirakan menjadi salah satu pencetus terjadinya fibrotik pada kasus pemberian

kemoterapi dan radioterapi. Peran TGFβ dalam keseimbangan sintesis ECM dan degradasinya, induksi peningkatan sintesis komponen matriks dan penurunan aktivitas proteolitik ECM akan menghasilkan proses fibrogenesis dan perubahan komposisi ECM. Inhibisi TGF dapat menurunkan fibrosis tetapi dapat juga meningkatkan kerusakan jaringan dan perpanjangan proses inflamasi. (Rieder et al, 2007)

Untuk nutrisi, terdapat beberapa nutrien yang efektif dalam memelihara remisi klinis dan mengurangi gejala akibat efek trauma. Meskipun beberapa efektifitas dari nutrisi tersebut karena rendah antigen, konten rendah lemak, modulasi aliran bakteri komensal, tetapi telah dilaporkan konstituen asam amino berperan dalam penyembuhan epitel intestinal dan mukosa. Contohnya glutamin, asam amino bebas yang paling banyak beredar di aliran darah, merupakan asam amino non-esensial yang esensial untuk homeostasis usus dan merupakan substrat respiratori esensial untuk sel pada mukosa usus halus. Glutamin enteral dapat menstimulasi sintesis protein mukosa intestinal dan proteksi terhadap apoptosis. Larson dkk menunjukkan suplementasi glutamin dapat menstimulasi pertumbuhan IEC dan mencegah apoptosis dan aktivasi ERK merupakan kontributor penting terhadap kelangsungan sel intestinal dimediasi glutamin. Sukhotnik dkk mengevaluasi efek preventif dari suplementasi glutamin oral dalam *intestinal ischemia-reperfusion injury*. Telah dilaporkan bahwa pretreatment dengan pemberian glutamin oral dapat mencegah kerusakan mukosal dan mempersingkat waktu

penyembuhan yang diakibatkan *ischemia-reperfusion injury* melalui stimulasi proliferasi sel dibanding inhibisi apoptosis sel. (Iizuka et al, 2011)

Beberapa contoh lain nutrisi yang membantu adalah histidin, mengurangi kerusakan hstologikal dan ekspresi TNF-α dengan menginhibisi aktivasi NF-κB diikuti dengan penurunan regulasi produksi sitokin proinfalamsi oleh makrofag. Sedangnakn vitamin D pada kultur sel dalam bentuk 1,25-dihidrokis-vitamin D3 meningkatkan *tight junction* secara signifikan dan menstimulasi migrasi sel epitel secara in vitro. (Iizuka et al, 2011)

2.1.4. *Epidermal Growth Factor* (EGF)

Epidermal growth factor (EGF) adalah asam amino yang berperan penting dalam regulasi pertumbuhan sel, survival, migrasi, apoptosis, proliferasi, dan diferensiasi. EGF sangat penting dalam proses epitelisasi dalam penyembuhan luka karena menginduksi fibroblas untuk bermigrasi, bertumbuh dan mempercepat penyembuhan. Sebagai tambahan, EGF juga telah terbukti di beberapa penelitian sebagai regulator intestinal dan faktor protektif mucosal yang membantu untuk melindungi integritas *barrier* intestinal, yang sangat esensial dalam absorbsi nutrien, maturasi sel intestinal dan memelihara homeostasis sel intestinal. (Tang et al, 2016)

Epidermal Growth Factor tersusun dari 53 asam amino yang diisolasi dari kelenjar submaksilar tikus oleh Stanley Cohen pada tahun

1962 sebagai bagian dari temuan growth factornya atas kemenangannya di Nobel Prize. Famili EGF terdiri dari empat anggota, yaitu EGF, heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF), amphiregulin, dan TGF-α, memiliki peran penting dalam proses regulasi pertumbuhan, ketahanan hidup, proliferasi dan diferensiasi pada mammalia. Semua anggota famili EGF memiliki struktur yang mirip, memiliki reseptor pada permukaan sel dan memiliki efek biologis yang serupa serta membutuhkan aktivasi dari MMP atau ADAM (disintegrin dan metalloproteinase). (Demidova et al, 2012)

Pada kelenjar autokrin, parakrin dan juxtakrin, anggota famili EGF berikatan dan mengaktivasi famili ErbB (ErbB1-4) dari reseptor tirosin kinase. Ikatan ligan ini membentuk formasi homodimer dan heterodimer, autofosforilasi dari residu tirosin sitoplasmik dan aktivasi jaras sinyal intraseluler termasuk Ras/MAPK, PLCγ/PKC, PI3K/Akt dan JAK/STAT. TGFα diproduksi oleh platelet, makrofag, limfosit dan keratinosit. Aktivasinya dipengaruhi oleh ADAM17. Efek seluler TGFα dimediasi oleh reseptor ErbB1 yang ada pada keratinosit, sel endotel dan fibroblast. Pada keratinosit, TGFα bekerja pada parakrin dan autokrin untuk menstimulasi migrasi dan proliferasi pada ekstensi tertentu. Efek TGFα pada fibroblast dan sel endotel identik dengan EGF. Dimana pada kasus defisien TGFα, tidak terjadi pembentukan jaringan granulasi dan terjadi abnormalisasi epitelisasi. (Demidova et al, 2012; Oda et al, 2005; Hardwicke et al, 2008)

Epidermal growth factor disekresikan oleh platelet, makrofag, fibroblasts dan sumsum tulang yang berasal dari sel-sel punca mesenkimal. Disintesis pada membran sel dan diolah oleh ADAM10 dan fungsinya dipengaruhi oleh beberapa jenis protease. EGF merupakan stimulator poten epitelisasi, angiogenesis, proliferasi fibroblast dan kelangsungan hidup sel. Efek seluler EGF dimediasi oleh reseptor ErbB1. Pada keratinosit, aktivasi ErbB1 oleh EGF membutuhkan bantuan reseptor urokinase untuk kemudian berperan dalam peningkatan proliferasi sel, migrasi dan deposit laminin (rantai γ2) via ativasi dari jalur MAPK/ERK1/2. Pada sel endotel, sinyal EGF (juga HB-EGF) lewat PI3K dan MAPK menginduksi migrasi dan pembentukan vaskular, tetapi bukan proliferasi. Efek EGF pada fibroblast dimediasi oleh sinyal dari PI3K-, Rac- dan *ERK-dependent* yang menyebabkan peningkatan produksi MMP dan proliferasi sel. (Demidova et al, 2012; Oda et al, 2005; Hardwicke et al, 2008; Berlanga-Acosta et al. 2011)

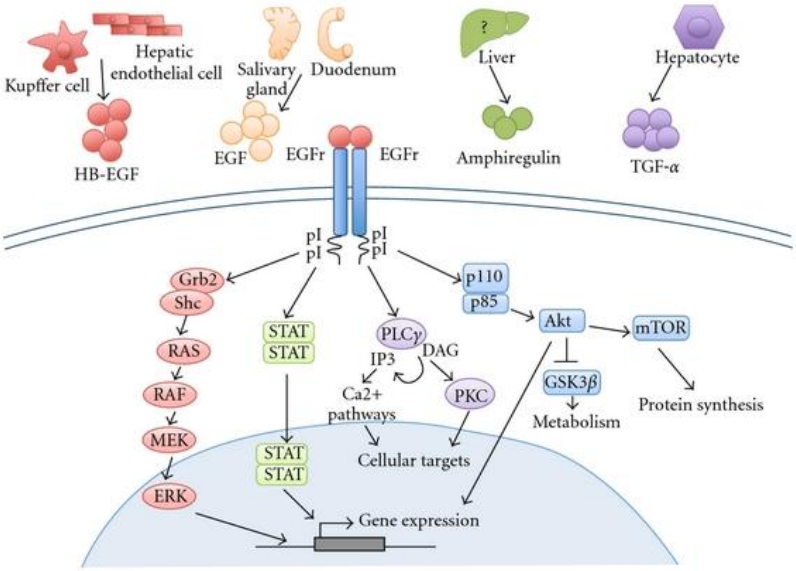
Heparin-binding EGF-like growth factor merupakan anggota famili EGF yang juga penting dalam penyembuhan. Diproduksi oleh makrofag, sel hemopoetik, sel endotel, sel otot polos vaskular dan keratinosit. Ekspresi HB-EGF diregulasi dalam jaringan tertentu; pada keratinosit, diinduksi oleh cedera dan stres dan dimediasi oleh p38 MAPK, PKC, Ras dan ERK. Aktivasi HB-EGF pada membran dicapai oleh metalloproteinase seperti MMP-3 dan anggota famili ADAM, terutama ADAM 9 dan 17 dan juga dicetuskan oleh stres seluler. Lebih jauh lagi, enzim eksogen,

terutama kolagenase yang berasal dari *Clotridium histolyticum* juga dapat mengaktivasi HB-EGF. HB-EGF dalam bentuk aktif, dalam bentuk terlarut, berinteraksi secara langsung dengan ErbB1, ErbB3 dan ErbB4 dan stimulator poten migrasi keratinosit dan epitelisasi. HB-EGF juga mengaktivasi PI3K, MAPK dan sintesis nitrit oksida endotelial dan merangsang angiogenesis. (Demidova et al, 2012)

Meskipun aktivasi reseptor ErbB umumnya muncul setelah ikatan ligan tertentu, beberapa fungsi reseptor ErbB merupakan ligan EGF bebas. Pada saat proses penyembuhan, respon *ErbB1 receptor-mediated keratinocyte* tidak bergantung dengan EGF-ErbB. Lebih jauh lagi, molekul ECM tenascin C dan laminin 332 melibatkan proses perbaikan, dan berikatan dan mengaktivasi reseptor EGF dan proliferasi fibroblast. (Demidova et al, 2012)

Peran anggota famili EGF pada penyembuhan luka tidak terbatas pada keratinosit, fibroblast dan sel endotel saja. Faktor ini juga merupakan penginduksi poten mediator inflamasi dan reseptornya. Singkatnya, TGF-α menginduksi ekspresi beberapa Toll-like receptor (TLR5 dan TLR9) dan meningkatkan respon TLR pada ligannya (bacterial flagelllin dan sekuens DNA bakteri *unmethyllated),* kemudian meningkatkan produksi peptida antimikrobial dan interleukin proinflamasi. Produksi mediator inflamasi penting lainnya, nitris oksida yang diproduksi oleh nitrit oksidase juga diregulasi oleh EGF dan HB-EGF. Secara in vitro, EGF dan HB-EGF menginduksi keratinosit produksi VEGF dan fibroblast FGF-2. Jadi dapat

disimpulkan bahwa famili anggota EGF esensial dalam segala aspek penyembuhan luka. Mereka merupakan modulator penting dalam respon inflamasi, baik secara langsung maupun tidak langsung menstimulasi reepitelisasi dan berkontribusi dalam angiogenesis dan formasi jaringan granulasi dimana EGF sendiri sangat penting dalam proses perbaikan jaringan dan trauma. (Demidova et al, 2012.)



Gambar 8. Jalur sinyal induksi EGFR. Transduksi sinyal EGFR menginduksi jalur EGFR seperti RAS-MAPkinase, PI3K-AKT, PLC*γ*, and Stat. Secara kolektif, jalur ini mengontrol proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan kelangsungan hidup sel (I'Hortet AC, Gilgenkrantz et al, 2012)

Pada kasus luka yang berlangsung kronik, ditemukan tingkat EGF dan EGFR yang inadekuat. Karena itu, beberapa uji coba klinis dalam pemberian terapi dalam bentuk EGF eksogen telah dilakukan. Beberapa bentuk derivatif growth factor telah banyak digunakan untuk meningkatkan laju penyembuhan dan respon trauma. Sebagai contoh, EGF dicampurkan

dalam *collagen-binding domain* (CBD) mampu mengikat kolagen tipe I, II, III dan IV dengan afinitas tinggi dan meningkatkan laju pertumbuhan keratinosit. Pada hewan percobaan, EGF dicampurkan dalan fibronektin CBD-EGF mampu meningkatkan epitelisasi luka. Beberapa modifikasi ini menunjukkan pertumbuhan vaskularisasi dan perbaikan jaringan dengan kecepatan berkali lipat dan dapat secara sukses masuk ke dalam jaringan luka. (Demidova et al, 2012; Jackson et al, 2017)

Pada gastrointestinal yang mengalami cedera, proses restitusi ditandai dengan pemipihan sel dan mengadopsi bentuk skuamoid untuk menutup defek luka yang ada, diikuti dengan proses proliferasi dan maturasi epitel serta diferensiasi. EGF terbukti berperan dalam proses penyembuhan dalam mukosa gastrointestinal yang mengalami trauma. Pada kasus ulserasi, terdapat sekresi EGF yang meningkat berlipat ganda pada tepi luka yang kemudian berkontribusi dalam perbaikan ulkus. Suplementasi EGF telah didemonstasikan dan menunjukkan perbaikan mukosa dan regenerasi di beberapa kondisi. Pada model contoh hewan babi misalnya, dengan pemodelan pemberian skleroterapi oral, pemberian EGF terbukti menurunkan kejadian ulkus esofagus, formasi striktur dan kerusakan histologikal mukosa. Beberapa kasus percobaan tikus, pemberian EGF mampu memperbaiki penyembuhan ulkus pada gaster dan melindungi intestinal dari perubahan patologikal akibat perlakuan gliadin dan interferon gamma dibanding pemberian medikamentosa. Pada manusia, penggunaan EGF secara klinis masih sangat terbatas. Terdapat

satu laporan kasus pada bayi manusia usia 8 bulan dengan necrotizing enterocolitis dalam keadaan kritis dan nekrosis intestinal yang tidak dapat diselamatkan kemudian diberikan EGF intravena selama 4 hari dapat bertahan hidup dengan penyembuhan sempurna pada intestinal. (Rowland et al, 2013, Sullivan et al, 1991)

2.1.5. Platelet Rich Plasma (PRP)

Platelet Rich Plasma (PRP) telah muncul sebagai matriks baru yang mampu meningkatkan ketahanan *fat graft.* PRP diderivasi dari *whole blood* melalui sentrifugasi *double-spin* mengandung banyak *growth factor* dan *molekul α-granules.* PRP dinilai lebih aman dan lebih praktis dalam penerapannya dibanding terapi rekombinan menggunakan sel punca ataupun *growth factor.* (Liao et al, 2014; Lai F et al, 2018)

Platelet Rich Plasma (PRP) sendiri adalah konsentrat autolog platelet yang melebihi nilai normal pada hitung platelet dalam plasma. Platelet dalam jumlah besar menghasilkan keuntungan klinis. Platelet terdiri dari dua tipe granula, α-*granules* dan *dense granule.* Setidaknya ditemukan tujuh faktor pertumbuhan dalam α-*granules* untuk menginisiasi penyembuhan luka. Faktor-faktor pertumbuhan yang dimaksud antara lain *platelet-derived growth factor (PDGF-AA, PDGF-BB,* dan *PDGF-AB), transforming growth factor-β (TGF-β1* dan *TGF-β2), vascular endothelial growth factor (VEGF),* dan *epithelial growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF-I, IGF-II), fibroblast growth factor (FGF), endothelial cell*

growth factor (ECGF) dan platelet-derived angiogenesis factor (PDAF). Selain itu, ditemukan juga protein yang bekerja sebagai molekul adhesi seperti fibrinogen, fibronektin dan vitronektin. Sedangkan pada *dense granules* ditemukan faktor bioaktif yang juga berperan dalam penyembuhan seperti serotonin, histamin, dopamin, kalsium dan adenosin. (Liao et al, 2014)

PRP merupakan koktail natural dari *growth factor.* Diferensiasi adipogenik dipengaruhi oleh proses kompleks melibatkan beberapa hormon dan *growth factor.* Ditemukan bahwa EGF yang dilepaskan dari PRP mendorong proliferasi sel endotel dan menunjukkan sifat sebagai aktivator penting diferensiasi sel secara in vitro. Meskipun EGF dapat diproduksi sendiri oleh tubuh tetapi jumlahnya tergolong terbatas sehingga pemberian terapi PRP berguna untuk meningkatkan kadar EGF. Pada pemberian PRP untuk percobaan pada rekonstruksi payudara, Gentile dkk menemukan efek positif dimana, pemberian PRP dan dan *fat graft* pada follow upnya setahun kemudian, mampu memberikan hasil lebih baik yaitu bertahannya kontur payudara dibandingkan dengan pemberian *fat graft* saja. (Bertrand-Duchesne et al, 2009; Liao et al, 2014)

2.1.6. Stromal Vascular Fraction (SVF)

Penyembuhan yang baik membutuhkan elemen biologikal dan molekular yang teratur dengan baik untuk menjalankan proses inflamasi, epitelisasi, granulasi, neovaskularisasi dan reorganisasi. Beragam sitokin

dan growth factor berperan dalam regulasi pertumbuhan dan diferensiasi keratinosit. Seperti peran penting EGF dalam epitelisasi karena fungsinya dalam membantu menginduksi keratinosit dan migrasi fibroblast untuk menjalankan fungsi pertumbuhan dan akselerasi penyembuhan luka. EGF juga memicu formasi jaringan granulasi. Beberapa penelitian terkini menunjukkan sel punca diderivasi dari jaringan adiposa atau *adiposed derived stem cell* (ADSC) mampu memicu proliferasi fibroblast secara langsung antara sel ke sel dan mengaktivasi sekresi parakrin yang kemudian secara signifikan akan mengecilkan ukuran luka dan mengakselerasi reepitelisasi dari tepi luka. (Josh et al, 2012; Chae et al, 2017)

Pada tahun 1960, ahli kimia nutrisi dan endokrinologi Rodbell melakukan ekperimen pertama dengan isolasi SVF dari tikus. Kemudian pada tahun 1970 oleh Wagner dkk memperkenalkan sentifus dua tahap dan melakukan penelitian atibitas adenilat siklase. Di akhir dekade 1975, Wagner dan Matthew menyempurnakan isolasi endotel kapiler dari SVF adiposa. Kemudian di akhir 1980, Jarrell, Williams dan Rupick dkk mengisolasi sel endotel dari SVF adiposa manusia yang kemudian mengalami ekspansi percobaan hingga percobaan aplikasinya saat perioperatif. (Ramakrishnan et al, 2018)

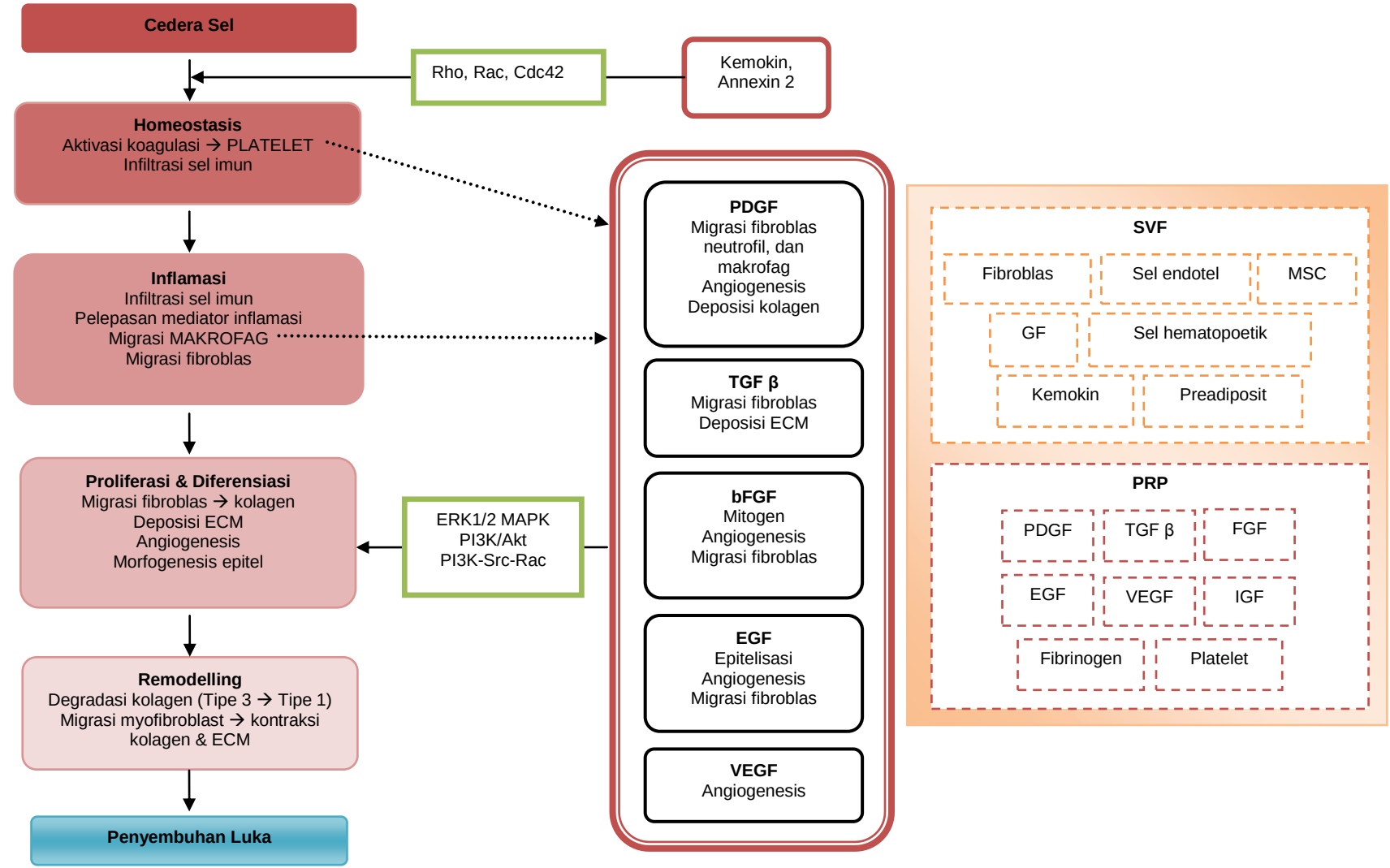
Sel punca dapat diperoleh dari jaringan adiposa, sumsum tulang, darah perifer, amnion dan dari jaringan lainnya untuk membantu mempercepat perbaikan kerusakan jaringan. Salah satu sumber sel punca

terbanyak berada dari jaringan adiposa. Dilaporkan tentang sel punca yang berhasil diisolasi dari jaringan adiposa 40 kali lipat lebih banyak bila dibandingkan jika diambil dari sumsum tulang. Populasi sel yang terkandung dalam SVF sendiri amat bervariasi seperti fibroblast, sel hematopoetik, sel endotelial, *pericytes*, sel preadiposit dan *mesenchymal stromal cells* (MSCs) yang dapat berdiferensiasi menjadi kondrogenik, myogenik, adipogenik dan osteogenik. Dalam *Polymerase chain reaction* (PCR) kuantitatif dan hasil *reverse transcriptase PCR* menunjukkan faktor pertumbuhan epitelisasi *epidermal growth factor* (EGF), chemokines, stromal cell–derived factor (SDF-1 atau CXCL12), neutrophil-activating protein-2 (NAP-2 atau CXCL7), chemokine receptors (CXCR1, CCR2 dan CCR3) dan gen penyembuhan luka sangat tinggi beregulasi pada SVF. (Chae et al, 2017; Ramakrishnan et al, 2018)

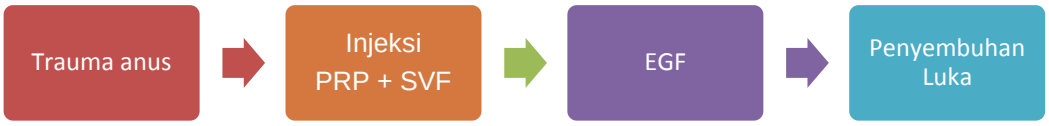
Stromal vascular fraction cell (SVFs) terdiri dari variasi populasi termasuk preadiposit, fibroblast, sel hematopoetik, perisit, sel endotel, sel stromal mesenchymal dan sel progenitor endotel, subtipe leukosit, sel limfatik, pericytes, sel T, sel B dan sel otot polos vaskular SVFs diproses sedemikian rupa sehingga mengandung komposisi sel heterogen konsisten yang dapat di produksi kembali. Setelah proses produksi dan pencatatan, SVFs yang berasal dari adiposa dapat berdiferensiasi menjadi jenis jaringan yang berbeda, mendukung neovaskularisasi, mengganti sel dan memperbaiki jaringan yang cedera (Chae et al, 2017; Darinskas et al, 2017; Zuk et al, 2002)

Penelitian klinis pada populasi sel stromal dewasa ini telah meningkat dan beberapa penyelidikan klinis sedang dilakukan untuk memeriksa penggunaan ASCs, SVFs dan MSCs sumsum tulang untuk rekayasa jaringan dan aplikasi medis regeneratif. Beberapa penerapan klinis ini memberikan pengaruh yang baik, pada penelitian yang dilakukan pada 52 pasien dengan penyakit kronik yang tidak menyembuh, menunjukkan angka perbaikan pada lebih 90% kasus dimana fistula perianal, fistula kriptoglandular dan Crohn's disease, menunjukkan angka perbaikan sebesar sekitar 50 % pada pengaplikasian pertama dan mampu mencapai 100% pada pengaplikasian kedua dengan rerata peningkatan sebesar 30 %. Pada penelitian terhadap kasus alopecia dengan menggunakan kombinasi PRP dan SVF, dapat dibuktikan bahwa aktifitas proliferasi meningkat dengan pesat, sesuai dengan kandungan SVF yang kaya akan sel progenitor multipoten. (Gimble et al, 2007; Herreros et al, 2019; Josh et al, 2021)

2.2. Kerangka Teori



2.3. Kerangka Konsep



2.4. Hipotesis

2.4.1. kombinasi PRP dan SVF dapat meningkatkan kadar EGF dalam penyembuhan trauma anus pada model tikus Wistar

2.4.2. kombinasi PRP dan SVF dapat mempercepat penyembuhan trauma anus pada model tikus Wistar