

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Luka yang disebabkan oleh berbagai macam trauma maupun luka bedah merupakan salah satu masalah yang sering ditemui pada praktek klinis sehari-hari, dimana biaya yang dikeluarkan selama proses penyembuhan luka maupun ketidaknyamanan yang disebabkan oleh luka dilaporkan dapat meningkatkan beban sosial-ekonomi secara bermakna baik bagi pasien maupun bagi sistem pelayanan kesehatan secara keseluruhan.<sup>1</sup>

Integritas serta fungsi kulit yang mengalami luka dapat dikembalikan ke kondisi normal melalui proses penyembuhan luka.<sup>2</sup> Proses yang dinamis dan kompleks ini akan terjadi melalui empat fase yang berbeda, mulai dari fase hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling, serta akan melibatkan interaksi silang dari berbagai jenis faktor pertumbuhan, sitokin, matriks ekstraseluler, enzim, serta berbagai jenis sel yang berbeda.<sup>3-5</sup> Berbagai komplikasi akibat gangguan pada berbagai fase proses penyembuhan luka atau jangka waktu penyembuhan luka yang terlalu lama dapat menyebabkan peningkatan angka morbiditas maupun mortalitas, sehingga luka harus dapat disembuhkan secara adekuat dalam waktu yang relatif singkat.<sup>6</sup>

Kecepatan penutupan luka merupakan parameter utama yang dianggap paling penting untuk menilai kualitas proses penyembuhan luka serta kemungkinan terjadinya jaringan parut maupun komplikasi seperti infeksi. Penanganan luka yang

adekuat idealnya dapat mempercepat proses penyembuhan luka akut dan mencegah terjadinya komplikasi seperti infeksi sekunder, luka kronik, atau terbentuknya jaringan parut.<sup>4</sup> Saat ini sudah terdapat berbagai pilihan terapi alternatif yang dapat digunakan untuk mendukung proses penyembuhan luka sembari mencegah terbentuknya jaringan parut, dimana salah satunya adalah terapi sel punca.<sup>4,7,8</sup>

Sel punca mesenkim atau *mesenchymal stem cell* (MSC) dilaporkan dapat mempercepat proses penyembuhan luka akut dengan memicu proses penyembuhan yang bersifat regeneratif sembari mengurangi pembentukan jaringan parut yang berlebih.<sup>4,9</sup> Mekanisme yang mendasari efek regeneratif dari MSC adalah adanya potensi proliferasi yang tinggi serta kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dan menghasilkan berbagai jenis sitokin maupun faktor pertumbuhan yang berperan penting pada proses penyembuhan luka.<sup>10</sup> Meskipun demikian, penggunaan terapi berbasis sel seperti MSC memiliki sejumlah keterbatasan seperti waktu hidup MSC yang relatif rendah secara *in-vivo*, kesulitan pemberian pada daerah luka, dan teknik yang rumit dalam mempertahankan stabilitas MSC secara *laboratoris*. Untuk menanggulangi keterbatasan tersebut, terdapat pendekatan baru untuk mengkondisikan MSC lebih optimal melalui media kultur dibawah stimulasi yang dikenal dengan *MSC-conditioned medium* (MSC-CM).<sup>7,8,11</sup>

Sel punca mesenkim diketahui dapat mensekresikan sejumlah molekul bioaktif yang bermanfaat untuk proses penyembuhan luka ke dalam media kultur dibawah stimulasi.<sup>4</sup> Campuran dari berbagai jenis senyawa bioaktif yang dikenal sebagai sekretom ini diketahui bermanfaat dalam mendukung proses perbaikan dan

regenerasi jaringan.<sup>12,13</sup> Terapi bebas sel menggunakan sekretom atau CM dalam pengobatan regeneratif lebih memberikan manfaat daripada terapi berbasis sel punca, seperti bersifat lebih aman karena tidak dilakukan transplan sel hidup maupun prosedur koleksi sel yang invasif, sehingga tidak perlu memperhatikan kompatibilitas imun, tumorigenisitas, pembentukan emboli, dan transmisi infeksi; waktu dan biaya untuk perbanyakan dan perawatan kultur sel punca juga dapat diminimalkan; selain itu sekretom dapat disimpan dalam jangka waktu lebih panjang tanpa penambahan agen kriopreservatif yang bersifat toksik.<sup>14</sup>

Sekretom dari MSC diketahui mengandung sejumlah senyawa bioaktif terlarut seperti faktor pertumbuhan (PDGF, EGF, HGF, bFGF, IGF-1, G-CSF, GM-CSF, PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$ , VEGF dan KGF), protein inflamatorik (IL-1, IL-8, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , LIF, IL-11, MCP-1, PGE<sub>2</sub>, IL-9 dan IL-13), protein ECM (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, TIMP-1, TIMP-2, ICAM, elastin, kolagen, decorin, dan laminin), serta faktor angiogenik (VEGF, Ang-1, Ang-2, PDGF, MCP-1, TGF- $\beta$ 1, FGF, EGE, CXCL5, MMP dan TGF- $\alpha$ ). Sejumlah senyawa bioaktif ini dapat mempercepat proses re-epitelisasi, mengurangi inflamasi, memicu angiogenesis, meningkatkan produksi kolagen, serta memicu proses regenerasi kulit tanpa disertai dengan pembentukan fibrosis berlebihan.<sup>4,8,15</sup>

Pembuatam sekretom MSC dengan metode prekondisi dapat meningkatkan jumlah faktor parakrin yang dihasilkan atau memicu pelepasan jenis faktor parakrin tambahan yang dapat membantu meningkatkan potensi regeneratif dari MSC-CM.<sup>7</sup> Sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  merupakan salah satu pilihan yang sering digunakan untuk prekondisi dalam pembuatan sekretom MSC (MSC-CM-T) karena dapat

meningkatkan kadar sitokin dan faktor pertumbuhan dalam sekretom secara bermakna. Penggunaan MSC-CM-T dilaporkan dapat menghasilkan efek penutupan luka yang lebih cepat dibandingkan kontrol tanpa prekondisi.<sup>16</sup>

Sekretom MSC yang digunakan untuk penyembuhan luka dapat diperoleh dari berbagai sumber yang berbeda. Penelitian terdahulu telah menggunakan sekretom dari jaringan adiposa, amnion, tali pusat, sumsum tulang, dan *Wharton's jelly*. Sel punca mesenkim dari tali pusat memiliki keuntungan berupa dapat diambil secara non-invasif, banyak tersedia, memiliki kapasitas proliferasi tinggi, imunogenisitas rendah, dan potensi regenerasi yang lebih tinggi.<sup>17,18</sup> Terapi sekretom MSC untuk penyembuhan luka ini dapat diberikan melalui berbagai metode yang berbeda, antara melalui injeksi subkutan atau secara topikal. Penelitian terdahulu lebih sering memberikan MSC-CM-T dalam bentuk injeksi subkutan, namun penggunaan metode terapi topikal memiliki keuntungan berupa penggunaannya yang non-invasif, lebih praktis, dan risiko yang lebih rendah untuk terjadi rejeksi atau reaksi alergi, sehingga metode terapi MSC-CM-T dalam bentuk gel topikal diperkirakan akan lebih aman dan efektif dibanding injeksi subkutan untuk digunakan dalam proses penyembuhan luka.<sup>17,19</sup>

Mekanisme yang memperantarai efek MSC-CM-T dalam mempercepat proses penyembuhan dapat melibatkan berbagai jenis sitokin atau mediator yang diketahui berperan dalam berbagai fase proses penyembuhan luka. Sekretom MSC dari sumsum tulang yang dikultur pada kondisi hipoksia terbukti dapat memicu produksi protein *high mobility group box 1* (HMGB-1) yang diketahui berperan sebagai mediator penting dalam proses penyembuhan luka. Oleh karena itu,

HMGB1 diperkirakan sebagai salah satu mediator yang dapat turut berperan dalam memperantarai efek sekretom dalam mempercepat proses penyembuhan luka.<sup>20</sup> Meskipun demikian, belum ada penelitian terdahulu yang memeriksa perubahan ekspresi HMGB1 setelah terapi MSC-CM-T, sehingga peranan HMGB1 dalam memperantarai efek MSC-CM-T dalam mempercepat proses penyembuhan luka belum diketahui secara pasti.

HMGB1 berinteraksi dengan sejumlah reseptor yang berbeda untuk meregulasi respon seluler terkait proses perbaikan dan regenerasi jaringan, antara lain seperti aktivasi sistem imun, migrasi sel, pertumbuhan sel, serta merekrut sel punca ke area luka dan memicu proliferasinya.<sup>21</sup> Pada fase proliferasi, HMGB1 dapat memicu peningkatan reepitelisasi, pembentukan jaringan granulasi, memicu proliferasi fibroblas, dan berperan sebagai molekul profibrogenik untuk memicu pembentukan kolagen, mengurangi ekspresi MMP-1 dan meningkatkan ekspresi TIMP-1.<sup>22,23</sup> HMGB1 memicu ekspresi TGF- $\beta$ 1, VEGF, PDGF, dan MMP dengan diperantarai oleh RAGE, *toll-like receptor-4* (TLR-4), molekul pengiriman sinyal Smad 2 dan 3, *phosphorylated Smad 2/3 complex*, Erk 1/2, Akt, dan NF- $\kappa$ B.<sup>23,24</sup>

Menurut berbagai pertimbangan di atas, penelitian ini akan mengevaluasi efek pemberian MSC-CM-T dalam bentuk gel topikal terhadap proses penyembuhan luka pada tikus model defek luka *full-thickness* dengan memeriksa kadar HMGB1, TNF- $\alpha$ , dan PDGF untuk mengetahui peranan ketiga sitokin ini dalam memperantarai efek MSC-CM-T, serta kecepatan penutupan defek luka dan densitas fibroblas untuk menilai proses penyembuhan luka.

## **1.2 Rumusan Masalah**

### **1.2.1 Masalah Umum**

Apakah pemberian gel sekretom *Mesenchymal Stem Cell* stimulasi TNF- $\alpha$  (MSC-CM-T) dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka *full-thickness* pada hewan coba?

### **1.2.2 Masalah Khusus**

1. Apakah pemberian gel MSC-CM-T mempengaruhi ukuran penutupan defek luka *full-thickness* pada hewan coba?
2. Apakah pemberian gel MSC-CM-T mempengaruhi ekspresi *High mobility group box 1* (HMGB1) pada hewan coba?
3. Apakah pemberian gel MSC-CM-T mempengaruhi ekspresi *tumor necrosis alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada hewan coba?
4. Apakah pemberian gel MSC-CM-T mempengaruhi ekspresi *platelet-derived growth factor* (PDGF) pada hewan coba?
5. Apakah pemberian gel MSC-CM-T mempengaruhi penampakan densitas fibroblas pada hewan coba?
6. Apakah terdapat korelasi antara ekspresi HMGB1, TNF- $\alpha$  dan PDGF dengan ukuran penutupan defek luka *full-thickness* pada hewan coba?
7. Apakah terdapat korelasi antara ekspresi HMGB1, TNF- $\alpha$  dan PDGF dengan penampakan densitas fibroblas pada hewan coba?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh pemberian gel sekretom *Mesenchymal Stem Cell* stimulasi TNF- $\alpha$  (MSC-CM-T) terhadap proses penyembuhan luka *full-thickness* pada hewan coba.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengetahui efek pemberian gel MSC-CM-T terhadap ukuran penutupan defek luka *full-thickness* pada hewan coba.
2. Mengetahui efek pemberian gel MSC-CM-T terhadap ekspresi *High mobility group box 1* (HMGB1) pada hewan coba.
3. Mengetahui efek pemberian gel MSC-CM-T terhadap ekspresi *tumor necrosis alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada hewan coba.
4. Mengetahui efek pemberian gel MSC-CM-T terhadap ekspresi *platelet-derived growth factor* (PDGF) pada hewan coba.
5. Mengetahui efek pemberian gel MSC-CM-T terhadap penampakan densitas fibroblas pada hewan coba.
6. Menganalisis korelasi antara ekspresi HMGB1, TNF- $\alpha$  dan PDGF dengan ukuran penutupan defek luka *full-thickness* pada hewan coba.
7. Menganalisis korelasi antara ekspresi HMGB1, TNF- $\alpha$  dan PDGF dengan penampakan densitas fibroblas pada hewan coba.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat dari Segi Keilmuan**

1. Penelitian ini akan menambah pengetahuan mengenai efek gel MSC-CM-T terhadap proses penyembuhan luka serta memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan luka.
2. Penelitian ini juga akan mengeksplorasi mekanisme kerja gel MSC-CM-T dalam respons penyembuhan luka melalui efeknya dalam memodulasi kadar HMGB1, TNF- $\alpha$  dan PDGF.
3. Penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lainnya untuk membuka potensi gel MSC-CM-T dalam menangani berbagai jenis luka karena perannya yang dapat memodulasi reaksi inflamasi.

### **1.4.2 Manfaat dari Segi Klinis**

1. Data hasil penelitian ini dapat dipergunakan sebagai acuan keilmuan yang dapat menyokong bukti ilmiah penggunaan gel MSC-CM-T untuk penatalaksanaan luka dalam praktek klinis sehari-hari.
2. Penelitian ini dapat memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan luka untuk memberikan luaran yang lebih baik.
3. Penelitian ini memberikan informasi khasiat gel MSC-CM-T dalam promosi penyembuhan luka.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Definisi dan Gambaran Umum Luka**

Luka secara umum didefinisikan sebagai terputusnya kontinuitas kulit karena berbagai penyebab yang berbeda. Kulit memiliki struktur yang kompleks, dimana sejumlah faktor lokal pada kulit diketahui dapat mempengaruhi mekanisme biologis luka, antara lain seperti kinerja sistem imunitas lokal yang berperan dalam mencegah terjadinya infeksi atau kontaminasi mikroba pada luka, serta reaksi inflamasi lokal.<sup>5</sup>

Luka dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe utama, yaitu luka akut dan luka kronik. Luka akut umumnya akan mengalami proses penyembuhan lokal normal secara efektif melalui sejumlah fase yang berbeda, mulai dari haemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling, dimana luka akan sembuh sepenuhnya dalam waktu 2–4 minggu. Sementara itu, luka dapat menjadi kronik bila terjadi gangguan pada berbagai fase penyembuhan luka yang menghasilkan proses penyembuhan luka abnormal, dimana luka belum mengalami kesembuhan setelah lebih dari 4 minggu.<sup>5,25</sup>

#### **2.2 Penyembuhan Luka Normal**

Integritas serta fungsi kulit yang mengalami cedera atau luka dapat dikembalikan ke kondisi normal melalui proses penyembuhan luka.<sup>2</sup> Proses yang dinamis dan kompleks ini umumnya melibatkan interaksi silang dari berbagai

mekanisme fungsional seperti munculnya reaksi inflamasi, regenerasi jaringan parenkim, migrasi dan proliferasi sel jaringan parenkim, produksi protein matriks ekstraseluler, serta proses remodeling jaringan. Penyembuhan luka normal juga melibatkan kinerja dari berbagai jenis faktor pertumbuhan, sitokin, matriks ekstraseluler, enzim, serta berbagai jenis sel yang berbeda,<sup>5</sup> antara lain seperti:

- **Faktor Molekuler**

Sejumlah faktor molekuler yang terlibat dalam penyembuhan luka antara lain meliputi berbagai jenis faktor pertumbuhan dan reseptornya (*platelet-derived growth factor* [PDGF], *transforming growth factor-beta* [TGF- $\beta$ ]), berbagai jenis sitokin (*fibroblast growth factor* [FGF], *tumor necrosis alpha* [TNF- $\alpha$ ] dan interleukin-1 [IL-1]), serta enzim (matriks metaloproteinase [MMP], *tissue inhibitors of MMP* [TIMP], dan seiperinase).<sup>5</sup>

- **Faktor Pemicu Angiogenesis**

Angiogenesis memainkan peranan penting pada proses penyembuhan luka. Sejumlah faktor pemicu angiogenesis seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF, FGF, angiogenin dan angiopoietin-1 diketahui dapat bekerja pada berbagai fase proses penyembuhan luka, antara lain dengan memicu dan meningkatkan proses angiogenesis, memicu proliferasi pembuluh darah, serta memicu stabilisasi pembuluh darah dan proses angiogenesis.<sup>26</sup>

- **Faktor Seluler**

Jenis sel yang terlibat dalam proses penyembuhan luka antara lain seperti trombosit, neutrofil, monosit, makrofag, fibroblas, keratinosit, sel endotel, sel

epitel, serta miofibroblas, dimana fibroblas dianggap sebagai jenis sel utama yang memainkan peranan penting pada semua fase penyembuhan luka.<sup>27</sup> Fibroblas turut terlibat dalam proses pemecahan bekuan fibrin, pembentukan matriks ekstraseluler (ECM) dan struktur kolagen baru yang digunakan sebagai rangka penyokong untuk berbagai jenis sel lain yang berperan pada proses penyembuhan luka, serta dalam proses kontraksi luka.<sup>28</sup>

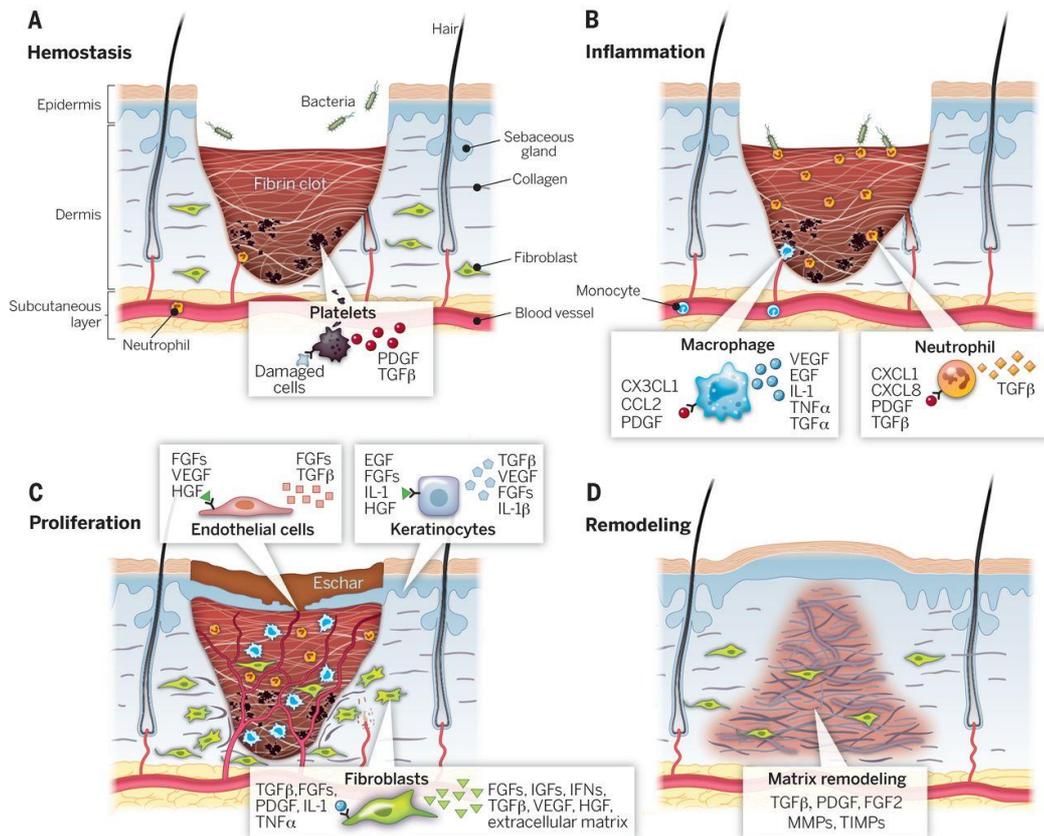
Luka yang mengalami proses penyembuhan normal dapat menunjukkan peningkatan jumlah fibroblas mulai dari akhir fase inflamasi sampai terjadinya proses epitelisasi sempurna. Fibroblas mulai ditemukan di area luka pada akhir fase inflamasi dan awal fase proliferasi (24–48 jam paska terjadinya luka). Fibroblas ditarik ke area luka oleh sejumlah kemoatraktan seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF), *interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ) dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) yang dihasilkan oleh matriks bekuan trombosit maupun makrofag yang dihasilkan sebagai bagian dari respon inflamasi. Kemoatraktan ini akan mengarahkan fibroblas ke area luka melalui ikatan dengan reseptor spesifik di permukaan sel. Fibroblas yang ditarik untuk bermigrasi ke area luka ini kemudian akan berproliferasi dan menjalankan sejumlah aktivitas yang diregulasi secara ketat oleh berbagai faktor mediator luka, serta akan menghasilkan berbagai perubahan lokal yang penting untuk mendukung proses penyembuhan luka normal.<sup>28,29</sup>

Fibroblas menginfiltrasi dan mendegradasi bekuan fibrin dengan menghasilkan berbagai jenis matriks metaloproteinase (MMP), lalu menggantinya dengan komponen matriks ekstraseluler (ECM) seperti kolagen

I–IV, XVIII, glikoprotein, proteoglikan, laminin, trombospondin, glikosaminoglikan (GAG), asam hialuronat (HA) dan heparan sulfat.<sup>30</sup> Matriks yang kompleks ini turut berperan dalam meregulasi proses migrasi serta aktivitas dari fibroblas, serta berperan dalam mengirimkan sinyal pemicu maupun sebagai penyokong proses angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, dan epitelisasi.<sup>31</sup> Setelah terjadi proses remodeling secara adekuat di area luka, maka kadar fibroblas akan kembali mengalami penurunan sampai ke nilai normal seperti sebelum terjadinya luka.<sup>28</sup>

### **2.3 Fase Penyembuhan Luka**

Penyembuhan luka merupakan suatu proses bertahap dan kompleks yang bertujuan untuk mengembalikan integritas kulit di area luka dengan melibatkan interaksi silang dari berbagai jenis sel serta mekanisme pengiriman sinyal molekuler. Proses ini secara umum dapat dibagi menjadi empat fase yang berbeda, yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling.<sup>2,32</sup> Adanya kelainan pada berbagai bagian dari proses ini dapat menyebabkan terjadinya gangguan proses penyembuhan luka normal, sehingga semua fase penyembuhan luka harus berjalan secara lancar tanpa adanya gangguan,<sup>5,28</sup> dan penggunaan berbagai metode terapi yang ditujukan untuk meningkatkan efektivitas dari berbagai fase penyembuhan luka ini diperkirakan dapat membantu mempercepat proses penyembuhan luka.<sup>33</sup>

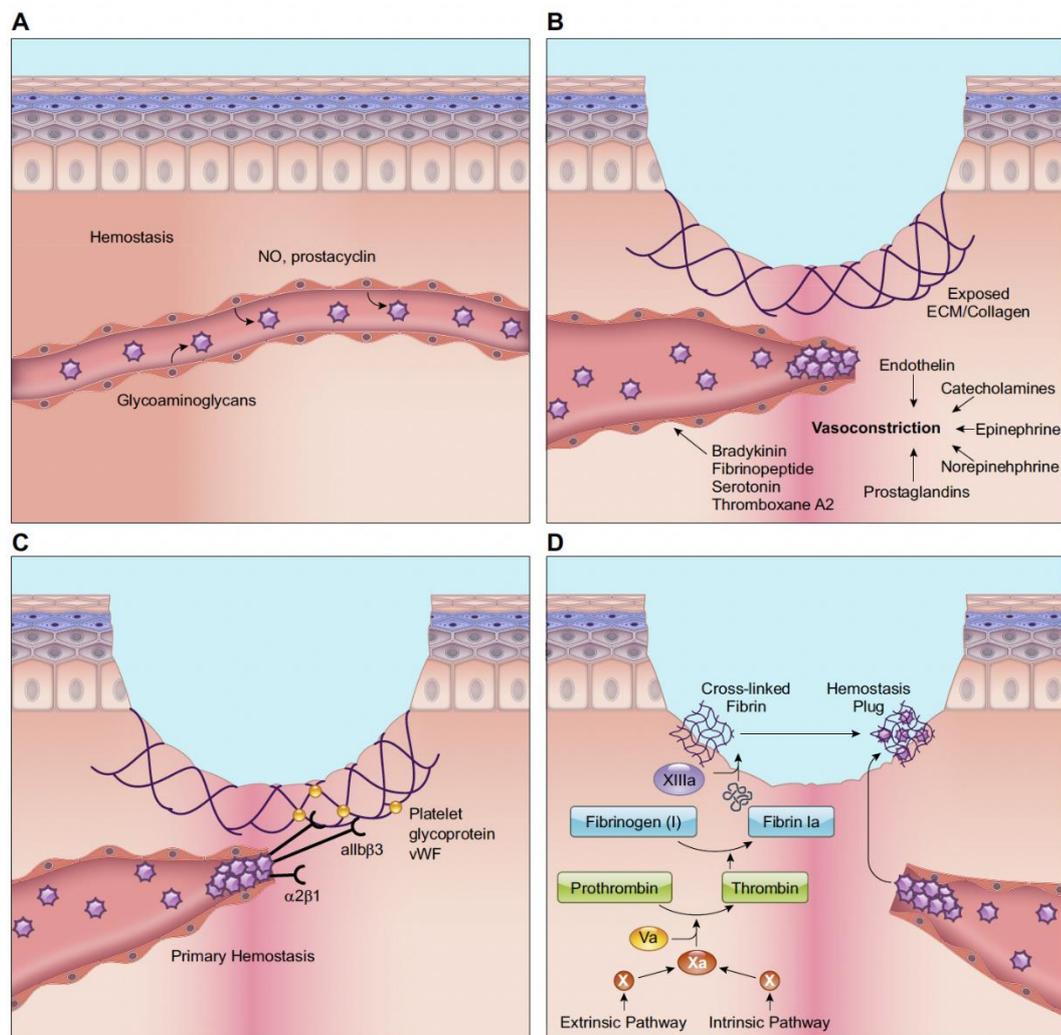


**Gambar 1.** Fase-fase penyembuhan luka normal dan berbagai komponen utama yang berperan. A, fase hemostasis dimulai segera setelah terjadinya cedera dimana akan terbentuk bekuan darah untuk menghentikan kehilangan darah lebih lanjut dan pembentukan matriks fibrin awal. B, fase inflamasi dimulai sekitar 2 jam setelah cedera untuk membersihkan debris dari luka dan mencegah terjadinya infeksi, dimulai dengan masuknya neutrofil yang dipicu oleh pelepasan histamin dari sel Mast. Monosit juga akan masuk dan kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag yang berperan dalam membersihkan sisa debris sel dan neutrofil. C, fase proliferasi meliputi proses re-epitelisasi, dimana terjadi migrasi keratinosit untuk menutup luka, terbentuk pembuluh darah baru melalui proses angiogenesis, dan fibroblas akan menggantikan bekuan fibrin awal dengan jaringan granulasi untuk mengisi bagian defek pada luka. D, fase remodeling dimana fibroblas akan melakukan reorganisasi susunan matriks kolagen untuk menutup luka sepenuhnya dengan lapisan jaringan ikat yang kuat, dimana miofibroblas akan menyebabkan terjadinya kontraksi luka.<sup>33,34</sup>

### 2.3.1 Fase Hemostasis

Hemostasis merupakan fase pertama pada proses penyembuhan luka, dimana akan terbentuk bekuan darah yang bertujuan untuk mencegah kehilangan darah lebih lanjut setelah terjadinya kerusakan pembuluh darah di area luka.<sup>22</sup> Jenis

sel utama yang terlibat dalam proses hemostasis adalah trombosit, dan komponen matriks yang berperan adalah fibrinogen.<sup>35</sup>



**Gambar 2.** Respon seluler selama fase hemostasis dari proses penyembuhan luka. A, pada kondisi normal, trombosit bersirkulasi di dekat dinding pembuluh darah, dan senyawa anti-trombotik seperti nitrit oksida (NO) serta prostasiklin yang dilepaskan oleh sel endotel akan mencegah terjadinya perlekatan trombosit pada dinding endotel maupun agregasi trombosit. B, luka terbuka akan memicu terjadinya vasokonstriksi untuk segera menghentikan perdarahan. C, trombosit kemudian akan berikatan dengan matriks subendotel dari pembuluh darah yang ruptur pada luka serta mengalami agregasi untuk membentuk sumbat trombosit (*platelet plug*). D, aktivasi Faktor X akan memicu pemecahan fibrinogen menjadi fibrin, yang kemudian akan berikatan dengan sumbat trombosit untuk membentuk dan memperkuat trombus yang berfungsi menghentikan perdarahan dan dapat menjadi matriks dasar untuk digunakan dalam proses penyembuhan luka selanjutnya.<sup>35</sup>

Hemostasis terjadi melalui tiga tahapan yang berbeda, yaitu vasokonstriksi, hemostasis primer, dan hemostasis sekunder. Setelah terjadi luka, otot polos pembuluh darah akan segera mengalami refleks kontraksi untuk mengurangi perdarahan. Proses vasokonstriksi ini dapat diregulasi oleh beberapa mekanisme, antara lain seperti pelepasan senyawa vasokonstriktor seperti endotelin (ET) oleh endotel yang rusak, pelepasan katekolamin, epinefrin, norepinefrin, dan prostaglandin dari sel yang mengalami cedera, serta pelepasan *platelet-derived growth factor* (PDGF) dari trombosit yang dapat mengaktivasi sel mesenkim, terutama otot polos di dinding pembuluh darah, sehingga menyebabkan terjadinya kontraksi.<sup>35</sup>

Hemostasis primer meliputi proses agregasi trombosit dan pembentukan sumbat trombosit yang dipicu oleh terpaparnya kolagen di dalam matriks subendotel akibat luka atau trauma, sementara hemostasis sekunder meliputi proses aktivasi kaskade koagulasi dimana fibrinogen terlarut akan diubah menjadi serabut tidak terlarut yang membentuk jala fibrin. Sumbat trombosit dan jala fibrin akan bergabung menjadi satu untuk membentuk trombus, yang kemudian akan menghentikan perdarahan, melepaskan sejumlah komplemen dan faktor pertumbuhan, serta berperan sebagai matriks atau rangka dasar untuk infiltrasi dari sejumlah sel lain yang dibutuhkan untuk proses penyembuhan luka.<sup>35</sup>

Trombosit di dalam *platelet plug* akan melepaskan sejumlah faktor pertumbuhan dan sitokin seperti PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, dan *insulin growth factor* (IGF) yang berperan sebagai mediator seluler untuk fase penyembuhan luka selanjutnya. Pelepasan sejumlah faktor ini nampak paling tinggi selama satu jam

pertama setelah terjadi aktivasi trombosit, namun akan terus berlanjut sampai selama 7 hari, sehingga memberikan efek parakrin pada berbagai tipe sel lain di dalam luka, termasuk sel otot polos, sel endotel, monosit dan fibroblas.<sup>35</sup>

### **2.3.2 Fase Inflamasi**

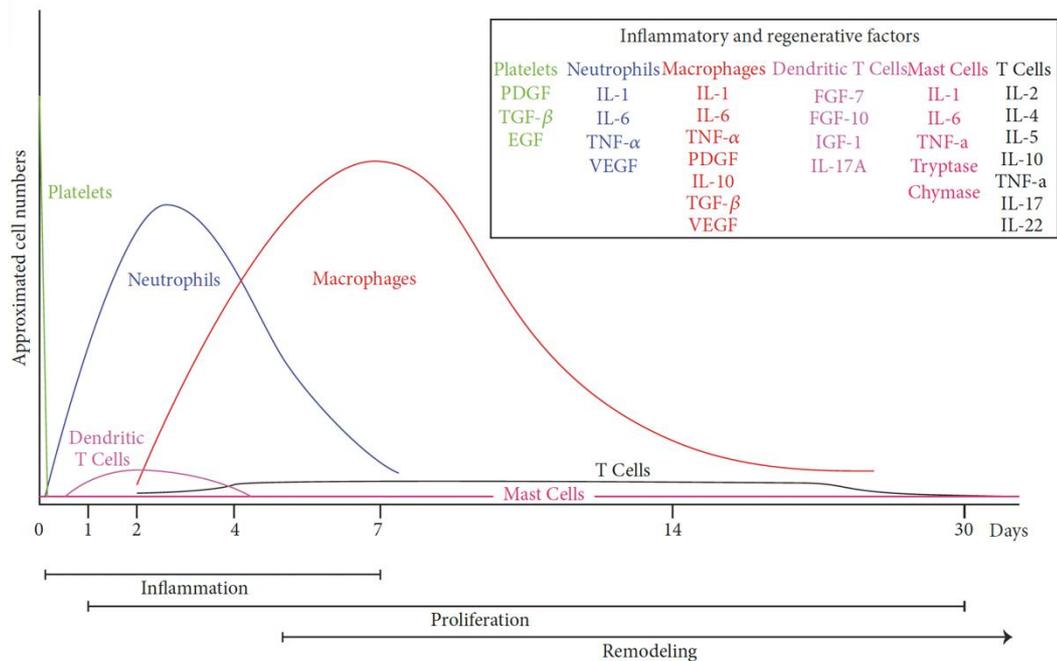
Fase dimana terjadi rekrutmen neutrofil dan makrofag untuk membersihkan debris dari area luka guna mencegah terjadinya infeksi. Respon imunitas ini dipicu oleh sejumlah sinyal yang dihasilkan akibat terbentuknya luka atau trauma, antara lain seperti *damage-associated molecular pattern* (DAMP) yang dilepaskan oleh sel nekrotik dan jaringan yang rusak, maupun *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) yang dihasilkan oleh komponen bakteri. Sejumlah senyawa PAMP dan DAMP ini akan mengaktivasi sel imunitas lokal seperti sel Mast, sel Langerhans, sel T dan makrofag serta memicu kaskade inflamasi melalui ikatannya dengan *pattern recognition receptor*.<sup>22,33</sup>

Neutrofil dari pembuluh darah yang rusak akan ditarik ke dalam luka oleh sejumlah senyawa kemoatraktan seperti IL-1, TNF- $\alpha$  dan endotoksin bakteri seperti lipopolisakarida (LPS). Neutrofil membuang jaringan nekrotik dan patogen melalui proses fagositosis dan pelepasan spesies oksigen reaktif (ROS), peptida antimikroba, eikosanoat, dan enzim proteolitik. Selanjutnya, monosit dalam sirkulasi juga akan masuk ke dalam jaringan luka dan kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag akan diaktivasi oleh sejumlah stimulus pro-inflamasi seperti LPS dan interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), lalu akan memicu proses inflamasi dengan melepaskan ROS, sitokin pro-inflamasi (IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ ) maupun

sejumlah faktor pertumbuhan (VEGF dan PDGF). Makrofag akan memfagositosis neutrofil apoptotik dan menggantikannya sebagai mediator inflamasi utama.<sup>33</sup>

Makrofag akan bersifat mikrobisidal dan pro-inflamatorik (M1) hanya pada fase awal proses penyembuhan luka. Makrofag M1 akan mengenali dan memasukkan patogen ke dalam organel intraseluler berupa fagosom yang kaya akan ROS dan dapat membunuh mayoritas patogen secara cepat. Makrofag M1 juga dapat mensintesis MMP untuk memecah ECM dan trombus untuk membantu proses migrasi. Fragmen ECM ini berfungsi sebagai DAMP imunostimulatorik yang akan makin memperberat kondisi pro-inflamasi pada luka.<sup>35</sup>

Seiring berjalannya waktu dan terjadinya resolusi proses inflamasi, makrofag M1 akan mengalami transisi menjadi fenotipe anti-inflamasi (makrofag M2). Makrofag anti-inflamatorik ini akan melepaskan sejumlah sitokin seperti IL-4, IL-10, IL-13 dan arginase yang memainkan peranan penting untuk proses perbaikan luka, serta melepaskan sejumlah faktor pertumbuhan lain untuk memicu proses re-epitelisasi, fibroplasia dan angiogenesis. Setelah terjadi re-epitelisasi dan luka memasuki fase remodeling, makrofag akan kembali bertransisi menjadi fenotipe fagositik dan fibrolitik. Makrofag M2c ini akan melepaskan senyawa proteases dan memfagositosis sisa sel maupun matriks berlebih yang sudah tidak dibutuhkan untuk proses penyembuhan luka.<sup>35</sup>



**Gambar 3.** Grafik yang menunjukkan perubahan kadar dari sejumlah sel utama yang berperan pada berbagai fase proses penyembuhan luka. Akumulasi neutrofil pada luka mengalami peningkatan pada fase inflamasi awal dan mulai mengalami penurunan mulai hari ke 4 sampai hari ke 7. Jumlah makrofag mulai mengalami peningkatan pada fase inflamasi, mencapai konsentrasi maksimal pada fase proliferasi, lalu mengalami penurunan secara progresif pada fase remodeling. Makrofag merupakan jenis sel dengan jumlah terbanyak pada semua fase penyembuhan luka. Jumlah limfosit mulai mengalami peningkatan segera setelah terjadi luka/cedera dan akan mencapai konsentrasi stabil pada hari ke 4 sampai fase akhir penyembuhan luka. Sel lain yang juga dapat ditemui adalah sel dendritik, sel Mast, dan sel T seperti sel *T tissue resident memory* (TRM) atau sel T regulator (Treg). Sel T dendritik adalah berbagai jenis sel yang akan berikatan dengan sel T setelah diproses oleh antigen presenting cells (APC).<sup>2</sup>

### 2.3.3 Fase Proliferasi

Fase proliferasi mulai terjadi dalam waktu 3–10 hari setelah terjadinya luka, dan ditandai oleh adanya aktivasi sel punca dan peningkatan jumlah maupun aktivasi sel endotel, keratinosit, dan fibroblas di area luka yang nampak berperan dalam meregulasi pembentukan matriks ekstraseluler (ECM) baru, proses reepitelisasi untuk menutup celah luka, serta proses angiogenesis untuk mendukung peningkatan proliferasi dan migrasi sel ke area luka.<sup>22,33</sup> Selain itu, juga mulai terjadi penurunan jumlah sel pro-inflamasi dan peningkatan jumlah sel anti-

inflamasi, dimana makrofag non-inflamasi atau M2 merupakan populasi sel paling dominan yang berperan dalam meregulasi proses interaksi antara sel endotel, fibroblas, keratinosit, matriks ekstraseluler (ECM), dan saraf perifer.<sup>2</sup>

Beberapa mekanisme utama yang dapat ditemui selama fase proliferasi antara lain meliputi:

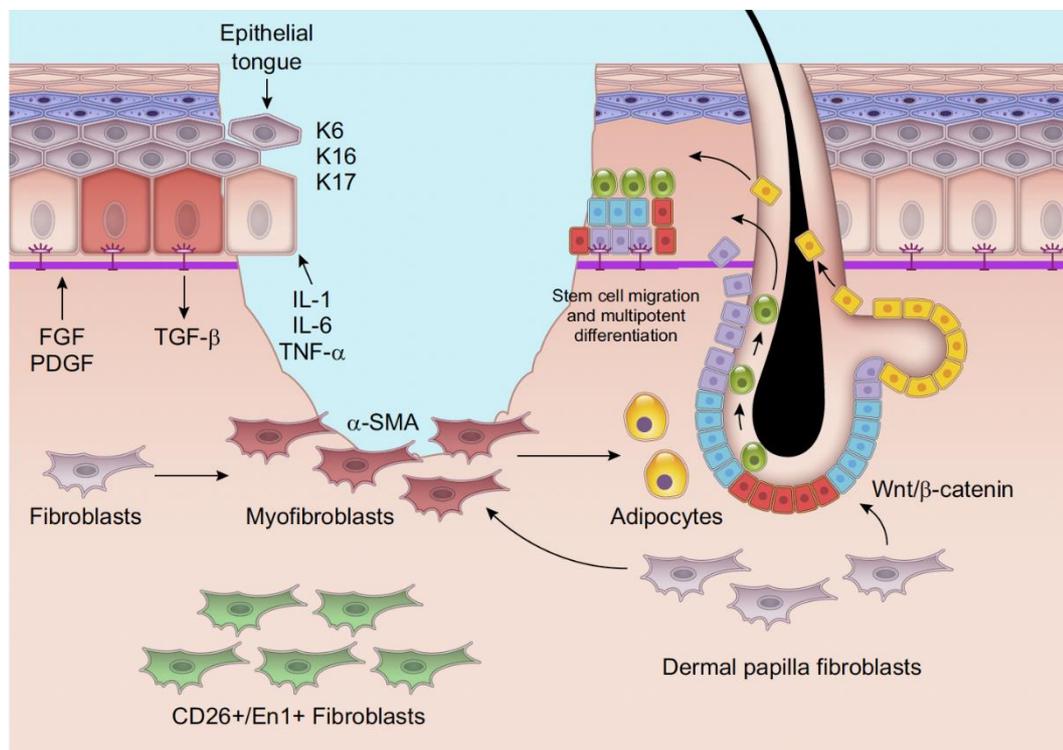
- **Fibroplasia**

Meliputi proses proliferasi dan diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas, pengendapan matriks ekstraseluler, serta kontraksi luka. Fibroblas merupakan kelompok sel yang bersifat heterogen dengan plastisitas tinggi, sehingga dapat memainkan peranan yang berbeda-beda di berbagai lapisan kulit. Fibroblas dapat merespon terhadap sejumlah sinyal ekstraseluler jaringan terlarut seperti IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, PDGF, EGF, dan *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) yang dilepaskan oleh trombosit, makrofag, fibroblas, sel endotel, dan keratinosit. Sejumlah sitokin dan faktor pertumbuhan ini dapat memicu terjadinya proliferasi fibroblas serta meregulasi produksi MMP dan TIMP. Fibroblas matur akan bermigrasi ke jaringan granulasi, memicu sintesis kolagen, menggantikan matriks fibrin awal, serta berdiferensiasi menjadi myofibroblas, sehingga akan meningkatkan jumlah endapan kolagen pada luka dan memicu terjadinya proses kontraksi luka.<sup>2</sup>

- **Reepitelisasi**

Reepitelisasi dimulai sejak 16-24 jam setelah terjadi cedera atau luka, dan akan terus berlanjut sampai ke fase remodeling.<sup>36</sup> Pada awal terjadinya luka, keratinosit akan berdiferensiasi dan mengalami migrasi antara lokasi bekuan

fibrin dan dermis yang kaya kolagen, sementara keratinosit suprabasal yang terletak di belakang area tepi luka akan berproliferasi untuk menghasilkan lebih banyak sel guna mengisi celah luka. Keratinosit suprabasal yang terletak di dekat area tepi luka akan berubah bentuk dan bermigrasi ke bagian puncak dari keratinosit basal, dan kemudian menjadi sel terluar. Pada fase akhir proses reepitelisasi, sel akan berdiferensiasi menjadi sel epitel yang melekat kuat pada membrana basalis.<sup>2</sup>



**Gambar 4.** Proses reepitelisasi dan interaksi fibroblas-epidermis selama proses penyembuhan luka. Setelah terbentuk luka, sel punca unipoten di dalam folikel rambut akan bergerak secara linier dan mengalami proses diferensiasi multipoten untuk membentuk berbagai jenis sel penyusun epidermis. Fibroblas di papila dermis akan mengirimkan sinyal pemicu pada sejumlah sel punca ini melalui jalur Wnt/ $\beta$ -catenin. Sebaliknya, sel punca epidermal juga akan mengirimkan sinyal balik pada fibroblas untuk memicu terjadinya konversi menjadi miofibroblas yang berperan dalam membantu proses kontraksi luka. Sebagian miofibroblas yang terbentuk akan diubah menjadi adiposit guna mengurangi pembentukan jaringan parut, sementara sub-kelompok fibroblas yang mengekspresikan CD26+/En1+ diketahui dapat menghasilkan lebih banyak ECM dan menyebabkan terjadinya fibrosis. Sel punca interfolikuler di membrana basalis epidermis juga akan berproliferasi untuk menghasilkan keratinosit yang kemudian bermigrasi ke area luka untuk membentuk bagian

penonjolan epitel di tepi luka (*epithelial tongue*). Proliferasi dan migrasi dari keratinosit dan sel punca yang sudah berdiferensiasi ini ke area luka akan menghasilkan proses reepitelisasi.<sup>35</sup>

Interaksi antar sel serta antara sel dan ECM, faktor pertumbuhan, maupun sitokin yang dilepaskan oleh berbagai jenis sel akan memicu keratinosit untuk bermigrasi melewati matriks penyokong pada area bekuan darah menuju ke area tepi luka, dimana mereka kemudian mulai berproliferasi dan bermigrasi untuk memulai proses penutupan luka. Di waktu yang sama, interaksi parakrin antara keratinosit, fibroblas, neutrofil, monosit-makrofag, dan sel endotel akan makin meningkatkan produksi sitokin, faktor pertumbuhan, dan berbagai senyawa lain yang berperan dalam memicu interaksi epitel-mesenkim antara keratinosit dan fibroblas, dimana keratinosit akan memicu fibroblas untuk melepaskan sejumlah faktor pertumbuhan yang pada gilirannya akan memicu proliferasi keratinosit.<sup>2</sup>

- **Angiogenesis**

Meliputi proses proliferasi sel endotel dan pembentukan pembuluh darah baru di area luka. Proses ini dipicu oleh terjadinya kondisi hipoksia akibat berkurangnya suplai darah dan meningkatnya metabolisme dari sel-sel yang bekerja untuk memperbaiki luka. Kondisi hipoksia ini memicu sintesis *hypoxia inducible factor-1* (HIF1) dari makrofag, fibroblas, sel endotel pembuluh darah, dan keratinosit. Pelepasan sejumlah faktor proangiogenik seperti VEGF, VEGFA, FGF2, PDGF, TGF- $\beta$ 1, dan perubahan metabolik dari sel endotel akan memicu proses neovaskularisasi.<sup>2</sup>

VEGF akan memicu diferensiasi sel endotel, dan makrofag akan memicu terbentuknya anastomosis struktural antara sel endotel imatur yang baru terbentuk dengan pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya. Sejumlah struktur ini akan membentuk lumen dan lapisan membrana basalis baru, dimana sel endotel kemudian akan melepaskan PDGF untuk merekrut sel perisit, yang kemudian akan melepaskan reseptor  $\beta$  (PDGF-R $\beta$ ) dan melapisi lumen dengan sel mural, sehingga membentuk saluran pembuluh darah baru yang stabil. Terakhir, fibroblas akan mensintesis matriks ekstraseluler baru untuk digunakan sebagai rangka penyokong sel dan pembuluh darah baru, serta membentuk jaringan granulasi.<sup>2,37,38</sup>

#### **2.3.4 Fase Remodeling**

Fase terakhir pada proses penyembuhan luka, dimana fibroblas akan melakukan reorganisasi matriks kolagen untuk menutup luka secara permanen. Setelah luka tertutup sempurna, proses remodeling masih dapat berlanjut sampai beberapa bulan atau beberapa tahun, dimana dapat terbentuk jaringan parut selama proses ini berlangsung. Proses angiogenesis akan terhenti dan pembuluh darah baru yang terbentuk akan mengalami regresi. Proses proliferasi sel juga akan berhenti, dan sel-sel sisa yang tidak digunakan dalam proses penyembuhan luka akan dibawa ke luar area luka atau mengalami apoptosis, sehingga hanya akan menyisakan kolagen dan protein ECM di area luka.<sup>22</sup>

Setelah terjadi reepitelisasi, myofibroblas pada jaringan granulasi akan terus mensintesis MMP dan TIMP, dimana MMP akan mendegradasi komponen spesifik

dari ECM. Selama MMP bekerja untuk merekonstitusi ECM, proses sintesis matriks juga akan makin melambat, dimana kolagen tipe III di jaringan granulasi yang terbentuk pada fase proliferasi akan mulai didegradasi dan kemudian digantikan oleh kolagen tipe I yang lebih kuat, tebal dan bersifat permanen. Setelah proses modifikasi ECM selesai dilakukan, maka TIMP akan mulai menghalangi kerja MMP dan menghentikan proses degradasi ECM lebih lanjut.<sup>22,35</sup>

Makrofag juga memainkan peranan penting pada fase remodeling, dimana mereka akan mengalami transformasi menjadi fenotipe fibrolitik, lalu bekerja untuk memecah ECM berlebih serta membersihkan debris sisa ECM dan sel apoptotik. Setelah proses penyembuhan luka dianggap selesai, maka sel myofibroblas, sel endotel dan makrofag yang tersisa akan mengalami proses apoptosis atau bermigrasi meninggalkan area luka.<sup>33,35</sup>

#### **2.4 Peranan HMGB1 pada Proses Penyembuhan Luka**

High mobility group box 1 (HMGB1) merupakan jenis protein yang diketahui dapat turut berperan pada proses penyembuhan luka dengan meningkatkan viabilitas, proliferasi dan migrasi dari fibroblas maupun keratinosit.<sup>23</sup> HMGB1 berinteraksi dengan sejumlah reseptor yang berbeda untuk meregulasi respon seluler terkait proses perbaikan dan regenerasi jaringan, antara lain seperti aktivasi sistem imun, migrasi sel, pertumbuhan sel, serta merekrut sel punca ke area luka dan memicu proliferasinya.<sup>21</sup> Penelitian juga menemukan bahwa sekretom MSC dari sumsum tulang yang dikultur pada kondisi hipoksia dapat memicu produksi HMGB-1, sehingga protein ini diperkirakan dapat turut berperan

dalam memperantarai efek sekretom dalam mempercepat proses penyembuhan luka.<sup>20</sup>

Terjadinya luka atau trauma akan memicu monosit dan makrofag untuk mengekspresikan HMGB1 dengan diperantarai oleh LPS, TNF- $\alpha$ , atau IL-1. Pada fase inflamasi penyembuhan luka, HMGB1 berperan sebagai *damage associated molecular pattern* (DAMP) yang memicu munculnya respon inflamasi.<sup>22</sup> HMGB1 berikatan dengan reseptor seperti *toll-like receptor* (TLR 2, 4 dan 9) dan *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) untuk mengaktivasi respon proinflamasi. Proses pengiriman sinyal yang memicu pelepasan sitokin proinflamasi oleh HMGB1 ini nampak diperantarai oleh jalur *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dan *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B).<sup>23,39</sup> Pada kondisi inflamasi, HMGB1 dapat meningkatkan ekspresi sejumlah sitokin seperti VEGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF dan TNF- $\alpha$  dari monosit, makrofag dan neutrofil di area luka.<sup>39,40</sup> HMGB1 juga berperan sebagai faktor kemoatraktan yang memperantarai migrasi monosit dan neutrofil ke area luka.<sup>22,39</sup> HMGB1 akan memicu peningkatan ekspresi sejumlah kemokin seperti CXCL8, CCL2, dan rekrutmen sel progenitor endotel (EPC), serta membentuk heterokompleks dengan CXCL12 untuk memicu migrasi monosit melalui reseptor kemokin CXCR4.<sup>22</sup>

Pada fase proliferasi, HMGB1 dapat memicu peningkatan reepitelisasi, pembentukan jaringan granulasi, memicu proliferasi fibroblas, dan berperan sebagai molekul profibrogenik untuk memicu pembentukan kolagen, mengurangi ekspresi MMP-1 dan meningkatkan ekspresi TIMP-1.<sup>22,23</sup> HMGB1 memicu

ekspresi TGF- $\beta$ 1, VEGF, PDGF, dan MMP dengan diperantarai oleh RAGE, *toll-like receptor-4* (TLR-4), molekul pengiriman sinyal Smad 2 dan 3, *phosphorylated Smad 2/3 complex*, Erk 1/2, Akt, dan NF- $\kappa$ B.<sup>23,24</sup>

## **2.5 Sekretom *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)**

### **2.5.1 Definisi**

Sel punca atau *stem cell* adalah sel prekursor jaringan imatur yang memiliki kemampuan untuk memperbarui diri (*self-renewing*), dapat membentuk populasi sel klonal, serta dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel yang berbeda. Sel punca secara umum dapat dibagi menjadi tiga kategori utama, yaitu: (i) sel punca embrionik yang diperoleh dari embrio tahap awal (blastosis), (ii) sel punca pluripoten diinduksi (*induced pluripotent stem cell* atau iPSC), dan (iii) sel punca dewasa yang dapat diperoleh dari jaringan dewasa, misalnya seperti sel punca hematopoietik, sel punca neural, dan sel punca mesenkim (*mesenchymal stem cell* atau MSC).<sup>41</sup>

*Mesenchymal stem cell* merupakan populasi sel progenitor multipoten dewasa yang dapat memperbarui diri dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel mesenkim seperti tulang, tulang rawan, dan jaringan adiposa.<sup>42,43</sup> Sel punca multipoten yang menyerupai fibroblas ini dapat diisolasi dari berbagai macam jaringan yang berbeda, antara lain seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, darah perifer, plasenta, bagian pulpa gigi, membran sinovial, ligamen periodontal, endometrium, trabekula, dan tulang padat, meskipun sumber yang dilaporkan paling banyak mengandung MSC adalah jaringan adiposa.<sup>43,44</sup>

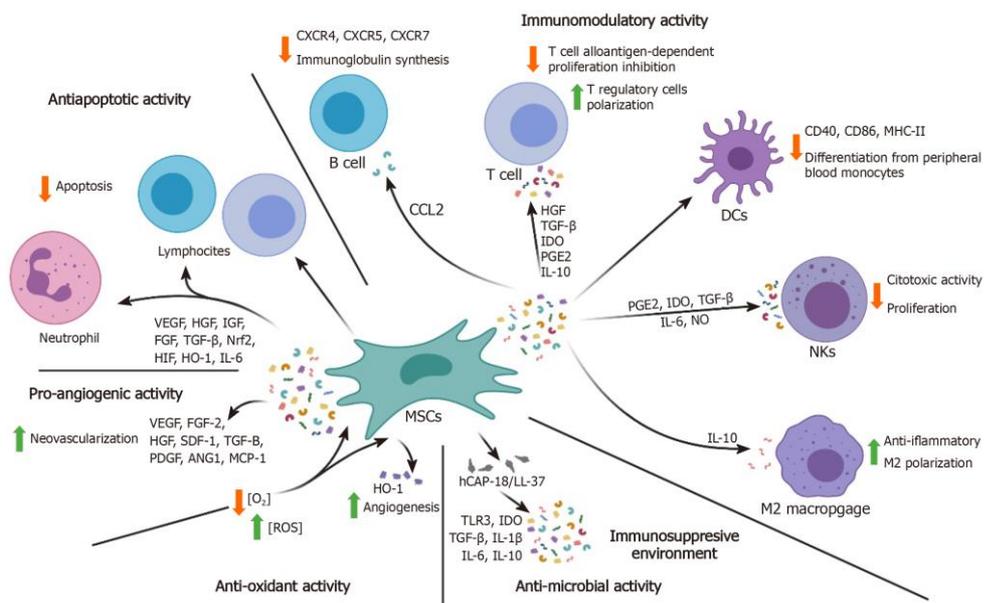
*Mesenchymal stem cell* memiliki morfologi yang khas dan menunjukkan pola ekspresi molekul *cluster of differentiation* (CD) spesifik, yaitu adanya ekspresi CD73, CD90, dan CD105 positif, disertai dengan ekspresi CD34, CD45, dan antigen HLA-DR negatif. Pada kondisi lingkungan mikro yang sesuai, MSC dapat berproliferasi dan menghasilkan berbagai jenis sel yang berbeda, serta dilaporkan dapat bermanfaat untuk terapi kondisi inflamasi sistemik dan autoimun, maupun untuk meningkatkan proses perbaikan dan regenerasi dari jaringan yang mengalami cedera atau trauma.<sup>44</sup>

MSC merupakan salah satu jenis sel punca dewasa multipoten yang paling banyak digunakan untuk keperluan terapeutik dalam praktek klinik sehari-hari.<sup>9</sup> Meskipun demikian, MSC yang diimplantasikan secara langsung pada tubuh manusia umumnya tidak dapat bertahan hidup dalam waktu yang cukup lama untuk dapat tertanam serta berdiferensiasi menjadi sel jaringan stroma, sehingga manfaat terapeutik yang diperoleh terutama berasal dari sejumlah senyawa bioaktif yang diproduksi dan dilepaskan oleh MSC ke lingkungan mikro di sekitarnya. Campuran dari berbagai jenis senyawa bioaktif yang dikenal sebagai sekretom ini diketahui bermanfaat dalam mendukung proses perbaikan dan regenerasi jaringan.<sup>12,13</sup>

### **2.5.2 Komposisi Sekretom MSC**

Sekretom dari MSC tersusun atas fraksi terlarut yang meliputi sejumlah molekul bioaktif seperti sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan, serta fraksi vesikuler atau partikel yang terdiri atas sejumlah mikrovesikel ekstraseluler dan eksosom yang berfungsi mengirimkan material genetik (mikroRNA) dan protein

pada sel lain. Vesikel ekstraseluler ini juga berisi sejumlah biomolekul aktif seperti enzim, reseptor, sitokin, kemokin, miRNA, dan DNA. Berbagai fraksi dari sekretom MSC ini secara keseluruhan diketahui dapat menghasilkan efek anti-inflamasi, imunomodulator, pro-angiogenik, memicu sel progenitor endogen, anti-apoptotik, anti-fibrotik, antimikroba, dan antioksidan.<sup>13,45</sup>



**Gambar 5.** Berbagai faktor terlarut yang terkandung dalam sekretom MSC dan fungsinya.<sup>46</sup>

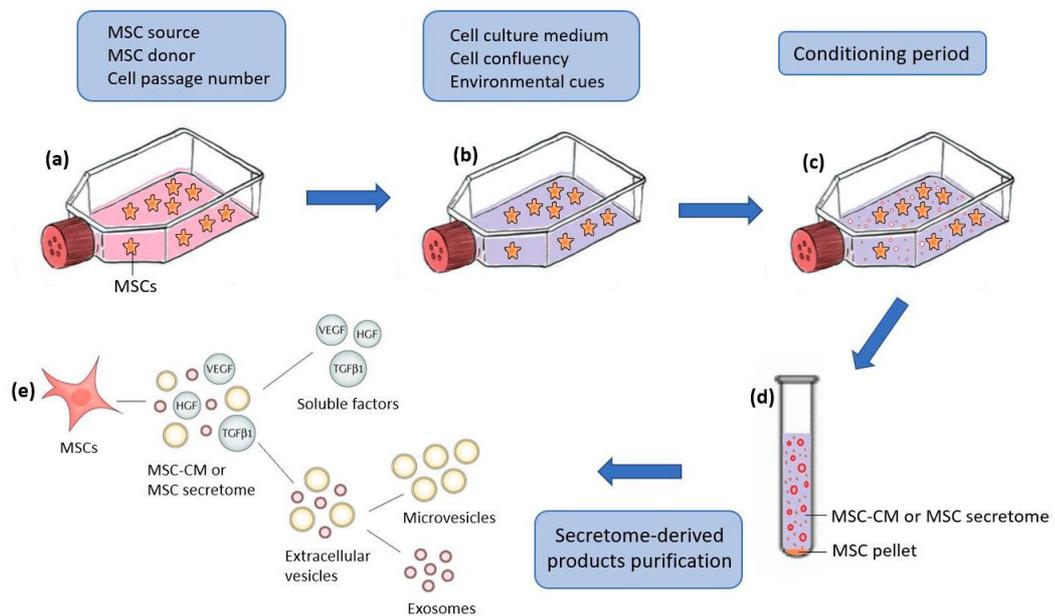
Sekretom dari MSC yang dipanen di jaringan adiposa manusia menunjukkan peningkatan kadar *endothelial growth factor* (EGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Di dermis, EGF dapat memicu migrasi dan proliferasi fibroblas, HGF menghambat apoptosis, dan bFGF memicu proses regenerasi kulit tanpa disertai dengan fibrosis.<sup>8</sup> Kandungan faktor terlarut lain dalam sekretom MSC yang juga diperkirakan dapat turut berperan dalam proses penyembuhan luka meliputi faktor pertumbuhan (PDGF,

IGF-1, G-CSF, GM-CSF, PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$ , VEGF dan KGF), protein inflamatorik (IL-1, IL-8, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , LIF, IL-11, MCP-1, PGE<sub>2</sub>, IL-9 dan IL-13), protein ECM (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, TIMP-1, TIMP-2, ICAM, elastin, kolagen, decorin, dan laminin), serta faktor angiogenik (VEGF, Ang-1, Ang-2, PDGF, MCP-1, TGF- $\beta$ 1, FGF, EGF, CXCL5, MMP dan TGF- $\alpha$ ).<sup>4</sup> Sejumlah senyawa bioaktif ini dapat mempercepat proses re-epitelisasi, mengurangi inflamasi, memicu angiogenesis, serta meningkatkan produksi kolagen.<sup>4,8</sup>

### **2.5.3 Pembuatan Sekretom MSC Stimulasi TNF- $\alpha$ (MSC-CM-T)**

Jaringan dewasa yang paling banyak digunakan untuk pembuatan sekretom MSC manusia adalah sumsum tulang dan fraksi vaskuler stroma jaringan adiposa. Selain itu, juga dapat digunakan jenis jaringan yang lebih muda, yaitu tali pusat atau *Wharton's jelly* dan plasenta. Sumber sel punca ini dapat bersifat autologus atau alogenik, dan keduanya dilaporkan dapat menghasilkan MSC dalam jumlah yang adekuat untuk keperluan terapeutik. Sebagai contoh, sebanyak 25 ml sumsum tulang yang dikultur selama 3 minggu dapat menghasilkan sekitar 100–150 juta MSC dengan volume sel sekitar 0,4–0,5 ml.<sup>47</sup> Selanjutnya akan dilakukan pembuatan sekretom (MSC-CM) melalui proses sentrifugasi dari media kultur MSC yang sudah mengalami ekspansi. Hasil sentrifugasi kemudian dapat digunakan secara langsung atau diproses lebih lanjut, antara lain dengan penambahan konsentrasi, fraksinasi, dan/atau filtrasi.<sup>48</sup> Komposisi molekul bioaktif yang terkandung dalam MSC-CM ini juga dapat dipengaruhi oleh proses

prekondisi spesifik yang dilakukan selama proses pembuatan, antara lain seperti penambahan sitokin, kondisi hipoksia, dan sistem kultur 3D.<sup>16</sup>

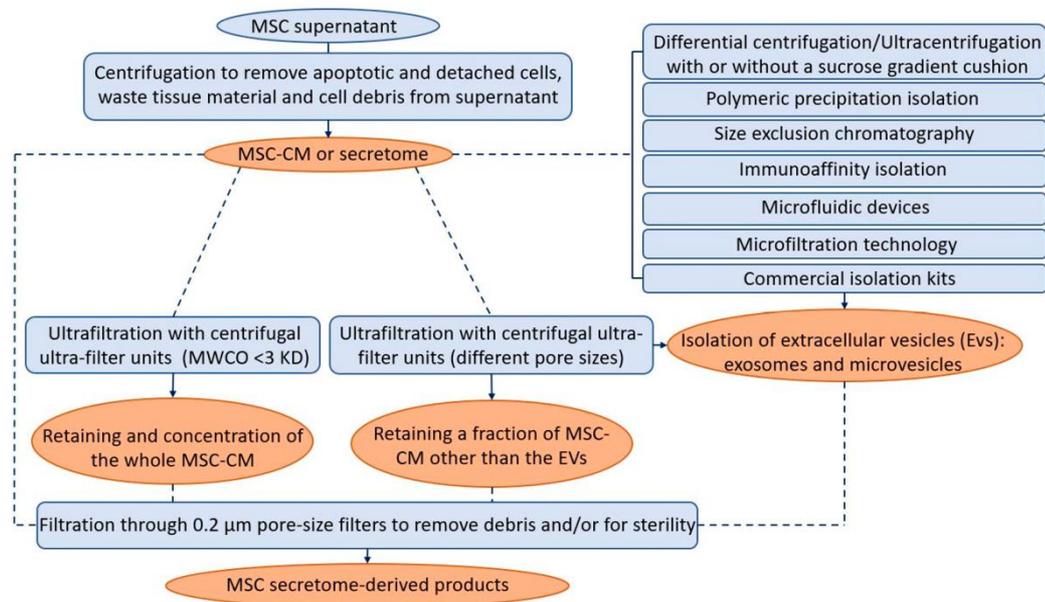


**Gambar 6.** Skema yang menunjukkan prosedur pembuatan sekretom dari sel punca mesenkim (MSC-CM) dan berbagai faktor yang dapat mempengaruhi berbagai tahapan proses produksi (dalam kotak biru). (a) MSC dalam media kultur awal; (b) dilakukan perubahan media kultur setelah tercapai derajat konfluensi tertentu; (c) MSC yang diinkubasi dalam jangka waktu tertentu akan melepaskan sekretom ke dalam media kultur; (d) diperoleh MSC-CM setelah dilakukan setrifugasi supernatan; (e) proses pemurnian atau purifikasi berbagai produk dari MSC-CM.<sup>48</sup>

Sekretom MSC dapat menghasilkan efek terapeutiknya melalui kinerja dari sejumlah faktor parakrin yang terkandung di dalamnya. Oleh karena itu, penggunaan metode prekondisi yang dapat meningkatkan jumlah faktor parakrin yang dihasilkan atau memicu pelepasan jenis faktor parakrin tambahan dapat membantu meningkatkan potensi regeneratif dari MSC-CM.<sup>7</sup>

Sel imunitas diketahui dapat berinteraksi dengan MSC di area jaringan yang mengalami kerusakan atau inflamasi, dan paparan sel pro-inflamasi diketahui dapat meningkatkan kapasitas MSC dalam meregulasi serta memicu berbagai respon

yang bermanfaat paska terjadinya cedera atau luka. Oleh karena itu, mulai digunakan berbagai metode prekondisi seperti penambahan sitokin pro-inflamasi untuk menghasilkan kondisi media kultur yang menyerupai inflamasi akut atau kronik selama proses pembuatan MSC-CM. Metode ini terbukti dapat meningkatkan efek terapeutik yang penting dalam proses regenerasi jaringan, antara lain seperti fibrosis, imunomodulasi, angiogenesis dan stimulasi sel progenitor.<sup>16</sup>

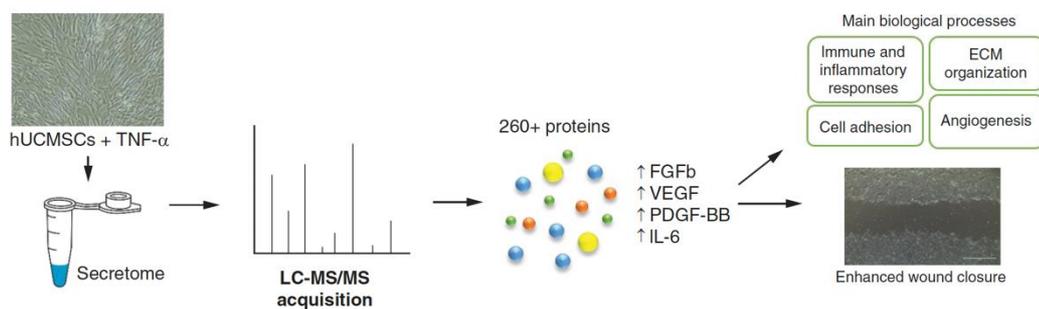


**Gambar 7.** Berbagai jenis teknik dan protokol yang dapat digunakan untuk membuat berbagai produk sekretom dengan efek regeneratif.<sup>48</sup>

Sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  merupakan salah satu pilihan yang sering digunakan untuk prekondisi dalam pembuatan MSC-CM. Pemberian TNF- $\alpha$  pada media kultur dapat menghasilkan lingkungan mikro dengan kondisi yang menyerupai inflamasi, sehingga MSC akan menghasilkan lebih banyak biomolekul

aktif seperti sitokin dan kemokin yang dapat bermanfaat dalam memfasilitasi proses penyembuhan luka, terutama pada fase inflamasi, proliferaatif dan remodeling yang ditandai oleh adanya vasodilatasi lokal, ekstrasvasasi plasma ke ruang interseluler, akumulasi sel darah putih, pengisian dan kontraksi area tepi luka, pembentukan pembuluh darah baru, reorganisasi serabut kolagen, serta reepitelisasi.<sup>16</sup>

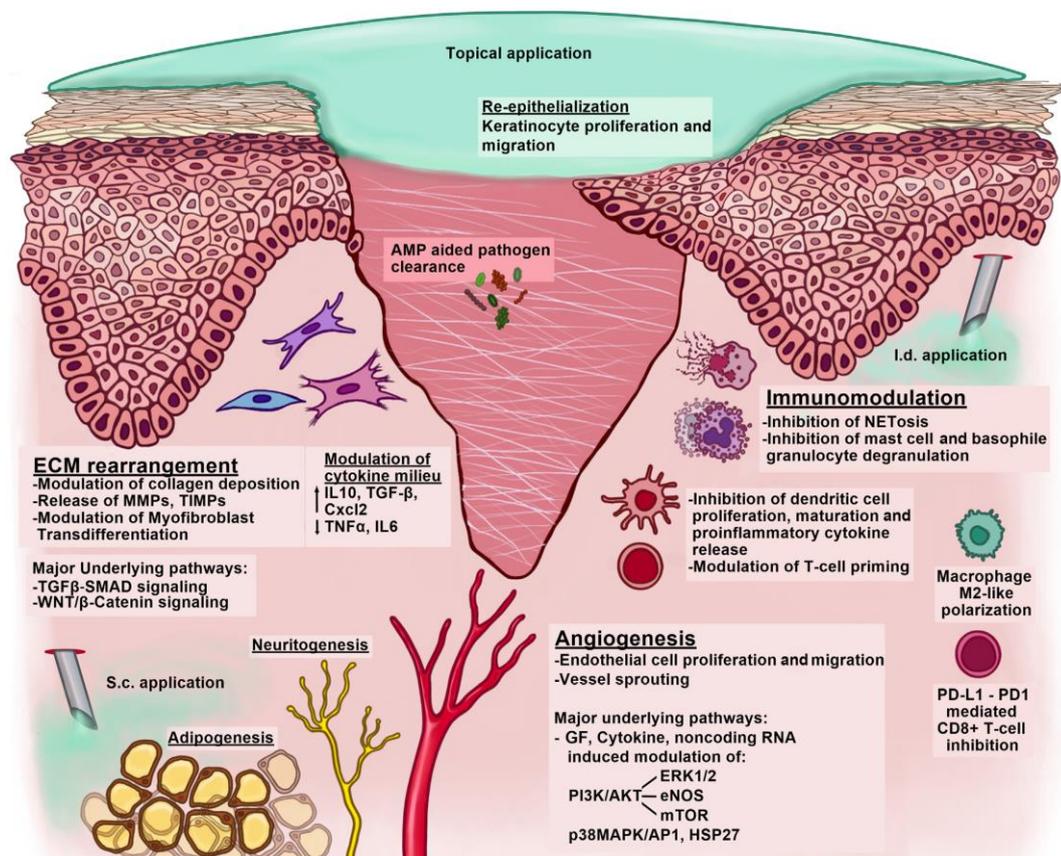
Penelitian menemukan bahwa sekretom yang diperoleh dari kultur sel yang diberikan terapi TNF- $\alpha$  dapat menghasilkan efek penutupan luka yang lebih cepat dibandingkan sekretom tanpa prekondisi. Sekretom dengan prekondisi TNF- $\alpha$  menunjukkan kadar FGFb, PDGF-BB, IL-6 dan VEGF yang lebih tinggi secara bermakna, sehingga akan menghasilkan lingkungan mikro yang lebih mendukung proses migrasi serta aktivitas molekuler lain selama proses penyembuhan luka. Selain itu, juga ditemukan adanya peningkatan kadar MMP-13 yang bermakna pada sekretom dengan prekondisi TNF- $\alpha$ , dan aktivitas enzim ini diketahui berperan penting pada proses angiogenesis, migrasi keratinosit dan reepitelisasi.<sup>16</sup>



**Gambar 8.** Manfaat penambahan TNF- $\alpha$  pada media kultur selama proses pembuatan sekretom.<sup>16</sup>

## 2.6 Peranan Sekretom MSC pada Berbagai Fase Penyembuhan Luka

Terapi sekretom berpotensi dapat mempercepat proses penyembuhan luka melalui efek dari sejumlah molekul bioaktif yang terkandung di dalamnya, yaitu dengan efek imunomodulasi, memicu proliferasi dan diferensiasi sel, serta meningkatkan proses angiogenesis, reepitelisasi, produksi ECM dan remodeling jaringan.<sup>7,8</sup>



**Gambar 9.** Mekanisme utama yang mendasari efek terapeutik dari sekretom MSC pada penyembuhan luka.<sup>7</sup>

Berbagai molekul bioaktif yang terkandung dalam sekretom diketahui dapat bekerja pada berbagai fase penyembuhan luka yang berbeda, antara lain:

- **Fase Inflamasi**

Pada awal fase inflamasi, sejumlah sitokin pro-inflamasi seperti CSF2, IL-6, IL-8, CCL2 dan CCL3 serta PDGF-BB yang terkandung dalam sekretom dapat memicu peningkatan rekrutmen sel inflamasi seperti neutrofil dan makrofag ke area luka. Neutrofil dan makrofag ini kemudian akan mengaktifasi sistem imunitas adaptif, mengeliminasi bakteri patogen dan mulai mendegradasi jaringan yang rusak. Molekul bioaktif lain seperti VEGF dan IL-6 nampak berperan dalam memicu vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas vaskuler, sehingga membantu proses rekrutmen serta infiltrasi sel imunitas lebih lanjut ke area luka, antara lain seperti tambahan neutrofil dan makrofag, sel Mast, dan sel limfosit T yang berperan dalam mendegradasi dan membersihkan bakteri maupun partikel asing. Sebagai senyawa mitogen spesifik sel endotel, VEGF juga dapat mempertahankan kemampuan proliferasi dan menunda apoptosis sel endotel guna mendukung proses endotelisasi dan neovaskularisasi. Di sisi lain, IL-6 juga berperan sebagai sitokin anti-inflamasi yang akan memperantarai pengakhiran fase inflamasi dan transisi ke arah fase proliferasi dengan mengurangi proses diferensiasi atau aktivasi sel T.<sup>16,49</sup>

- **Fase Proliferasi**

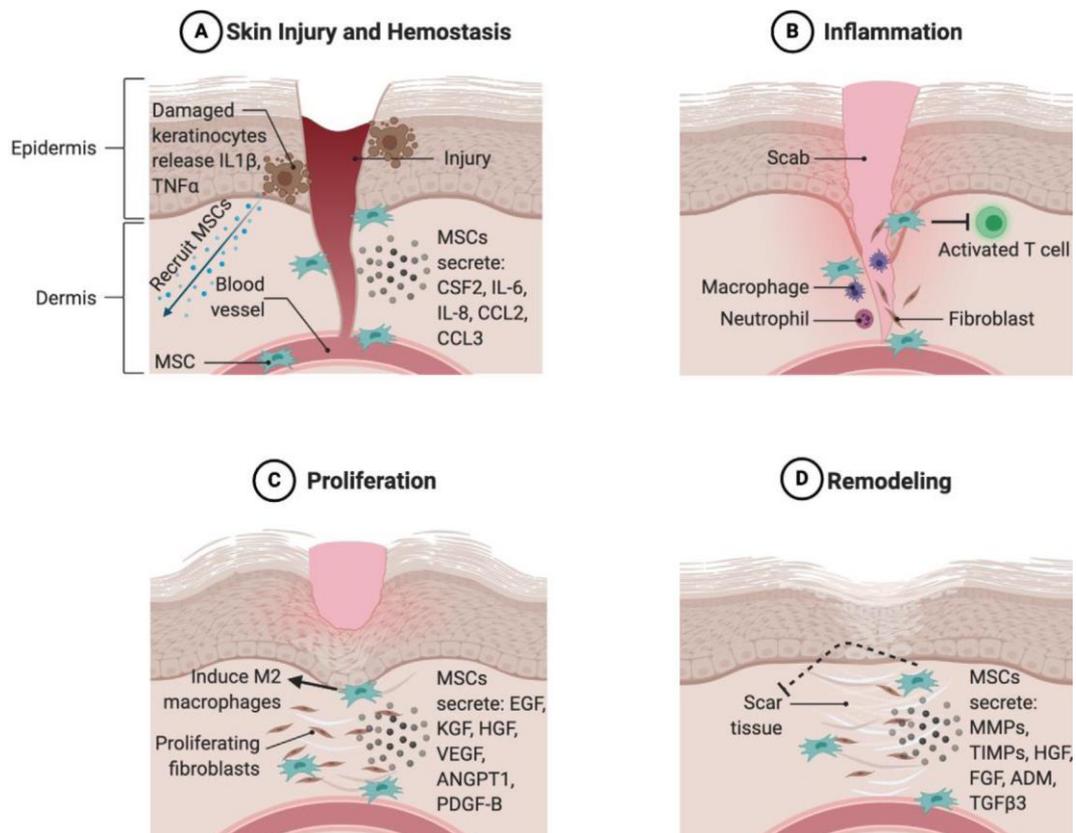
Pada fase proliferasi, sekretom MSC dapat memicu transisi makrofag dari fenotipe pro-inflamasi (M1) menjadi anti-inflamasi (M2), dimana makrofag M2 akan mengekspresikan sejumlah sitokin seperti IL-1RA, IL-4, IL-13, IL-

10 dan TGF- $\beta$  yang mendukung proses penyembuhan luka.<sup>49</sup> Molekul bioaktif dalam sekretom seperti EGF, bFGF, dan HGF juga dapat mengaktifasi jalur pengiriman sinyal PI3K/Akt dan/atau FAK/ERK1/2 yang kemudian akan meningkatkan proses migrasi dan proliferasi dari berbagai komponen seluler dermis yang penting dalam proses reepitelisasi, antara lain seperti fibroblas, keratinosit dan sel endotel. Molekul bioaktif dalam sekretom juga dapat memicu peningkatan sekresi komponen ECM seperti kolagen I dan III, sehingga akan mempercepat penyembuhan luka.<sup>8</sup>

Molekul lain seperti IL-6 diketahui dapat memicu pertumbuhan dan migrasi keratinosit, serta memicu sekresi VEGF dan TGF- $\beta$ 1 yang masing-masing berperan penting untuk proses angiogenesis dan pembentukan kolagen. Faktor terlarut VEGF, PDGF-BB dan FGFb dalam sekretom dapat memicu endotelisasi, neovaskularisasi, migrasi dan proliferasi sel epitel, pembentukan ECM, serta proses reepitelisasi di permukaan luka.<sup>16,49</sup> Senyawa bioaktif lain dalam sekretom yang juga turut berperan dalam memicu angiogenesis serta menjaga stabilitas pembuluh darah yang baru terbentuk ini antara lain meliputi Cyr61, Ang-1, Ang-2, VEGF, angiostatin, CXCL16, EGF, FGF, PDGF, GM-CSF, HGF, MCP-1, MMP-8 dan MMP-9.<sup>4</sup> Angiogenesis berperan penting untuk memberikan suplai oksigen, nutrisi dan mediator yang adekuat pada jaringan granulasi selama fase proliferasi. FGFb juga memiliki efek mitogenik dan kemoatraktan, sehingga berperan dalam memodulasi migrasi sel endotel, fibroblas dan keratinosit, serta memicu produksi kolagen.<sup>16</sup>

- **Fase Remodeling**

Pada fase remodeling, terjadi transisi dari jaringan granulasi menjadi jaringan parut, dimana kolagen tipe III akan digantikan dengan kolagen tipe I dan terjadi kontraksi luka, reorganisasi ECM, serta mulai berkurangnya angiogenesis. MMP dan TIMP yang terkandung dalam sekretom turut berperan dalam proses remodeling ECM, dimana MMP-13 memainkan peranan penting dalam meregulasi pemecahan jaringan granulasi dengan memodulasi fungsi miofibroblas untuk mensekresi molekul ECM, meregulasi proses proteolisis untuk mendegradasi matriks dan memicu kontraksi luka.<sup>16,49</sup>



**Gambar 10.** Peranan sekretom MSC pada berbagai fase penyembuhan luka.<sup>49</sup>

Sementara itu, FGFb, HGF, FGF, adrenomedullin dan TGF- $\beta$ 3 dapat memicu apoptosis dari jaringan granulasi dan meregulasi proses pembentukan miofibroblas, sehingga akan mencegah terjadinya inflamasi kronik serta pembentukan keloid dan parut hipertrofik.<sup>16,49</sup> Faktor parakrin yang terkandung dalam sekretom ini dapat menghambat jalur pengiriman sinyal TGF- $\beta$ R1/SMAD2 pada fibroblas dermis, sehingga akan mengurangi pengendapan kolagen tipe I yang berlebihan serta mengurangi diferensiasi miofibroblas.<sup>7</sup> Sebaliknya, faktor parakrin dalam sekretom akan meningkatkan jalur pengiriman sinyal WNT/ $\beta$ -catenin, sehingga memicu produksi kolagen tipe I untuk menggantikan kolagen tipe III serta mempercepat proses penutupan luka.<sup>50</sup>

## **2.7 Penggunaan Sekretom MSC untuk Penyembuhan Luka**

Sejumlah penelitian terdahulu telah mengevaluasi efektivitas dan keamanan penggunaan sekretom dari MSC untuk penyembuhan luka dan regenerasi kulit, meskipun mayoritas masih dilakukan menggunakan hewan coba dan jarang dilakukan pada manusia. Uji klinis umumnya dilakukan menggunakan formulasi sekretom topikal dan melibatkan terapi pada jenis luka kronik atau luka dengan penyulit seperti pada kondisi diabetik. Beberapa penelitian tersebut dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1.** Penelitian terdahulu yang mengevaluasi sekretom MSC pada luka.

<b>Peneliti dan Tahun Penelitian</b>	<b>Preparat Sekretom</b>	<b>Subjek</b>	<b>Perlakuan</b>	<b>Hasil Penelitian</b>
Shiekh et al. (2020) <sup>51</sup>	MSC-CM dari jaringan adiposa tikus	Tikus wistar model DM dengan luka terinfeksi	MSC-CM dalam cryogel untuk balutan luka	Kecepatan penutupan luka meningkat pada hari ke 4, 8, dan 14, disertai peningkatan reepitelisasi, maturasi epitel, pembentukan jaringan granulasi, endapan kolagen tipe I, dan angiogenesis pada hari ke 14.
Xiao et al. (2021) <sup>52</sup>	MSC-CM dari jaringan adiposa manusia	Tikus Balb/c model DM dengan luka eksisi <i>full-thickness</i>	MSC-CM dalam <i>Human acellular amniotic membrane scaffold</i> untuk balutan luka	Kecepatan penutupan luka meningkat pada hari ke 7, 10, dan 14, disertai berkurangnya infiltrasi sel imun dan peningkatan jumlah makrofag M2 pada luka, angiogenesis dan endapan kolagen.
An et al. (2021) <sup>53</sup>	MSC-CM dari jaringan adiposa manusia	Tikus Balb/c dengan luka <i>punch biopsy</i>	MSC-CM dalam gel carbomer topikal	Peningkatan kecepatan penutupan luka, endapan kolagen, jumlah adneksa kulit, angiogenesis dan susunan serabut ECM bila dibandingkan kontrol.
Zhu et al. (2020) <sup>54</sup>	MSC-CM dari jaringan tali pusat manusia	Tikus Balb/c dengan luka eksisi <i>full-thickness</i>	Sekretom MSC topikal (diaktivasi IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ )	Kecepatan penutupan luka meningkat pada hari ke 3–6, disertai peningkatan reepitelisasi, angiogenesis, dan konstiksi kolagen.
Fang et al. (2016) <sup>55</sup>	MSC-CM dari jaringan tali pusat manusia	Tikus ICR dan Balb/c dengan luka eksisi <i>full-thickness</i>	Sekretom MSC dalam HydroMatrix topikal	Kecepatan penutupan luka meningkat pada hari ke 14 dan 25, berkurangnya pembentukan jaringan parut dan akumulasi myofibroblas pada hari ke 25.
Putra et al. (2022) <sup>56</sup>	MSC-CM-T dari jaringan tali pusat tikus	Tikus Wistar dengan luka eksisi <i>full-thickness</i>	Gel MSC-CM-T topikal	Peningkatan kadar PDGF yang bermakna pada hari ke 3 dan 6 untuk kelompok gel dosis 100 $\mu$ L dan 200 $\mu$ L Peningkatan kecepatan penutupan luka pada semua kelompok terapi pada hari ke 6, dimana dosis 200 $\mu$ L nampak lebih efektif Peningkatan kepadatan fibroblas pada hari ke 6 pada kelompok dosis 200 $\mu$ L.

Data yang dipaparkan pada tabel di atas menunjukkan bahwa belum pernah dilakukan penelitian yang secara spesifik mengevaluasi pengaruh pemberian gel sekretom MSC yang distimulasi dengan TNF- $\alpha$  terhadap ekspresi HMGB1, TNF- $\alpha$  dan PDGF, serta manfaatnya dalam mempercepat proses penyembuhan defek luka akut *full-thickness* tanpa komplikasi pada tikus yang dievaluasi berdasarkan pada kecepatan penutupan luka dan desitas fibroblas.

