

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Penyembuhan luka merupakan proses yang sangat kompleks melibatkan interaksi antara migrasi dan proliferasi sel serta diatur oleh banyak sitokin. Fase penyembuhan luka meliputi hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling*. Selama proses ini terjadi pembekuan darah, respon inflamasi akut dan kronis, neovaskularisasi, proliferasi hingga apoptosis sel. Hal ini dimediasi oleh berbagai jenis sel, sitokin, matriks dan *growth factor (GF)*. Beberapa GF yang berperan terhadap proses penyembuhan luka diantaranya adalah *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Fibroblast Growth Factor (FGF)*, *Insulin-like Growth Factor (IGF)*, *Keratinocytes Growth Factor (KGF)*, *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*, *Transforming Growth Factor (TGF)*, dan *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*. VEGF diproduksi oleh banyak jenis sel, seperti sel endotel, fibroblas, platelet, netrofil, dan makrofag yang berhubungan dengan proses penyembuhan luka. Peningkatan kadar VEGF selama proses penyembuhan luka akan menstimulasi pembentukan neoangiogenesis. Neoangiogenesis memperbaiki sel dengan membawa nutrisi dan oksigen ke lokasi luka sehingga terjadi perbaikan dan regenerasi jaringan yang ditandai dengan adanya pembentukan jaringan granulasi seperti jaringan fibrovaskular yang terdiri dari fibroblas, kolagen, dan pembuluh darah (Nova P, 2019; Asadi *et al.*, 2014; Canedo D L & Canedo A M., 2019).

Fibroblas dermis merupakan sel terpenting dalam proses penyembuhan luka. Fungsi utama fibroblas secara fisiologis dalam proses penyembuhan luka yaitu mengeluarkan *growth factor*, memproduksi matriks ekstraseluler (MES), biosintesis kolagen, kontraksi luka, reepitelisasi, dan *remodeling* jaringan. Fibroblas merespon penyembuhan luka dengan berproliferasi secara kemosistis ke lokasi luka dengan membangun kembali matriks ekstraseluler sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan. Fibroblas juga merupakan sumber seluler utama sitokin dan kemokin inflamasi yang memungkinkan inflamasi jaringan yang kronis. Fibroblas mensekresi sejumlah sitokin, salah satunya interleukin-6 (IL-6) yang

memediasi proses inflamasi. IL-6 memiliki peran dalam meningkatkan produksi matriks ekstraseluler dan proliferasi sel (Sumbayak, 2015; Kurniawati, 2015; Tracy *et al.*, 2016).

Bila terjadi luka maka fibroblas di sekitarnya berkembang biak, bermigrasi ke dalam luka, menghasilkan matriks kolagen, membantu untuk mengisolasi dan memperbaiki jaringan yang rusak. Kemampuan fibroblas berkembang dalam penyembuhan luka sehingga fibroblas merupakan sel yang paling mudah tumbuh dalam kultur. Secara *in vitro*, fibroblas melekat pada cawan petri plastik khusus kultur dan memiliki bentuk memanjang, bentuk spindel, serta memproduksi kolagen dan fibronectin (Kurniawati, 2015; Nova P, 2019)

Migrasi sel merupakan proses yang terkoordinasi dan penting untuk banyak proses fisiologis seperti perkembangan, perbaikan, dan regenerasi jaringan. Penilaian migrasi dari fibroblas salah satunya dengan *scratch assay* secara *in vitro*. Tes ini merupakan metode yang secara ekonomis dapat menyerupai migrasi fibroblas yang terjadi secara *in vivo*. Metode ini didasarkan atas observasi melalui jarak buatan setelah digores (*scratch*) pada sekumpulan sel yang dikultur, sel-sel pada tepi goresan akan bergerak menutup jarak tersebut hingga terbentuk seluruh kumpulan sel seperti sebelumnya. *Scratch assay test* mudah untuk dilakukan dan tidak memerlukan perlengkapan yang rumit (Cormier *et al.*, 2015; Kurniawati, 2015; Grada A, 2017).

Tahap-tahap inflamasi diamati melalui penelitian kultur *in vitro* sehingga dibutuhkan model inflamasi pada sel. Salah satu zat yang dapat digunakan untuk induksi inflamasi pada sel adalah Lipopolisakarida (LPS). LPS merupakan komponen utama dinding sel bakteri Gram-negatif yang dapat menyebabkan respon inflamasi akut dan memicu pelepasan sejumlah besar sitokin inflamasi dalam berbagai jenis sel. LPS dikenal sebagai aktivator makrofag, yang secara konvensional digunakan untuk mempelajari inflamasi, karena memiliki banyak efek inflamasi yang dihasilkan melalui pensinyalan *Toll-Like Receptor 4* (TLR4). LPS mengaktifkan reseptor TLR4 di fibroblas dermal melalui NF- κ B sehingga memproduksi sitokin proinflamasi yang akhirnya akan menyebabkan inflamasi. LPS pada bakteri telah banyak digunakan dalam mempelajari model inflamasi karena memiliki banyak efek inflamasi dari sitokin yang salah satunya IL-6 (Ngkelo *et al*, 2012; Huang Z and Kraus V, 2016).

Platelet atau trombosit merupakan salah satu komponen sel darah yang berukuran paling kecil dengan jumlah 150 sampai 400×10^9 /L pada individu sehat. Selain berperan dalam terbentuknya trombus dan hemostasis, trombosit juga diketahui memiliki peranan penting dalam berbagai proses patofisiologi lainnya termasuk inflamasi, antimikroba, pertumbuhan, perkembangan, dan angiogenesis yang dimediasi oleh pelepasan faktor pertumbuhan, sitokin, dan modulator matriks ekstraseluler. Platelet memegang peranan penting dalam proses penyembuhan luka. Dalam proses penyembuhan luka *growth factor* seperti PDGF dan *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF β 1) mendorong fibroblas untuk berproliferasi, migrasi, dan meningkatkan pembentukan matriks ekstraseluler, serta merangsang sel-sel untuk membentuk pembuluh darah baru (Budak *et al*, 2016; Heijnen and Korporaal, 2017).

Platelet-Rich Plasma (PRP) merupakan produk biologis sebagai bagian dari plasma autologus dengan konsentrasi platelet 2 – 6 kali lipat lebih tinggi dan volume plasma yang rendah serta diperkaya oleh berbagai *growth factor* (GF), kemokin, sitokin, dan protein plasma lainnya. Setelah platelet dalam PRP teraktivasi, granula- α mengalami degranulasi dan melepaskan GF dan sitokin. Selain mengandung tinggi platelet, PRP juga memiliki konsentrasi GF yang tinggi yang dapat mempercepat penyembuhan luka yaitu *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Hepatocyte Growth Factor*, *Insulin-like Growth Factor 1, 2* (IGF-1, IGF-2), dan interleukin 8 (Lee *et al.*, 2018). PRP didapatkan dari isolasi hasil sentrifugasi *whole blood* (Sutharet *al*, 2017; Etulain *et al.*, 2018; Gremmel *et al.*, 2016).

Penggunaan antikoagulan merupakan faktor yang sangat penting dalam menjaga fungsi, integritas, dan morfologi trombosit. Beberapa peneliti berpendapat bahwa penggunaan antikoagulan *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA) dapat merusak membran trombosit dan merekomendasikan penggunaan *Acid Citrate Dextrose* (ACD). Studi Munawirah tahun 2019 melaporkan bahwa pada penggunaan antikoagulan ACD dapat meningkatkan trombosit dan kadar VEGF lebih tinggi dibandingkan dengan antikoagulan EDTA (Munawirah dan Esa., 2020). Banyak protokol yang digunakan untuk aktivasi PRP, di antaranya dengan menambahkan kalsium klorida (CaCl₂). Cavallo tahun 2016 melakukan penelitian

dengan CaCl_2 , trombin dan CaCl_2 /trombin sebagai pilihan metode aktivasi yang mempengaruhi pelepasan molekul bioaktif PRP. Aktivasi dengan trombin dan atau CaCl_2 menghasilkan kadar VEGF lebih tinggi dibandingkan dengan CaCl_2 , sedangkan kombinasi CaCl_2 /trombin menginduksi pelepasan VEGF yang jauh lebih tinggi dari pada CaCl_2 (Cavallo *et al.*, 2016). Meskipun PRP telah banyak digunakan sebagai *growth factor* dalam pengobatan regeneratif, tetapi efektifitasnya masih kontroversial, disebabkan karena belum adanya *gold* standar dalam protokol pembuatan PRP (Chahla *et al.*, 2017).

1.2 PERUMUSAN MASALAH

Penggunaan PRP banyak digunakan untuk proses penyembuhan luka, namun efek pemberian PRP dalam menekan proses inflamasi belum banyak dilakukan. Maka itu perlu dilakukan penelitian untuk menilai efek PRP terhadap viabilitas, migrasi, kadar sitokin IL-6 dan VEGF pada sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida.

1.3 PERTANYAAN PENELITIAN

1. Apakah pemberian PRP dapat meningkatkan viabilitas sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida?
2. Apakah efek pemberian PRP terhadap migrasi sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida?
3. Apakah pemberian PRP dapat menurunkan kadar sitokin IL-6 pada sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida?
4. Apakah pemberian PRP dapat meningkatkan kadar VEGF sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida?

1.4 HIPOTESIS

Terdapat perbedaan viabilitas, migrasi, kadar sitokin IL-6 dan VEGF setelah pemberian PRP pada sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida.

1. PRP dapat meningkatkan viabilitas sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida.
2. PRP dapat meningkatkan kecepatan migrasi sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida.
3. PRP dapat menurunkan kadar sitokin IL-6 sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida.
4. PRP dapat meningkatkan kadar VEGF sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida.

1.5 TUJUAN PENELITIAN

1.5.1 Tujuan Umum

Manfaat pemberian PRP terhadap viabilitas, migrasi, kadar sitokin IL-6 serta VEGF sel fibroblas yang diinduksi Lipopolisakarida.

1.5.2 Tujuan Khusus

- a. Mengkaji efek pemberian PRP dalam meningkatkan viabilitas sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida
- b. Mengkaji efek pemberian PRP terhadap migrasi sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida
- c. Mengkaji efek pemberian PRP terhadap kadar sitokin IL-6 sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida
- d. Mengkaji efek pemberian PRP terhadap kadar VEGF sel fibroblas yang diinduksi lipopolisakarida