

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

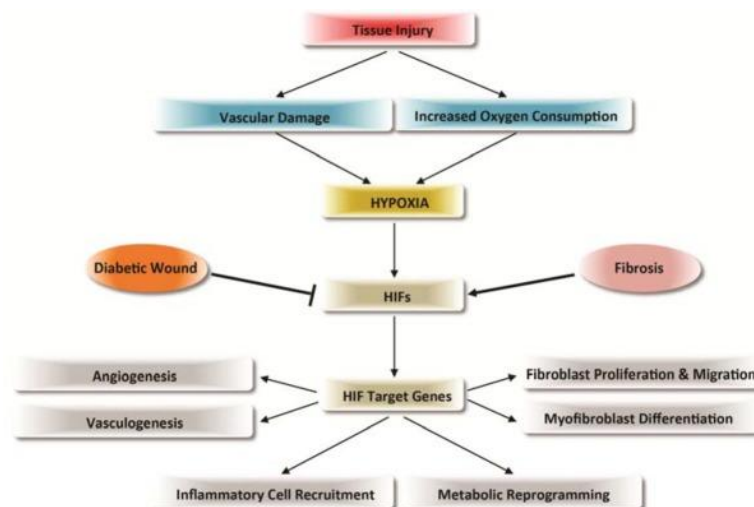
Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) merupakan faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam menjaga keseimbangan oksigen pada tingkat seluler dan sistemik, dan terkait dengan berbagai kontrol dalam tubuh. HIF-1 adalah heterodimer alfa dan beta subunit. Subunit alfa sebagian besar bergantung pada kadar oksigen dalam tubuh. Dalam berbagai kanker, HIF-1 α yang berlebihan dianggap terlibat dalam promosi pertumbuhan tumor dan metastasis. Selain itu, pada induksi hipoksia sistemik terjadi peningkatan HIF-1 α di jantung, otak, dan bahkan ginjal sebagai respons adaptasi terhadap hipoksia (Hong dkk, 2014; Xu dkk, 2020)

Cedera dapat berasal dari peristiwa internal dan eksternal, yang mengakibatkan stress mekanis/ kimiawi/ molekuler, dan memicu gangguan oksigenasi dan respons inflamasi (Chujia dkk, 2017; Li dkk, 2021; Suresh skk, 2019). Meskipun awal peradangan, pemulihan, penyembuhan, yang disebabkan cedera organ melalui proses seperti kerusakan jaringan, remodeling, fibrosis, dan gangguan oksigenasi namun semua proses ini akan melibatkan HIF-1 α (Bareto dkk, 2020). Dari beberapa penelitian saat ini menunjukkan bahwa HIF-1 α memainkan peran penting dalam memediasi cedera organ. Misalnya, peningkatan yang nyata dalam ekspresi HIF-1 α , baik secara lokal dan/atau sistemik tergantung pada penyakitnya, telah didokumentasikan. Kerusakan yang disebabkan berlaku untuk akut dan kronis penyakit yang dapat menyebabkan penurunan proses oksigenasi, dan sebanding dengan jumlah HIF-1 α yang disekresikan (Mitroshina dkk, 2021).

Pemahaman saat ini tentang cedera organ yang dapat menyebabkan keadaan iskemia dan gangguan reperfusi dimana pada cedera iskemia/reperfusi (I/R) ditandai dengan respons inflamasi yang diprakarsai oleh pemulihan aliran darah ke jaringan hipoksia di bawah stres oksidatif; iskemia yang berkepanjangan dapat menyebabkan nekrosis. Daripada memulihkan fungsi jaringan, kerusakan oksidatif terjadi dari induksi dan akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) dari sel-sel stres. Efek patologis pada iskemia dan Iskemia/Reperfusion dikaitkan dengan produksi ROS dan Hypoxia Induced Factor 1 α (HIF-1 α) yang bergantung pada TLR4/RAGE pada jaringan (Kaczorowski, dkk, 2009)

HIF-1 α diekspresikan dalam jumlah yang tinggi pada pasien dengan cedera organ atau transplantasi dan apoptosis; karenanya dianggap sebagai penanda cedera. Dengan demikian HIF-1 α terlibat dalam patogenesis cedera organ iskemik dikaitkan dengan aktivasi TLR4 dan RAGE (Tank, dkk, 2011; Greijer dkk, 2014).

Pada Gambar 1. Memperlihatkan tentang pengaturan penyembuhan luka dan fibrosis oleh hipoksia dan HIF-1 α . Pada cedera jaringan, kerusakan pembuluh darah, dan peningkatan konsumsi oksigen menghasilkan lingkungan mikro hipoksia yang mengarah pada induksi HIF-1 α . HIF-1 α mengaktifkan gen target yang berkontribusi pada proses penyembuhan dan remodeling luka; termasuk angiogenesis, vaskulogenesis, proliferasi dan migrasi fibroblas, diferensiasi miofibroblas, perekrutan sel inflamasi, dan pemrograman ulang metabolik. Induksi HIF-1 ditekan pada luka diabetes yang mengakibatkan penyembuhan tertunda. Sebaliknya, fibrosis dipicu oleh HIF dan hipoksia, memperparah perkembangan patogen gangguan fibrotic (Ruthenborg dkk, 2015).



Gambar 1. 1Mekanisme pelepasan HIF-1 α akibat adanya injury atau kerusakan jaringan (Ruthenborg dkk, 2015)

Penentuan umur luka (wound age) sangat penting pada Bagian Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal), karena hal ini dapat menentukan secara tepat kapan kejadian sebenarnya dari suatu kasus kejahatan dalam proses visum et repertum.(Li, dkk, 2018; Indiaminovich. dkk. 2021, Mao dkk, 2011; Grellner, dkk, 2007).

Sejalan dengan umur luka (wound age) akibat kerusakan jaringan dimana akan mengalami proses inflamasi dan hal ini akan melibatkan HIF-1 α . Sehingga memungkinkan HIF-1 α dapat digunakan sebagai biomarker penentuan umur luka (wound age) pada kasus kejahatan dibidang Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal).

HIF-1 α merupakan biomarker yang sangat berpengaruh dan terlibat langsung dalam proses awal terjadinya proses inflamasi, proliferasi dan regenerasi jaringan akibat injury maupun infeksi.

Sifat aktifasi HIF-1 α terlibat pada proses awal terjadinya kerusakan dan ini mungkin dilakukan penelitian untuk menganalisa ekspresi HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) dan ini merupakan modal dasar dalam penentuan umur luka (wound age) berdasarkan biomarker HIF-1 α secara akurat dibidang Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal).

Penentuan umur luka (wound age) sangat penting pada Bagian Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal), karena hal ini dapat menentukan secara tepat kapan kejadian sebenarnya dari suatu kasus kejahatan dalam proses visum et repertum. (Li, dkk, 2018; Indiaminov. dkk. 2021)

Berdasarkan latar belakang diatas maka akan dilakukan penelitian untuk menganalisa ekspresi mRNA gen HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) dan ini merupakan modal dasar dalam penentuan umur luka (wound age) dengan menggunakan biomarker HIF-1 α secara akurat.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka masalah tersebut dapat diuraikan sebagai berikut:

1. Bagaimana ekspresi mRNA gen HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) pada mencit Balb/c ?
2. Apakah ekspresi mRNA gen HIF-1 α akan meningkat sejalan dengan umur luka (wound age) dan kapan terjadi penurunan kembali ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1. Tujuan Umum

Menganalisa ekspresi mRNA gen HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) pada mencit Balb/c.

2. Tujuan Khusus

1. Menganalisa ekspresi mRNA gen HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) pada mencit Balb/c.
2. Menentukan lama waktu peningkatan terjadi dari ekspresi mRNA gen HIF-1 α setelah luka dan kapan waktu penurunan berdasarkan umur luka (wound age) pada mencit Balb/c.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1. Diharapkan dapat digunakan sebagai biomarker molekuler dalam penentuan umur luka (wound age) pada kasus forensik
2. Memberikan informasi kepada pengadilan/penyidik dalam visum et repertum dalam rangka menentukan waktu perlukaan yang tepat dan akurat

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Umur luka (Wound age)

Menentukan usia luka (wound age) merupakan tantangan dalam patologi forensik, dimana sangat berguna dan dapat berkontribusi pada rekonstruksi Tempat Kejadian Perkara (TKP) dan mengarah pada penangkapan tersangka (Casse, dkk, 2016; Wang, dkk, 2016; Ishida dkk, 2015)

Ahli Forensik harus dapat mengidentifikasi waktu dan urutan cedera dalam kasus yang melibatkan banyak trauma oleh pelaku dimana hukuman biasanya bervariasi sesuai dengan tingkat keparahan cedera. Dalam kasus kematian dengan kekerasan, fokus utama adalah pada apakah cedera disebabkan saat individu masih hidup atau selama periode agonal atau postmortem, dan berapa lama korban bertahan setelah luka ditimbulkan (Casse, dkk, 2016; Wang, dkk, 2016; Mao dkk, 2011).

Setelah menimbulkan luka, serangkaian reaksi vital (misalnya perdarahan, infiltrasi sel inflamasi, pembentukan jaringan granulasi) harus dipertimbangkan untuk mendapatkan bukti yang meyakinkan dari cedera antemortem. Reaksi antemortem ini secara kolektif disebut "vitalitas", yang terkait dengan apakah korban masih hidup pada saat trauma dan berapa lama sebelum kematian korban trauma itu ditimbulkan. Vitalitas luka dapat dievaluasi dengan menggunakan teknik morfologi, sitologi, dan biologi molekuler. Sejumlah biomarker yang terlibat dalam reaksi vital dilaporkan meningkatkan akurasi estimasi usia luka (Oehmichen dkk, 2004; Cecchi dkk, 2010; Grellner dkk, 2007)

Namun, diyakini secara luas bahwa tidak ada parameter atau metode yang ditetapkan yang menghasilkan data ini karena non-spesifisitas, pengulangan yang buruk, dan kinerja diagnostik yang tidak memadai dari biomarker dan keterbatasan teknik yang digunakan. Oleh karena itu, kriteria yang sistematis dan spesifik untuk mengidentifikasi penanda yang berguna diperlukan, dan teknik yang lebih maju harus diterapkan untuk menghasilkan data dengan akurasi dan objektivitas yang ditingkatkan. Karena estimasi usia luka merupakan masalah yang rumit dan multifactorial dan mirip dengan prakiraan cuaca atau penggunaan kombinasi beberapa parameter dapat mengurangi kesalahan dalam estimasi usia luka.

Kendala lain adalah ketersediaan, dan masalah etika yang tidak dapat diabaikan, menggunakan spesimen manusia dengan waktu kematian yang diketahui (Fronczek dkk, 2015a; Fronczek dkk, 2015b). Oleh karena itu, penelitian pada hewan sangat penting, tetapi penerapan hasilnya pada manusia tidak memiliki bukti pendukung yang pasti. Dengan demikian, masalah tentang bagaimana mentransfer hasil yang diperoleh pada model hewan ke manusia dan bagaimana memanfaatkan secara efektif sejumlah besar data yang dihasilkan untuk menentukan waktu cedera tetap belum terselesaikan.

Karena frekuensi di mana kejadian luka ditemui dalam praktek forensik yang tersering ialah kulit, otot rangka, dan jaringan otak di sekitar luka yang ditimbulkan adalah jaringan yang paling diperiksa dalam pemeriksaan dengan trauma yang melibatkan sayatan atau memar. Misalnya, karena kerusakan otak sering terlibat dalam kasus kematian akibat kekerasan dan biasanya berakibat fatal, banyak penelitian berfokus pada memperkirakan usia luka dalam kasus yang melibatkan kerusakan otak. Otot rangka dan kulit juga telah menjadi subjek dari sebagian besar studi eksperimental dan investigasi saat ini (Takamiya dkk, 2007; Rashid dkk, 2014; Zhang dkk, 2015).

Eksperimen pada hewan memiliki keuntungan karena dapat dikontrol, yang meningkatkan reproduktifitas dan keandalan hasil. Mereka juga memfasilitasi penyelidikan proses perbaikan luka, yang merupakan respons fisiologis dasar dan serupa pada manusia dan hewan. Selain itu waktu setelah cedera juga dapat dikontrol.

Sejauh mana hasilnya berlaku untuk manusia, bagaimanapun, masih belum jelas, yang menunjukkan bahwa penanda dengan tingkat homologi urutan yang tinggi harus digunakan karena mereka cenderung menampilkan fungsi yang sama selama perbaikan luka. Dimungkinkan juga untuk menggunakan sampel manusia sebagai standar kalibrasi untuk data hewan untuk meningkatkan akurasi estimasi waktu cedera dalam praktik forensik (Grellner dkk, 2007; Gauchotte dkk, 2013)

Pada saat cedera, biasanya terlihat kebocoran sel darah inflamasi dari jaringan yang rusak dan aktivasi mikroglia setelah stimulasi mekanis. Selain itu, pertumbuhan yang kuat dan propagasi astrosit reaktif menunjukkan bahwa mereka memiliki peran penting dalam penyembuhan luka (Suzuki T, dkk, 2012).

Dinamika gliosit dan sel inflamasi (zat yang dilepaskan) umum digunakan untuk mengetahui umur luka pada otak. Pada tahun 2007, Takamiya dkk,

menyarankan bahwa ekspresi tergantung umur luka dan ada sekitar 27 sitokin pada luka serebral dapat membantu memperkirakan umur luka. Dari beberapa penelitian sebelumnya, banyak tingkat ekspresi biomarker telah dipelajari dengan beragam teknik untuk penentuan umur luka. Penanda yang digunakan untuk memperkirakan umur luka di otak ditunjukkan pada Tabel dibawah ini (Li, dkk, 2018).

Tabel 2. 1 Konsentrasi dari biomarker berdasarkan usia trauma pada otak (Li, dkk, 2018)

Biomarkers Technique		Post-traumatic interval								
		0 h	1 h	6 h	12 h	1 d	3d	5 d	7 d	14 d
PSD95	WB			+	++	+	+	++	+	
MAP-2	RT-qPCR		+	+		+	+	+	+	++
β-APP	IHC, WB		+	+	++	+	+	+	+	
	RT-PCR		+	+						
	IHC			+	+	+				
	IHC				+	++	+			
TGF-β1	IHC			+	+	+	++	+	+	
HO-1	IHC			+	++	++	+	+	+	+
HIF-1α	IHC		++	+	+	+	+	+	+	
CD11b	IHC		+	+	++	+	+	+	+	
IL-6	IHC		+	+	++	+	+			
Caspase-9	ELISA				++	++	+	+	+	
TNF-α	IHC		+	++	+	+	++	+	+	
MMP-9	IHC		+	+	+	+	+	++	+	+
NTE	IHC				+	++	+	+	+	+
COX-2	IHC		+	+	+	++	+	+	+	
CaMK-II	IHC, WB				+	+	++	+	+	+
HAX-1	WB			++	+	+				
Caspase-3	WB			+	+	+	++	+	+	
RAGE	WB, IHC			+	+	++	+	+		
HMGBI	WB			++	+	+				
	IHC		+	++	+	+				
c-Fos	IHC		+	+	+	+	++	+	+	
c-Jun	IHC		+	++	+	+	+	+	+	
vWF	IHC				+	++				
NFL	IHF				+	++	+			

		Post-traumatic interval								
Biomarkers Technique		0 h	1 h	6 h	12 h	1 d	3d	5 d	7 d	14 d
IL8	IHC						+	++	+	+

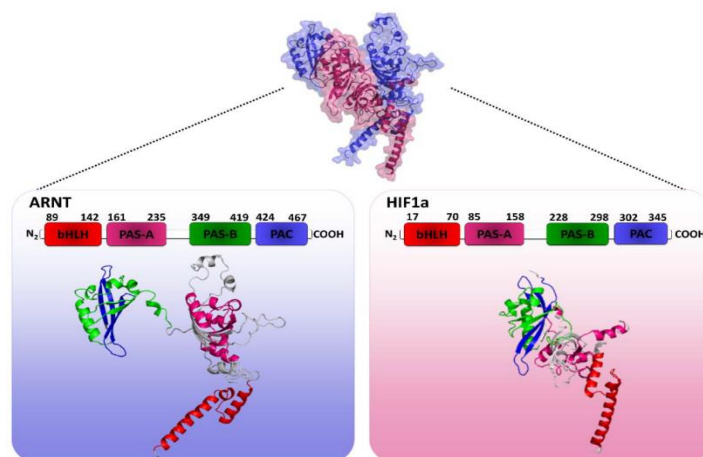
IHC: immunohistochemical; IHF: immunofluorescence; WB: Western blotting; +: significant difference between the control and injury groups; ++: the greatest change during the post-trauma period.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, maka terlihat bahwa belum pernah dilakukan penentuan ekspresi mRNA gen HIF-1 α pada mencit Balb/c sebagai biomarker dalam menentukan umur luka (wound age).

2.2. Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)

Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) adalah subunit dari faktor transkripsi heterodimer hipoksia-inducible factor-1 (HIF-1) yang dikodekan oleh gen HIF1A (Weidemann dan Johnson, 2018).

HIF-1 α adalah domain dasar helix-loop-helix PAS yang mengandung protein, dan dianggap sebagai pengatur transkripsi utama dari respons seluler dan perkembangan terhadap hipoksia (Kewley dkk, 2004). Disregulasi dan overekspresi HIF-1 α baik oleh hipoksia atau pergantian genetik telah sangat terlibat dalam biologi kanker, serta sejumlah patofisiologi lainnya, khususnya di bidang vaskularisasi dan angiogenesis, metabolisme energi, kelangsungan hidup sel, dan invasi tumor (Infantino dkk, 2021)

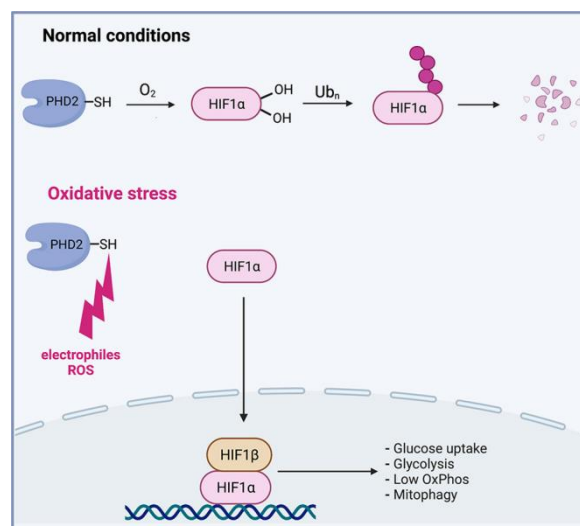


Gambar 2. 1Struktur kimia Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α). (Yang dkk, 2021; Alves dkk, 2021).

Representasi 3D dari pemodelan struktur kuaterner HIF1 manusia (kompleks HIF1 α -ARNT). Rantai A disorot mengacu pada subunit β (ARNT) berwarna biru dan rantai B disorot mengacu pada subunit α (HIF-1 α) berwarna merah muda. Kotak adalah struktur dari setiap rantai terpisah dengan domain protein bergambar.

Pengatur utama kontrol ekspresi gen dalam hipoksia adalah hipoksia inducible factor 1 (HIF1), protein heterodimerik yang termasuk dalam keluarga dasar helix-loop-helix PER-ARTN-SIM (bHLH-PAS). Sebagai pengatur utama homeostasis oksigen, HIF1 juga berkontribusi pada pertumbuhan tumor dan peningkatan ekspresinya dikaitkan dengan prognosis jelek. Oleh karena itu, pemahaman regulasi gen oleh HF1 telah dianggap sebagai target terapi yang potensial. Heterodimer HIF-1 dibentuk oleh subunit α (HIF-1 α), yang stabilitasnya diatur oleh oksigen, dan subunit β yang stabil (ARNT). Di kedua subunit, domain N-terminal (bHLH-PAS-A/B-PAC) bertanggung jawab untuk dimerisasi dan pengikatan DNA, sedangkan domain C-terminal diperlukan untuk stabilisasi dan transaktivasi protein.

2.3. Aktivitas, Fungsi dan Keterlibatan HIF-1 α dalam penyembuhan luka dan berbagai penyakit



Gambar 2. 2 Regulasi aktifitas HIF-1 α pada keadaan normal dan hipoksia (Cyran dan Zhitkovich, 2022).

Pada gambar 2 terlihat regulasi HIF-1 α yang dipengaruhi oleh O₂ dan oksidan. Faktor transkripsi yang diinduksi hipoksia HIF-1 α adalah heterodimer yang terdiri dari HIF-1 β yang stabil dan subunit HIF-1 α yang tidak stabil yang

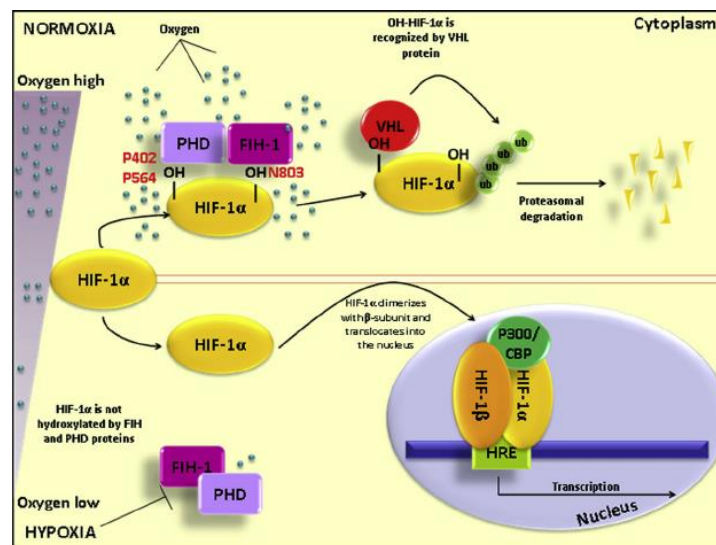
diatur oleh O₂. HIF-1 α diekspresikan secara konstitutif, tetapi terlihat dalam sel normoksik pada tingkat yang sangat rendah karena degradasinya oleh proteasom 26S. Hidroksilasi dua residu Pro dalam HIF-1 α oleh hidroksilase yang bergantung pada O₂ PHD1-3 (terutama PHD2) bertindak sebagai pemicu ubiquitination proteolitiknya. Pada hipoksia, Pro hidroksilasi HIF1 α ditekan karena kekurangan O₂. Beberapa Cys-SH dalam domain katalitik PHD2 (juga dikenal sebagai EGLN1) sensitif terhadap oksidasi atau adduksi oleh berbagai ROS, RNS, dan logam beracun, dan menyebabkan hilangnya aktivitas hidroksilasi Pro-nya. Stabilisasi HIF-1 α mengaktifkan program transkripsi khusus yang dikenal sebagai respons hipoksia yang merangsang penyerapan glukosa, meningkatkan glikolisis, menurunkan pengaturan fosforilasi oksidatif dalam mitokondria, dan mendorong mitofaga (Cyran dan Zhitkovich, 2022)

HIF-1 α adalah faktor transkripsi yang berfungsi sebagai pengatur utama homeostasis oksigen. HIF-1 α mengatur ekspresi protein yang meningkatkan pengiriman oksigen, yang memungkinkan sel untuk bertahan hidup dalam kondisi kekurangan oksigen. Berdasarkan informasi tentang jenis gen mana yang dikendalikan oleh HIF-1 α , tampak bahwa HIF-1 α menyediakan kelangsungan hidup jaringan patologis di daerah hipoksia atau aktivitas angiogenik. Oleh karena itu, penghambat HIF-1 α dapat berguna sebagai agen terapeutik untuk berbagai penyakit yang terkait dengan aktivasi HIF-1 α yang berlebihan, seperti kanker, remodeling kardiovaskular, preeklamsia, dan penyakit terkait angiogenesis lainnya. Dalam ulasan ini, kami meringkas regulasi HIF-1 yang bergantung oksigen dan tidak bergantung oksigen dan memperkenalkan penghambat HIF-1 prospektif yang mungkin berguna dalam pengobatan penyakit terkait HIF-1 (Park dkk, 2014). Pada penelitian sebelumnya beberapa penyakit yang mempunyai hubungan erat dengan peningkatan HIF-1 α misalnya pada infeksi, kerusakan kardiovaskuler akibat pemberian doxorubicin dan kanker (Devray dkk, 2021; Syukri dkk, 2022; Gunawan dkk, 2020). Demikian pula, dengan pemberian herbal medicine yang mengandung golongan flavonoid dapat juga dipakai untuk menekan produksi HIF-1 α pada penyakit infeksi dan kanker (Rosamarlina dkk, 2022; Yanto dkk, 2020; Samec dkk, 2021)

Pengaturan sekresi HIF-1 α pada keadaan normal dan hipoksia

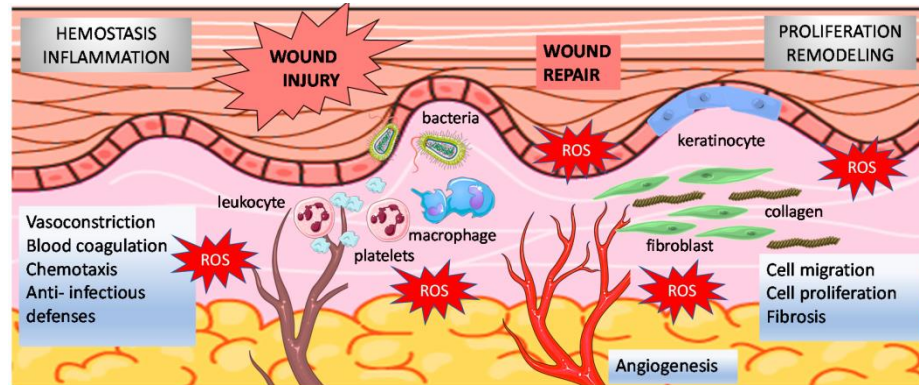
Pada gambar 4 memperlihatkan HIF-1 α regulasi yang bergantung pada oksigen. Stabilitas protein HIF-1 α peka terhadap oksigen. Dalam kondisi

normoksik, hidroksilasi residu prolin yang bergantung pada O₂-dependent hydroxylation dari residu proline 402 dan 564 dalam HIF-1 α oleh enzim PHD yang diperlukan untuk pengikatan protein VHL tumour-suppressor, yang merupakan komponen pengenalan ligase protein ubiquitin E3. Ubiquitylation dari HIF-1 α menargetkan protein untuk degradasi oleh proteasome 26S. Hidroksilasi yang bergantung pada O₂-dependent hydroxylation dari residu proline 402 dan 564 oleh enzim FIH-1 memblokir pengikatan p300 dan CBP dengan HIF-1 α dan karenanya akan menghambat transkripsi gen yang dimediasi HIF-1 α . Dalam kondisi hipoksia, laju hidroksilasi asparagin dan prolin menurun. Protein VHL-tumor supressor tidak dapat berikatan dengan HIF-1 α yang tidak dihidroksilasi prolyl, mengakibatkan penurunan laju degradasi HIF-1 α . Sebaliknya, p300 dan CBP dapat berikatan dengan HIF-1 α yang tidak terhidroksilasi asparaginil, memungkinkan aktivasi transkripsi gen target HIF-1 α .



Gambar 2. 3 Pengaturan sekresi HIF-1 α pada keadaan normoxia dan hypoxia

Proses penyembuhan luka terdiri dari 4 tahap dimana setiap tahap akan memperlihatkan peningkatan ROS yaitu tahap hemostasis dan inflamasi, tahap wound injury, tahap wound repair dan proliferasi remodeling. (Gambar 5)



Gambar 1. 2 Fase penyembuhan luka normal. (Cano dkk, 2018)

Hubungan antara penyembuhan luka dan spesies oksigen reaktif (ROS) diilustrasikan seperti pada gambar 5 diatas. Dan telah diketahui bahwa ROS mempunyai hubungan yang sangat erat dengan stress oksidasi dan aktifitas HIF- α . Pada fase hemostatik dan inflamasi, sejumlah besar superoksida dihasilkan dari molekul oksigen terutama oleh oksidase NADPH yang diekspresikan dalam sel imun. Pensinyalan redoks juga penting untuk memodulasi peristiwa penting yang terjadi selama fase migrasi sel, proliferasi, fibrosis, dan remodeling.

Sedangkan generasi ROS selama penyembuhan luka normal terkait dengan aktivasi NOX, adanya hipoksia merangsang produksi oksidan oleh electron transport chain (ETC) dari mitokondria terutama melalui kompleks I dan III. Pengamatan ini bersifat paradoks, dalam arti bahwa superoksida adalah produk reduksi satu elektron O_2 , yang tereduksi dalam keadaan hipoksia. ROS turunan ETC ditransfer melintasi ruang antar-membran untuk mencapai sitosol di mana mereka bertindak sebagai pembawa pesan kedua. Selama hipoksia, mitokondria menambah pelepasan ROS di sitosol, yang tampaknya berlawanan dengan intuisi karena tekanan O_2 berkurang di kompartemen mitokondria. Pelepasan ROS mitokondria yang diinduksi hipoksia telah terbukti mengaktifkan pensinyalan perlindungan sel melalui mekanisme transkripsi dan pasca-translasi (Cano dkk, 2018)

Sejalan, kadar oksigen rendah yang mengarah ke produksi ROS mitokondria mengaktifkan prolyl-4-hidroksilase. Prolyl-4-hydroxyases dapat menginduksi aktivasi hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), yang terlibat dalam regenerasi jaringan yang hilang atau rusak pada mamalia. Dalam lingkungan mikro dari luka awal, iskemia akibat gangguan vaskular dan konsumsi O_2 yang tinggi oleh sel kompeten imun dapat mendukung penipisan O_2 dan hipoksia. Selain itu, kondisi patologis, seperti diabetes, merusak aliran darah

mikrovaskular, sehingga memperberat oksigenasi jaringan, sedangkan hipoksia sementara setelah cedera dapat bermanfaat untuk penyembuhan luka, hipoksia berkepanjangan atau kronis menunda penyembuhan luka. Perbaikan luka yang terganggu pada jaringan hipoksia berhubungan dengan kombinasi mekanisme yang meningkatkan produksi ROS dan menurunkan pertahanan antioksidan.

2.4. Fase penyembuhan luka

Tubuh kita menangani kerusakan jaringan dengan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh sebagai respons terhadap molekul intraseluler yang dilepaskan oleh jaringan yang terluka yang disebut *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Prosesnya sama dengan dengan cara mendeteksi molekul pathogen yang dikenal sebagai *pathogen-associated molecular patterns* (Bianchi ME, 2015). DAMPs adalah molekul endogen yang dilepaskan dari sel yang rusak atau sekarat akibat stres seluler atau cedera jaringan dan dianggap sebagai sinyal bahaya endogen yang selanjutnya menginduksi respon inflamasi pada sistem kekebalan bawaan (*innate immune system*) dengan berinteraksi dengan *pattern recognition receptors* (PRRs) seperti *Toll-like receptors* (TLRs) (Roh JS, Sohn DH, 2018).

DAMPs dilepaskan dari ruang ekstraseluler atau intraseluler setelah cedera jaringan atau kematian sel yang akan dikenali oleh makrofag dan memicu respons inflamasi dari jalur-jalur yang berbeda termasuk jalur TLRs dan *inflammasome*. DAMPs dapat berasal dari berbagai sumber yang berbeda, antara lain: yang termasuk protein ekstraseluler, seperti biglycan dan tenascin C, sedangkan yang termasuk protein intraseluler seperti *high-mobility group box 1* (HMGB1), *histones*, protein S100, *heat-shock proteins* (HSPs) dan protein plasma semisial fibrinogen, Gc-globulin, dan serum amyloid A (SAA) (Roh JS, Sohn DH, 2018).

Luka didefinisikan sebagai gangguan fungsional morfologis dari kontinuitas struktur jaringan (Khalaf AA dkk, 2019). Luka dapat berkisar dari yang sederhana berupa kerusakan integritas epitel kulit atau bisa lebih dalam yang meluas ke jaringan subkutan dengan kerusakan lainnya struktur seperti tendon, otot pembuluh darah, saraf, organ parenkim dan bahkan tulang. Luka dapat timbul dari proses patologis yang dimulai dari dalam maupun luar organ yang terluka. Demikian juga, luka dapat terjadi karena kecelakaan, kesengajaan dan

sebagai hasil akhir dari suatu penyakit. Luka, apapun penyebabnya dan apapun bentuknya, merusak jaringan dan mengganggu lingkungan lokal di dalamnya.

Respon fisiologis terhadap benda yang berbahaya adalah perdarahan, kontraksi pembuluh darah, pembekuan darah, aktivasi komplemen dan respon inflamasi. Penyembuhan luka yang normal berlangsung dinamis dan rumit karena proses berlangsung saling berkaitan baik proses perdarahan, pembekuan darah, inisiasi respon peradangan akut di area luka, regenerasi, migrasi dan proliferasi jaringan ikat dan sel parenkim seperti sintesis protein matriks ekstraseluler, remodeling parenkim baru maupun jaringan ikat longgar serta deposit kolagen. Pada akhirnya, proses perbaikan luka berakhir dengan penyambungan jaringan yang terputus (Rodrigues M dkk, 2019).

Terdapat 4 fase penyembuhan luka, yaitu : koagulasi dan haemostatis, yang dimulai segera setelah adanya injury, inflamasi yang dimulai segera setelah proses pertama diatas, proliferasi yang dimulai dalam beberapa hari dari perlukaan yang akan membutuhkan waktu.

2.5. Koagulasi dan haemostasis

Segera setelah terjadinya luka, koagulasi dan haemostasis berlangsung pada luka. Prinsip utama dari proses ini adalah mencegah pengeluaran darah. Ini merupakan cara untuk melindungi system vaskuler, menjamin tetap intake/utuh, sehingga fungsi organ vital tidak akan terganggu akibat luka tersebut. Fungsi yang lebih jangka panjang adalah menyediakan matriks yang dibutuhkan sel-sel yang akan migrasi ke area luka pada fase inflamasi. Keseimbangan sel endothelial, trombosit, koagulasi dan fibrinolysis mengatur haemostasis dan menentukan jumlah fibrin yang akan menutup area luka. (Kondo T, Ishida Y. 2010)

Bersamaan dengan proses haemostasis, cascade koagulasi diaktifasi baik jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik yang menghasilkan agregasi trombosit dan pembentukan bekuan darah sehingga mencegah perdarahan. Ketika darah tumpah ke area luka, komponen darah dan trombosit bersinggungan dengan matriks kolagen dan matriks ekstraseluler lainnya. Kontak ini menyebabkan dilepaskannya faktor pembekuan darah dari trombosit dan dibentuk bekuan darah yang terdiri dari fibronectin, fibrin, vitronectin, thrombospondin. Bekuan darah dan trombosit yang terperangkap didalam bekuan darah tidak hanya penting dalam haemostasis, bekuan darah juga berguna menyediakan matriks

khusus untuk migrasi sel pada fase haemostasis berikutnya dan fase inflamasi. Sitoplasma dari trombosit diisi oleh growth factor dan cytokines seperti *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *epidermal growth factor and insulin-like growth factors*, molekul molekul ini berperan sebagai pemantik cascade penyembuhan luka dengan mengaktifasi dan menarik migrasi sel netrofil, kemudian selanjutnya makrofag, sel endothelial dan fibroblast. Trombosit juga mempunyai vasoaktif amine seperti serotonin yang akan menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang menimbulkan ekstrasvasi cairan sehingga terjadilah edema. Eicosanoids dan produk arachidonic acid lainnya dilepaskan ke membrane sel yang berpotensi dalam respon inflamasi.

2.6. Fase Inflamasi

Fase inflamasi meliputi fase humoral dan seluler yang bertujuan sebagai barrier invasi mikroorganisme. Fase inflamasi dibagi menjadi 2 fase, yaitu : fase inflamasi awal dan fase inflamasi lanjut. Fase inflamasi awal dimulai pada akhir fase koagulasi yang mempunyai banyak fungsi untuk mengaktifasi cascade complement dan memulai proses molekuler yang terutama ditandai dengan infiltrasi netrofil yang akan mencegah infeksi. Neutrophil akan memfagositosis dan memusnahkan bakteri, benda asing dan sel mati. Neutrofil mulai tertarik ke area luka dalam waktu 24-36 jam setelah dilepaskannya banyak agen kemoatraktif termasuk TGF B, komponen complement seperti C3a dan C5a serta formylmethionyl peptides yang dihasilkan oleh bakteri dan trombosit.

2.7. Fase Proliferasi

Setelah area luka bersih dari bakteri dan kuman oleh sel darah putih, selanjutnya, sel darah merah yang kaya akan oksigen datang ke area tersebut untuk membangun jaringan baru yang disebut jaringan parut. Tahap ini disebut sebagai fase proliferasi. Oksigen yang dibawa oleh sel darah merah juga akan membantu pembentukan jaringan yang baru. Tubuh juga akan mulai memproduksi kolagen, yang berperan sebagai penyangga untuk jaringan yang sedang diperbaiki. Proses ini akan membuat bekas luka yang awalnya terlihat berwarna kemerahan, lalu lama-kelamaan memudar.

2.8. Proses penguatan jaringan/maturasi

Proses penyembuhan luka yang terakhir atau fase maturasi adalah untuk menguatkan jaringan yang baru terbentuk. Bekas luka terlihat seperti kulit yang ditarik melebar. Itu adalah salah satu usaha tubuh agar jaringan kulit yang baru benar-benar kuat di tempatnya. Penyembuhan total bisa memakan waktu beberapa hari, minggu, atau bahkan tahun. Saat sudah sembuh total, maka jaringan tersebut akan kembali sekuat sebelumnya, saat sebelum mengalami perlukaan

terlama dalam proses penyembuhan luka, dan terakhir adalah remodeling luka yang berupa pembentukan jaringan parut yang bisa berlangsung dalam setahun bahkan lebih dari setahun.

Dari penjelasan diatas maka dapat disimpulkan bahwa HIF-1 α akan terlibat dalam proses dikeempat fase penyembuhan luka tersebut (Cano dkk, 2018).

2.9. Hubungan umur luka (wound age) dengan HIF-1 α

Penentuan umur luka (wound age) sangat penting pada Bagian Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal), karena hal ini dapat menentukan secara tepat kapan kejadian sebenarnya dari suatu kasus kejahatan dalam proses visum et repertum. (Li, dkk, 2018; Indiaminovich. dkk. 2021, Mao dkk, 2011; Grellner, dkk, 2007).

Sejalan dengan umur luka (wound age) akibat kerusakan jaringan dimana akan mengalami proses inflamasi dan hal ini akan melibatkan HIF-1 α . Sehingga memungkinkan HIF-1 α dapat digunakan sebagai biomarker penentuan umur luka (wound age) pada kasus kejahatan dibidang Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal).

HIF-1 α merupakan biomarker yang sangat berpengaruh dan terlibat langsung dalam proses awal terjadinya proses oksidasi, inflamasi, proliferasi dan regenerasi jaringan akibat injury maupun infeksi. Namun sampai saat ini, belum ada penelitian yang menghubungkan antara aktifitas HIF-1 α dengan umur luka (wound age).

Sifat aktivasi HIF-1 α terlibat pada proses awal terjadinya kerusakan dan ini memungkinkan dilakukan penelitian untuk menganalisa ekspresi HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) dan ini merupakan modal dasar dalam

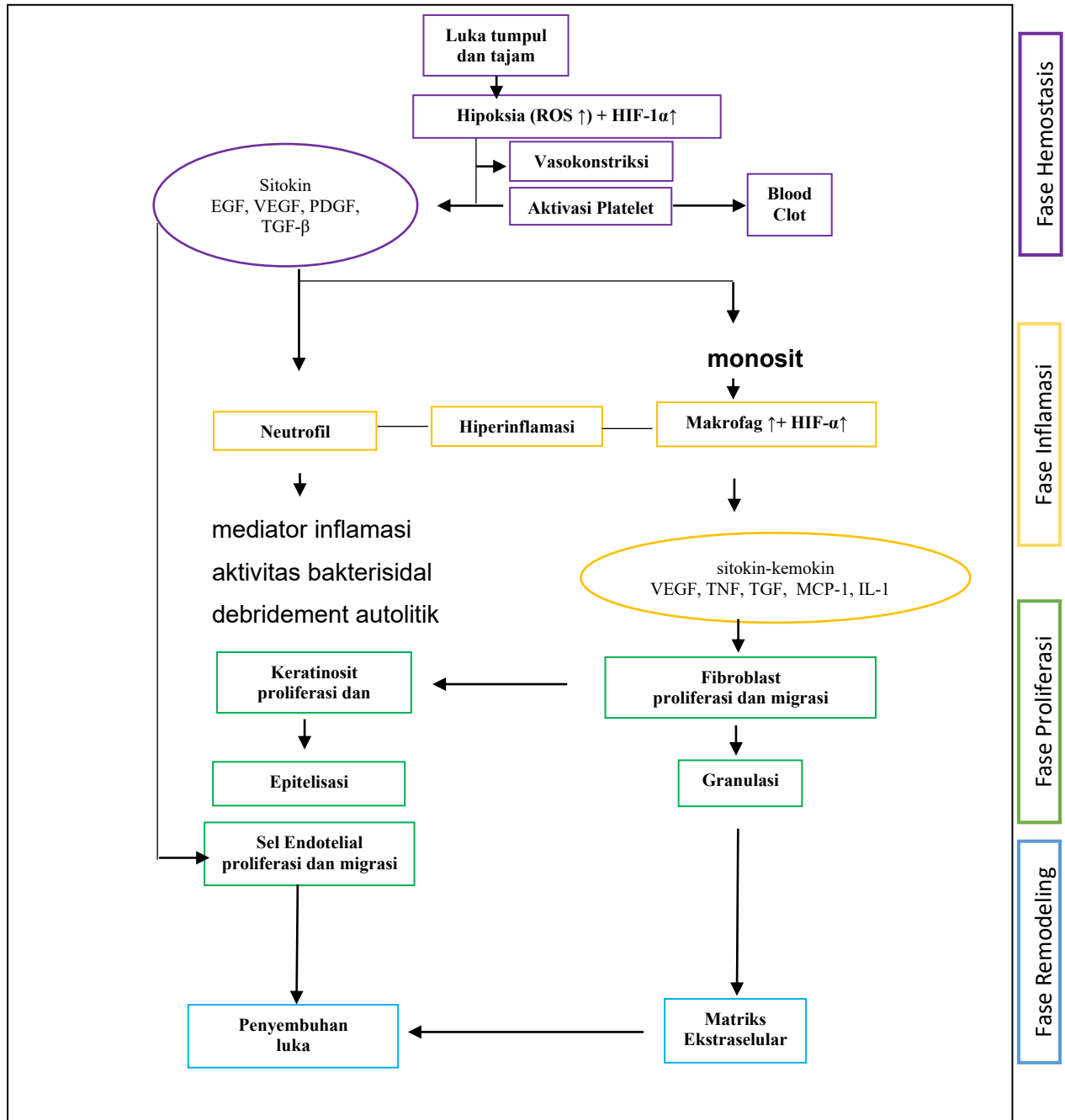
penentuan umur luka (wound age) berdasarkan biomarker HIF-1 α secara akurat dibidang Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal).

Penentuan umur luka (wound age) sangat penting pada Bagian Kedokteran Kehakiman (Forensic Medicolegal), karena hal ini dapat menentukan secara tepat kapan kejadian sebenarnya dari suatu kasus kejahatan dalam proses visum et repertum. (Li, dkk, 2018; Indiaminov. dkk. 2021)

Berdasarkan latar belakang diatas maka akan dilakukan penelitian untuk menganalisa ekspresi mRNA gen HIF-1 α berdasarkan umur luka (wound age) dan ini merupakan modal dasar dalam penentuan umur luka (wound age) dengan menggunakan biomarker HIF-1 α secara akurat.

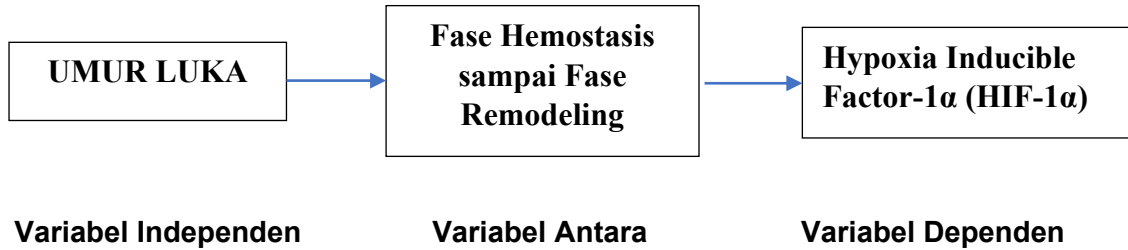
BAB III

KERANGKA TEORI



BAB IV

KERANGKA KONSEP



Gambar 4. 1 Kerangka Konsep

4.1. Definisi Operasional

1. Ekspresi mRNA gen HIF-1 α ialah nilai dari ekspresi mRNA gen Hypoxia Inducible Factor 1 α yang dinilai dengan menggunakan teknik realtime PCR dan diukur dalam satuan fold change.
2. $\Delta\Delta Ct$ = delta delta Ct ialah selisih antara ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan sebagai internal kontrol mRNA gen GAPDH (Gliseraldehid-3-fosfat dehydrogenase) yang diukur dalam {rata rata (triplicate) ΔCt mRNA gen HIF-1 α sampel 1} – {rata rata (triplicate) ΔCt GAPDH sampel 1}
3. Wound age (umur luka) ialah waktu yang dihitung dari saat terjadinya luka iris pada mencit Balb/c dan diukur dalam skala rasio dan satuannya adalah menit; jam dan hari.
4. Balb/c ialah strain mencit yang digunakan dalam penelitian dan dilakukan luka iris pada punggung yang telah dibersihkan dengan ukuran panjang dua sentimeter, lebar nol koma dua sentimeter dan dalam nol koma lima sentimeter.