



Media Terkondisi Sel Punca Mesenkim *Wharton's Jelly* Mempercepat Penyembuhan Ulkus Tikus Diabetik *strain* Wistar

Ferry Arrochman, Ance Imelda Betaubun, Rakhma Tri Ifanti, Ummi Rinandari, Mardiana, Achmad Satya Negara, Wibisono Nugraha, Nurrachmat Mulianto, Indah Julianto

Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret/
RSUD Dr Moewardi, Surakarta, Indonesia

ABSTRAK

Pendahuluan: Ulkus diabetik merupakan bentuk kegagalan proses penyembuhan luka normal. Media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* meningkatkan transkripsi m-RNA dari TGF- β 2, *hypoxia-inducible factor-1 α* , dan *plasminogen activator inhibitor-1 genes* pada fibroblas kulit yang berhubungan dengan penyembuhan luka. **Tujuan:** Meneliti efektivitas media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* terhadap kecepatan penyembuhan ulkus pada tikus diabetik *strain* Wistar. **Metode:** Penelitian eksperimental laboratorik *randomized pretest-posttest control group design*. Penelitian di laboratorium bagian Farmasi Universitas Setia Budi (USB) Surakarta menggunakan 18 ekor hewan coba tikus *strain* Wistar yang dibuat luka di area punggung atas, dibagi 2 kelompok. Kelompok 1 diberi *gel astaxanthin*, kelompok 2 diberi media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly*. Perlakuan selama 14 hari. Uji visual menggunakan metode fotografi, luas ulkus diukur menggunakan software *image J*, persentase penyembuhan ulkus dihitung menggunakan rumus *wound closure*. Pengamatan dilakukan di hari ke-0, 7, 10, dan 14. Analisis perbedaan rata-rata luas ulkus menggunakan uji *Mann-Whitney*. **Hasil:** Berdasarkan luas ulkus dengan perhitungan *Image J*, didapatkan perbedaan signifikan pada hari ke-7 ($p=0,041$), hari ke-10 ($p=0,000$), dan pada hari ke-14 ($p=0,000$) Pada perhitungan menggunakan rumus *wound closure* dan data *Image J*, didapatkan perbedaan signifikan, pada kelompok 2 sebagian besar ulkus sudah menutup sempurna di hari ke-7, sedangkan pada kelompok 1 (kontrol) ulkus paling cepat menutup di hari ke-14 dan sebagian besar ulkus belum sembuh di hari ke-14. **Simpulan:** Media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* efektif mempercepat penyembuhan ulkus pada tikus diabetik *strain* Wistar.

Kata kunci: *Astaxantin*, media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly*, ulkus.

ABSTRACT

Introduction: Diabetic ulcer is a sign of wound healing failure. *Wharton's Jelly* enhance m-RNA transcription of TGF- β 2, *hypoxia-inducible factor-1 α* , and *plasminogen activator inhibitor-1 genes* in skin fibroblast related to wound healing process. **Objective:** To prove the effectivity of *Wharton's Jelly* mesenchymal stem cell conditioned media on ulcer healing rate in diabetic Wistar rats. **Method:** A laboratory experimental study with *randomized pretest-posttest control group design*. This study was conducted at the Pharmacy Laboratory of Setia Budi University Surakarta on 18 Wistar strain rats divided into 2 groups. All rats were injured on upper back area. Group 1 was treated with *Astaxanthin gel*. Group 2 was treated with *Wharton's jelly* mesenchymal stem cell conditioned media, for 14 days. Visual test was performed using the photographic method and ulcer area was measured using *image J* software; the percentage of ulcer healing was calculated with *wound closure* formula. Observations were made on days 0th, 7th, 10th, and 14th. Analysis used *Mann-Whitney* test for data with normal distribution. **Results:** *Wound closure* on day 7th ($p=0.000$), on day 10th ($p=0.000$), on day 14th ($p=0.004$) was significantly better in group 2. Based on ulcer area data with *Image J* software, the difference on day 7th ($p=0.041$), on day 10th ($p=0.000$), on day 14th ($p=0.000$) were significant. The ulcer healing rate is a significantly different between groups. In *Wharton's jelly* group, most ulcers has closed completely in day 7th, while in *astaxanthin* group, most ulcer hasn't closed until day 14th. **Conclusion:** *Wharton's Jelly* mesenchymal stem cell conditioned media, compared to *astaxanthin*, accelerate the healing rate of diabetic ulcers in Wistar strain rats. **Ferry Arrochman, Ance Imelda Betaubun, Rakhma Tri Ifanti, Ummi Rinandari, Mardiana, Achmad Satya Negara, Wibisono Nugraha, Nurrachmat Mulianto, Indah Julianto. Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Media Accelerates Ulcer Wound Healing in Diabetic Wistar Strain Rats**

Keywords: *Astaxantin*, *Wharton's jelly* mesenchymal stem cell conditioned media, ulcer.

PENDAHULUAN

Ulkus adalah kerusakan disertai kehancuran epidermis atau jaringan terluar dermis.¹ Ulkus kronis tidak responsif terhadap terapi awal

atau menetap meskipun perawatan tepat dan tidak ada kemajuan penyembuhan dalam jangka waktu tertentu, dengan etiologi terkait penyakit sistemik atau gangguan lokal.²

Diabetes melitus adalah penyakit kronik defisiensi insulin dan mengakibatkan hiperglikemia.³ Hiperglikemia kronik menyebabkan beberapa komplikasi seperti

Alamat Korespondensi email: ferrykrik@gmail.com

HASIL PENELITIAN



neuropati, nefropati, retinopati, dan penyakit jantung. Ulkus diabetik adalah komplikasi diabetes yang paling sering⁴ dengan predileksi di kaki.⁵ Faktor risikonya adalah riwayat ulkus kaki, neuropati perifer, penyakit vaskular perifer, dan trauma kaki.⁵

Penyembuhan ulkus membutuhkan interaksi terkoordinasi antar sel, faktor pertumbuhan, dan protein matriks ekstraseluler.⁶ Pusat proses ini adalah sel punca mesenkim endogenous yang mengkoordinasi respons perbaikan dengan merekrut sel inang lain dan mensekresi faktor pertumbuhan serta matriks protein.⁶

Wharton's jelly adalah selaput lendir primitif, jaringan ikat yang terletak di antara epitel ketuban dan pembuluh umbilikus. Pertama diamati oleh Thomas Wharton pada 1656, zat agar-agar ini terdiri dari proteoglikan dan berbagai isoform kolagen.⁶ Sel punca mesenkim pada *Wharton's jelly* memiliki karakter tertentu yang meningkatkan dan mentransduksi diri menjadi beberapa sel *strain* seperti sel tulang, tendo, dan miosit.⁶ Di sisi lain sel punca mesenkim dapat mengatur kekebalan manusia dan respons inflamasi.⁶ Kemampuan ini sangat penting untuk penyembuhan luka, memperbaiki, dan mempersingkat proses inflamasi, sehingga tidak ada penyembuhan kronis.⁶

Astaxanthin merupakan senyawa dari kelompok *xantofil* yang memiliki aktivitas antioksidan melebihi pro-vitamin A dan vitamin E.⁷ *Astaxanthin* meningkatkan ekspresi biomarker proses penyembuhan luka *collagen type 1 alpha 1 (COL1A1)* dan *basic fibroblast growth factor (bFGF)*, serta menurunkan ekspresi *marker stres oksidatif inducible nitric oxide synthase (iNOS)*.⁷ Peningkatan ekspresi bFGF dan berkurangnya ekspresi iNOS berkontribusi pada percepatan proses penyembuhan luka.⁷

TUJUAN

Membuktikan efektivitas media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* terhadap kecepatan penyembuhan ulkus pada tikus diabetik *strain Wistar*.

METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Maret – April 2018 di laboratorium Universitas Setia Budi (USB). Desain penelitian eksperimental

laboratorik dengan rancangan *randomized pretest-posttest control group design*. Kriteria inklusi adalah tikus jantan *strain Wistar* berusia 13 minggu dengan gula darah lebih dari 200 µg (dianggap diabetes) dan berat badan 200-250 g. Kriteria eksklusi adalah tikus yang sakit selama masa adaptasi (7 hari) dan atau mati selama perlakuan. Subjek penelitian 18 ekor tikus diabetik *strain Wistar*, dibagi dua kelompok masing-masing terdiri dari 9 ekor. Kelompok 1 diberi gel *astaxanthin* dua hari sekali selama 14 hari. Kelompok 2 diberi media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly*

dalam *basic gel* 2 hari sekali selama 14 hari.

Hari ke-0, pada subjek kedua kelompok diukur gula darah sewaktu (GDS) dan ditimbang berat badannya. Kemudian subjek kedua kelompok diinjeksi *alloxan* 40 mg/kgBB. Hari ke-2, pada subjek diukur GDS, ditimbang berat badan, kemudian diberi injeksi anestesi ketamin intramuskular 10 mg/kgBB. Pada subjek dibuat luka *full thickness* di area punggung menggunakan biopsi plong berukuran 10 mm setelah tindakan aseptik. Luka dibiarkan terbuka selama 14 hari; 14 hari

Tabel 1. Hasil pengamatan visual pada kedua kelompok pada hari ke-0 hingga ke-14

	Grup 1 (Gel Astaxanthin)	Grup 2 (Media terkondisi sel punca mesenkim <i>Wharton's jelly</i>)
Hari ke-0		
Hari ke-2		
Hari ke-7		
Hari ke-10		
Hari ke-14		



HASIL PENELITIAN

pasca-perluasan, dilakukan pengukuran GDS dan luas ulkus. Subjek kelompok 1 diberi gel *astaxanthin* topikal pada ulkus, sedangkan subjek kelompok 2 diberi media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* dalam *basic gel* pada ulkus; masing-masing diaplikasikan 2 hari sekali. Pengukuran dan evaluasi ulkus dilakukan pada hari ke-0, 7, 10, 14 terhitung setelah 14 hari perlakuan awal. Ulkus diukur menggunakan mika transparan diletakkan di kertas blok milimeter. Pengamatan dan

pengukuran kecepatan penyembuhan ulkus secara klinis dan visual menggunakan pengukuran dengan blok milimeter dan metode fotografi. Hasil didokumentasikan kemudian dievaluasi dengan rumus *wound closure* dan *software Image J*. Setelah penelitian selesai, seluruh subjek diterminasi dengan injeksi bromodeoksiuridin intraperitoneal.

Analisis data menggunakan uji parametrik dengan uji statistik *Mann-Whitney*

membandingkan kecepatan penyembuhan ulkus antara kelompok 1 dan kelompok 2.

HASIL

Di kelompok *Wharton's jelly*, ulkus sembuh paling cepat di hari ke-2, sedangkan di kelompok *astaxanthin* (kontrol) ulkus sembuh paling cepat di hari ke-14. Di kelompok *Wharton's jelly* ulkus sembuh paling lambat pada hari ke-10, sedangkan di kelompok *astaxanthin* (kontrol) didapatkan luka yang belum sembuh meskipun sudah diterapi selama 14 hari.

Tabel 2. Hasil penghitungan penyembuhan ulkus dengan rumus *wound closure*.

	Hari ke-7	Hari ke-10	Hari ke-14
WJ 1	77,30%	100%	100%
WJ 2	100%	100%	100%
WJ 3	84%	100%	100%
WJ 4	73,60%	100%	100%
WJ 5	100%	100%	100%
WJ 6	100%	100%	100%
WJ 7	100%	100%	100%
WJ 8	100%	100%	100%
WJ 9	100%	100%	100%
Rata-rata	92,76%	100%	100%
K 1	75,60%	60,90%	100%
K 2	66,60%	55,56%	55,56%
K 3	57,80%	5,20%	26,30%
K 4	52,30%	42,80%	42,80%
K 5	5,26%	5,26%	47,30%
K 6	53,80%	28,20%	11,50%
K 7	28,50%	42,80%	75,70%
K 8	0,00%	11,10%	0,00%
K 9	6,25%	55%	100%
Rata-rata	12,48%	13,52%	35,66%
p	0,000	0,000	0,0004

Tabel 3. Hasil penghitungan luas ulkus dengan *software Image J*

Hewan Coba	Hari ke-7	Hari ke-10	Hari ke-14
K 1	74	22	0
K 2	130	27	29
K 3	99	42	51
K 4	74	22	50
K 5	101	28	38
K 6	107	134	114
K 7	105	25	57
K 8	98	52	52
K 9	86	55	0
Rata-rata	97,11	45,2	43,4
WJ 1	45	0	0
WJ 2	0	0	0
WJ 3	144	0	0
WJ 4	193	0	0
WJ 5	0	0	0
WJ 6	0	0	0
WJ 7	0	0	0
WJ 8	0	0	0
WJ 9	0	0	0
Rata-rata	42,44	0	0
P	0,050	0,000	0,004

Perhitungan percepatan penyembuhan ulkus menggunakan rumus *wound closure*, berdasarkan luas awal ulkus hingga setelah diterapi selama 14 hari. Observasi dilakukan pada hari ke-7,10, dan 14. Di kelompok *Wharton's jelly*, pada hari ke-7 didapatkan sebagian besar ulkus telah menutup 100 persen, dan pada hari ke-10 seluruh ulkus sudah menutup sempurna. Di kelompok kontrol dengan antioksidan, penyembuhan tercepat terjadi pada hari ke-14, kebanyakan ulkus belum sembuh di hari ke-14; ditemukan fenomena meluasnya ulkus pada tiap observasi.

Uji *Mann Whitney* pada hari ke-7, 10, dan 14 diperoleh perbedaan kecepatan penyembuhan ulkus diabetik yang bermakna pada subjek kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol pada hari ke-7 hingga hari ke-14 ($p_{h-7} = 0,000$, $p_{h-10} = 0,000$, dan $p_{h-14} = 0,004$).

Pada kedua kelompok, dilakukan perhitungan perubahan luas ulkus menggunakan perangkat lunak *Image J*. Perhitungan dilakukan berdasarkan luas awal ulkus hingga setelah diterapi selama 14 hari. Observasi dilakukan pada hari ke-7, 10, dan 14. Di kelompok *Wharton's jelly*, pada hari ke-7 didapatkan sebagian besar luas ulkus 0, menandakan ulkus sudah menutup sempurna, dan pada hari ke-10 seluruh ulkus sudah menutup sempurna. Di kelompok kontrol dengan antioksidan, penyembuhan tercepat terjadi pada hari ke-14, kebanyakan ulkus belum sembuh di hari ke-14; ditemukan fenomena meluasnya ulkus pada tiap observasi.

Uji *Mann Whitney* pada hari ke-7, 10, dan 14 mendapatkan peningkatan kecepatan

HASIL PENELITIAN



penyembuhan ulkus yang signifikan ($p_{h-7} = 0.050$, $p_{h-10} = 0.000$, dan $p_{h-14} = 0.004$). Pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Perlakuan *Wharton's jelly* pada hari ke-7 sudah menunjukkan hasil sempurna (100%) dibanding kelompok kontrol dengan *Astaxanthin* (13,52%).

PEMBAHASAN

Ulkus diabetik yang diberi media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* menunjukkan penutupan luka setelah 2 hari terapi. Durasi ini lebih cepat signifikan dibandingkan perlakuan *gelastaxanthin* yang tertutup lukanya pada hari ke-14 pasca-terapi. Hal ini dapat disebabkan karena sifat anti-inflamasi, kandungan kaya faktor pertumbuhan pada media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly*. Pada hari ke-14, luka masih dalam keadaan transisi fase proliferasi ke fase *remodelling*. Pada ulkus diabetik yang termasuk dalam ulkus *non-healing*, luka menetap pada fase inflamasi yang kaya akan enzim proteolitik, sehingga tidak mendukung transisi ke fase penyembuhan selanjutnya. Hal ini dibuktikan oleh luka pada tikus diabetik strain Wistar yang masih terbuka pada hari ke-14 tanpa perlakuan. Gangguan angiogenesis dan vasculopati sering terlihat pada ulkus diabetik. Keadaan ini menyebabkan vaskularisasi ke organ khususnya kulit menurun, sehingga nutrisi dan oksigenasi ke ulkus diabetik berkurang. Tingginya kadar enzim proteolitik pada ECM ulkus diabetik menyebabkan degradasi berlebihan matriks dan hormon pertumbuhan yang berada di dalamnya.^{8,9}

Rendahnya hormon pertumbuhan menyebabkan terganggunya proliferasi, migrasi dan diferensiasi keratinosit, fibroblas, serta sel endotel.¹⁰ Efek anti-inflamasi pada media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* dapat disebabkan oleh kandungan IL-1RA yang tinggi.¹⁰ Amable, *et al*, menunjukkan bahwa tingkat IL-1RA pada media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* lebih tinggi dibandingkan sel punca lain. IL-1RA merupakan antagonis sitokin pro-inflamasi IL-1 yang disekresikan secara berlebih oleh makrofag dan neutrofil pada lingkungan ulkus diabetik, sehingga IL-1RA pada media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* dapat mengurangi inflamasi dan mendukung proses penyembuhan luka.¹⁰

Amable, *et al*, (2014) menunjukkan bahwa

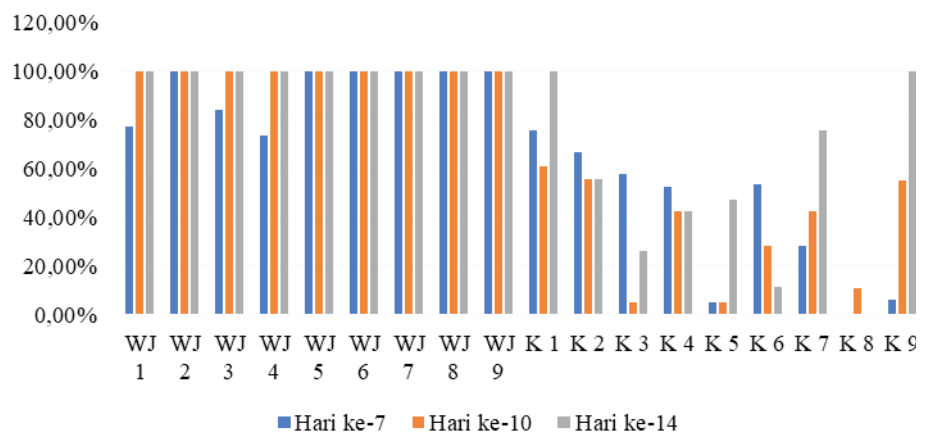
media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* memiliki tingkat PDGF dan TGF- β yang tinggi.¹⁰ Luttrell melaporkan bahwa PDGF dan TGF- β memiliki aktivitas angiogenesis pada proses penyembuhan luka.⁹ PDGF pada media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* dapat mengaktifkan, menstimulasi proliferasi, dan memicu migrasi fibroblas serta sel endotel, sehingga meningkatkan angiogenesis. TGF- β menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dengan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan ekspresi MHC-II, kemotaktik terhadap fibroblas, inhibitor proliferasi makrofag dan limfosit.^{8,9}

Matriks ekstraseluler pada ulkus diabetik mengalami disporporasi antara produksi dan

degradasi matriks menyebabkan lingkungan ECM tidak mendukung penyembuhan luka optimal.¹¹ Blakytyn dan Jude melaporkan bahwa tingginya jumlah MMP yang tidak diimbangi dengan peningkatan TIMP1 diamati pada fibroblas yang terpapar sitokin inflamasi secara berlebihan.¹² TGF- β dapat menstimulasi produksi TIMP1 dan menghambat produksi MMP, sehingga dapat mengembalikan keseimbangan antara produksi dan degradasi matriks. Keadaan ini dapat mendukung proses penyembuhan luka.^{9,11}

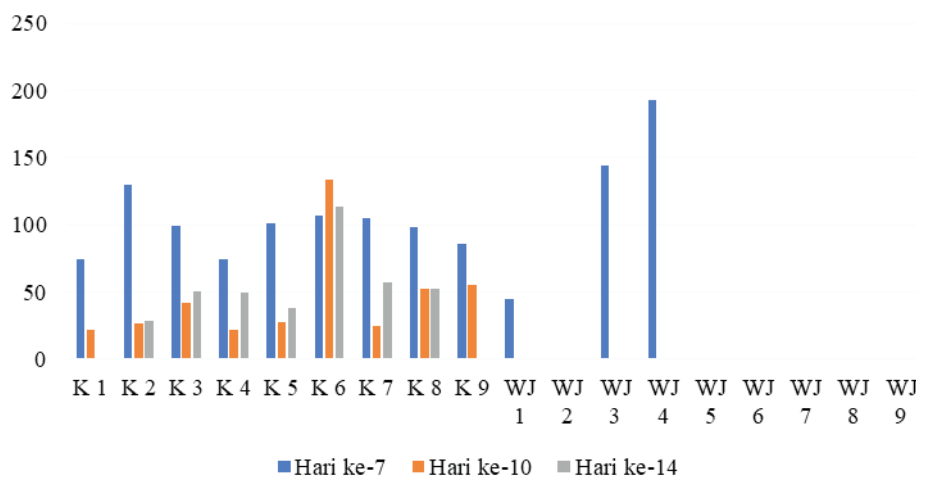
Penggunaan *gelastaxanthin* telah diaplikasikan pada ulkus diabetik. Meephansan, *et al*, (2017) melaporkan penggunaan *astaxanthin* dapat mempercepat penyembuhan ulkus diabetik. Ulkus yang diberi gel *astaxanthin* terlihat

Perhitungan Percepatan Penyembuhan Ulkus dengan Rumus Wound Closure



Grafik 1. Perhitungan percepatan penyembuhan ulkus dengan rumus *wound closure*.

Luas Ulkus dengan Software Image J



Grafik 2. Hasil perhitungan luas ulkus dengan *software Image J*



menunjukkan penutupan pada hari ke-9 dibandingkan kontrol yang terlihat pada hari ke-11; pada penelitian ini, luka pada kelompok gel *astaxanthin* menutup pada hari ke-14. Penutupan luka lebih cepat pada kelompok *astaxanthin* terjadi karena supresi inflamasi, stimulasi produksi bFGF, dan mengurangi konsentrasi ROS.⁷ Dibandingkan dengan pemberian gel *astaxanthin*, pemberian media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly*

mempercepat penutupan luka yang teramat pada hari ke-2.

Antibiotik, *dressing*, dan *platelet rich plasma* (PRP) sering digunakan pada ulkus diabetik. Penelitian Stokes, *et al*, (2016) menunjukkan pada kombinasi *dressing biofilm* dan antibiotik topikal, ulkus diabetik paling cepat menutup pada hari ke-28.¹³ Sedangkan dengan modalitas terapi PRP ulkus paling cepat

menutup pada hari ke-14.¹⁴ Dapat disimpulkan media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* lebih efektif dibandingkan *astaxanthin* ataupun modalitas terapi lain.

SIMPULAN

Media terkondisi sel punca mesenkim *Wharton's jelly* mempercepat penyembuhan ulkus pada tikus diabetik *strain Wistar*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Garg A, Levin N, Benhard JD. Structure of skin lesion and fundamentals of clinical diagnosis. In: Goldsmith LA, Katz SJ, eds. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2012. p. 84–111.
2. Suthar M, Gupta S, Bukhari S, Ponemone V. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: A case series. *J Biomed Sci*. 2017;24:16.
3. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3): 877–94.
4. Priyadarshini J, Abdi S, Metwaly A, Jose JS, Mohamed H, Mohamed H, et al. Prevention of diabetic foot ulcers at primary care level. 2018;3(1):4–9.
5. Mariam TG, Alemayehu A, Tesfaye E, Mequannt W, Temesgen K, Yetwale F, et al. Prevalence of diabetic foot ulcer and associated factors among adult diabetic patients who attend the diabetic follow-up clinic at the university of gondar referral hospital, north west ethiopia, institutional-based cross-sectional study. *J Diabetes Res*. 2017;2017:2879249.
6. Julianto I, Rindiastuti Y. Pengobatan topikal dengan "Sekretome" sel punca mesenkim pada penyembuhan luka, laporan kasus. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med*. 2016;48(3):217–20.
7. Meephansan J, Runjang A, Yingmema W, Deenonpoe R, Ponnikorn S. Effect of astaxanthin on cutaneous wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:259–65.
8. Guo S, DiPietro L. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219–29.
9. Luttrell T. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. In: Text and Atlas of Wound Diagnosis and Treatment. New York: McGraw Hill; 2015. p. 15–62.
10. Amable PR, Vinicius M, Teixeira T, Bizon R, Carias V. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(2):53.
11. Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Sci Rep*. 2016;6(18884):1–10.
12. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*. 2006;23(5):594–608.
13. Stokes R, Metcalf D, Bowler P. Management of diabetic foot ulcers: Evaluation of case studies. *Br J Nurs*. 2016;25(15 Suppl):27–33.
14. Ahmed M, Reffat A, Hassan A, Eskander F. Platelet-rich plasma for the treatment of clean diabetic foot ulcers. *Ann Vasc Surg*. 2017;38:206–11.