



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERAN KOMBINASI ASAM HIALURONAT DAN *ADVANCED
PLATELET RICH FIBRIN* PADA ANGIOGENESIS LUKA
KAKI DIABETES: KAJIAN PADA VEGF, PDGF, IL-6,
DAN INDEKS GRANULASI**

DISERTASI

**RONALD WINARDI KARTIKA
NIM 1606958235**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
JAKARTA
APRIL 2021**



UNIVERSITAS INDONESIA

PERAN KOMBINASI ASAM HIALURONAT DAN *ADVANCED PLATELET RICH FIBRIN* PADA ANGIOGENESIS LUKA KAKI DIABETES: KAJIAN PADA VEGF, PDGF, IL-6, DAN INDEKS GRANULASI

DISERTASI

Untuk memperoleh gelar Doktor dalam bidang Ilmu Kedokteran pada Universitas Indonesia di Jakarta di bawah pimpinan Rektor Universitas Indonesia Prof. Ari Kuncoro, S.E., MA, PhD untuk dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada Hari Kamis, 15 April 2021, Pukul 10.00 WIB.

RONALD WINARDI KARTIKA

NIM 1606958235

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
JAKARTA
APRIL 2021**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ronald Winardi Kartika

NPM : 1606958235

Tanda Tangan :



Tanggal : 15 April 2021

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :

Nama : Ronald Winardi Kartika
NPM : 1606958235
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Judul Disertasi : Peran Kombinasi Asam Hialuronat dan *Advanced Platelet Rich Fibrin* pada Angiogenesis Luka Kaki Diabetes: Kajian pada VEGF, PDGF, IL-6, dan Indeks Granulasi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

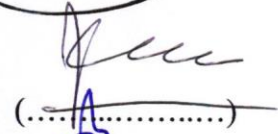
DEWAN PENGUJI

Promotor : Prof. Dr. dr. Idrus Alwi, Sp.PD-KKV

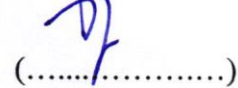


Ko-Promotor :

Prof. dr. Franciscus D. Suyatna, Sp.FK, PhD

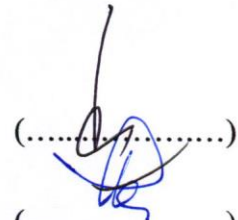


Dr. dr. Em Yunir, Sp.PD-KEMD



Tim Penguji:

Prof. Dr. dr. Suhendro, Sp.PD-KPTI (Ketua)



Prof. Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc (Anggota)



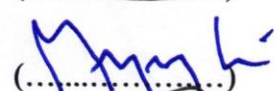
Prof. dr. Suzanna Immanuel, Sp.PK(K) (Anggota)




Dr. dr. Jusuf Rachmat, Sp.BTKV(K), MARS (Anggota)



Dr. dr. Mirta H. Reksodiputro, Sp.THT-KL(K) (Anggota)



Dr. dr. Todung D. Aposan Silalahi, Sp.PD-KKV (Anggota)



Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 15 April 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Salam sejahtera,

Puji dan syukur saya panjatkan ke Hadirat Tuhan YME atas segala rahmat serta kurnia yang dilimpahkan-Nya kepada kami sekeluarga, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Sehubungan dengan telah selesainya masa pendidikan sampai disertasi ini diajukan, perkenankanlah saya sampaikan rasa hormat yang tulus dan ucapan terima kasih kepada:

Prof. Ari Kuncoro, S.E., MA, PhD Rektor Universitas Indonesia, atas kesempatan yang diberikan untuk mengajukan disertasi dan menyelesaikan pendidikan program doktor di Universitas Indonesia, yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan ini dan memfasilitasi proses perolehan dana HIBAH DRPM. Demikian pula kepada **Prof. Dr. dr. Ari Fahrial Syam, Sp.PD, KGEH, MMB** Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia serta wakil Dekan I **Prof. Dr. dr. Dwiana Ocviyanti, Sp.OG(K), MPH** yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti dan menyelesaikan program studi doktor dan telah memberikan beasiswa sehingga meringankan beban biaya pendidikan saya.

Ucapan terima kasih dan rasa hormat saya sampaikan kepada **Dr. dr. Wani Devita Gunardi, Sp.MK(K)** yang saya hormati, menjabat Rektor Ukrida terima kasih banyak atas semangat dan kesempatan yang diberikan selama masa pendidikan sampai saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada **dr. Anton Ritchi Castiliani, M.Si., DFM** sebagai Dekan FKIK Ukrida dan **Prof. Dr. dr. Mardi Santoso, DTM&H, Sp.PD, KEMD, FINASIM, FACE** sebagai Dekan FKIK Ukrida sebelumnya, saya berterimakasih atas kesempatan yang diberikan untuk, mengikuti pendidikan S3.

Kepada **Prof. Dr. dr. Idrus Alwi, Sp.PD, KKV, FACC, FESC, FAPSIC** yang saya hormati, terima kasih banyak telah berkenan menjadi promotor dan memberikan banyak bimbingan, arahan dan saran. Bimbingan, saran dan kritik beliau sejak awal pendidikan dapat membangkitkan semangat serta solusi pada saat saya mengalami kesulitan. Beliau terus menerus memberikan semangat kepada saya yang sempat mengalami putus asa pada saat saya menjalani pendidikan ini. Berkat jasa beliau saya dapat bangkit kembali untuk belajar dengan giat.

Kepada **Prof. dr. Frans D Suyatna, Sp.FK, PhD** yang berkenan menjadi kopromotor saya ucapkan terima kasih banyak atas bimbingan, masukan serta arahan dalam membantu saya menyelesaikan pendidikan ini. Bimbingan beliau sangatlah berarti sehingga membuka wawasan dalam mengkaji dan menyelesaikan pendidikan serta menyempurnakan disertasi ini.

Terima kasih saya ucapkan kepada **Dr. dr. Em Yunir Sp.PD, KEMD** yang juga berkenan menjadi kopromotor, telah membimbing serta mengajari saya baik dalam hal penulisan disertasi ini. Beliau mengarahkan bagaimana mengolah hasil penelitian sehingga dapat memperoleh simpulan yang sangat berharga khususnya untuk penyembuhan luka kaki diabetes.

Ketua Dewan Penguji **Prof. Dr. dr. Suhendro, Sp.PD, KPTI** sebagai Ketua Program Studi Pascasarjana bidang Kedokteran juga ketua tim penguji dan penilai disertasi. Kepada beliau saya ucapkan terima kasih atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti program pascasarjana serta kesabarannya sebagai seorang bapak yang membimbing anaknya, memberikan dorongan, koreksi dan masukan untuk perbaikan penulisan disertasi ini. **dr. Harrina Erlianti Rahardjo, Sp.U(K), PhD, SPS** program S3 Kedokteran, saya ucapkan terima kasih atas masukan untuk perbaikan disertasi ini. **Prof. Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc**, yang saya hormati, terima kasih atas bimbingan yang tulus selama masa pendidikan serta penulisan disertasi. Terima kasih kesediaan beliau memberikan bimbingan tata cara penulisan jurnal terindeks SCOPUS. Dengan segala kerendahan hati saya mengakui bahwa sebagai seorang dosen pemula, pengetahuan dan keterampilan menulis saya masih memerlukan usaha keras.

Juga kepada **Prof. dr. Suzzana Immanuel, Sp.PK(K)** dengan tulus saya mengucapkan terima kasih atas bimbingan dan saran selama kuliah kekhususan, serta waktu yang banyak diluangkan untuk membantu saya di tengah waktunya yang sangat padat dalam menyelesaikan penulisan disertasi ini. Dukungan serta dorongan yang diberikan membuat saya termotivasi dan bersemangat untuk dapat lebih cepat menyelesaikan penelitian.

Dr. dr. Jusuf Rachmat, Sp.BTKV, MARS terima kasih banyak telah meluangkan waktu untuk menjadi salah satu penguji dalam penelitian ini. Beliau juga memberikan dorongan dan masukan dalam perbaikan penulisan disertasi ini.

Saya sangat berterima kasih kepada **Dr. dr. Mirta Hedyati Reksodiputro, Sp.THT-KL(K)**, kesediaan beliau memberikan bimbingan secara terus menerus dalam menyelesaikan disertasi ini agar tepat waktu.

Kepada **Dr. dr. Todung D. Aposan Silalahi, Sp.PD, KKV** terima kasih banyak sebagai pembimbing dan memberikan dorongan dan masukan dalam perbaikan penulisan disertasi ini.

Saya juga mengucapkan terima kasih kepada **dr. Ida Bagus Nyoman Banjar, MKM** Direktur RSUD Koja, Jakarta dan jajaran pendukung **Dr. dr. Suzanna Ndraha, Sp.PD, KGEH, FINASIM, dr. Adam Fathoni, Ns. Dwi, Ns. Lina Tarigan Br. Pace Tualaka, Br. Ikwan Santoso, Bp. Alibar Niulima** yang mendukung penelitian di RSUD Koja, Jakarta.

Saya juga mengucapkan terima kasih kepada **Let Jen dr. A. Budi Sulistya, Sp.THT-KL, M.A.R.S** Direktur RSPAD Gatot Soebroto, Jakarta beserta jajaran pendukung (**dr. Susie Setyowati, Sp.PD, KEMD dan dr. Asmi Abdullah**) yang telah memberikan ijin dalam pengambilan bahan dalam penelitian ini di poli Ilmu Penyakit Dalam RSPAD Gatot Soebroto, Jakarta.

Saya ucapkan juga banyak terima kasih kepada jajaran laboratorium FKUI Terpadu **Dr. Heri Wibowo M.Biomed., Dra. Neneng Gusniarti, Astriana S.Si., Saraswati S.Si. M.Biomed., Sri Supriati Amd., Wahyu Widayati S.Si.** yang dengan setia membantu saya selama penelitian dan pemeriksaan laboratorium.

Kepada Yth **Prof. Dr. dr. Sarwono, Sp.PD, KEMD** yang saya hormati, terima kasih atas bimbingan dan saran untuk menyempurnakan penulisan disertasi ini. Beliau sangat menginspirasi saya dalam hal penulisan yang baik dan sempurna.

Kepada Yth **Prof. dr. Saleha Sungkar, Sp.ParK, DAP&E, MS**, yang saya hormati, terima kasih atas bimbingan dan saran untuk menyempurnakan penulisan disertasi ini.

Kepada Yth **Dr. dr. Barlian Sutedja, Sp.B**, sebagai Direktur RS Gading Pluit, Jakarta yang saya hormati, terima kasih atas dukungan untuk menyelesaikan pendidikan S3 saya sampai selesai.

Kepada Yth **Ibu Mariyana Mawarni**, yang saya hormati, terima kasih atas dukungan finansial penuh untuk menyelesaikan pendidikan S3 saya sampai selesai.

Rasa cinta, hormat dan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua saya, **dr. Soerjantara Kartika (Alm.)** dan **Maya Dewi Kartika, S.H.**, yang telah mendidik dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang. Kiranya kebaikan dan teladan dalam kehidupannya menjadi contoh bagi saya. Hormat serta terima kasih saya ucapkan kepada bapak mertua, **Bambang Kirmato Ardi** dan Ibu mertua, **Henny** atas dukungan, motivasi dan doanya selama ini.

Kepada para kakakku, **drg. Andre Widodo** dan istri (**drg. Andriani Ong**), **dr. Kathleen Mira Kartika** dan suami (**dr. Adrian Lim**), **dr. Ingrid Melia Kartika, Sp.RM** dan suami (**dr. Karel Angrek Sp.A**), saya ucapkan banyak terima kasih atas dukungan dan doanya.

Pada akhir tulisan ini dengan rasa cinta dan kasih sayang yang tak terhingga kepada istri saya, **dr. Laurencia Ardi** yang tetap sabar mendampingi saat pendidikan dan penyelesaian disertasi. Dukungan, nasihat serta kesetiiaannya yang sangat berharga dalam berbagi suka dan duka selama menjalani pendidikan ini sangat berarti. Juga kepada putra-putra tersayang **Timothy Morgan Kartika** dan **Aldrich Moreno Kartika** terima kasih atas pengertian karena banyak waktu yang tersita buat keluarga ketika Bapak menjalani pendidikan dan menyelesaikan disertasi ini. Terima kasih untuk doa ananda berdua. Jadilah anak yang taat dalam beribadah kepada Tuhan YME, berguna bagi nusa dan bangsa serta membanggakan keluarga. Amien. Akhir kata, mohon maaf bila ada kekhilafan dan kesalahan yang kurang berkenan di hati selama menjalani pendidikan dan penyelesaian disertasi ini. Semoga hasil penelitian ini memberi manfaat bagi pelayanan masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, April 2021

Penulis

Ronald Winardi Kartika

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Ronald Winardi Kartika
NPM : 1606958235
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas : Kedokteran
Judul karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**Peran Kombinasi Asam Hialuronat dan *Advanced Platelet Rich Fibrin*
pada Angiogenesis Luka Kaki Diabetes:
Kajian pada VEGF, PDGF, IL-6, dan Indeks Granulasi**

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di Jakarta

Pada tanggal: 15 April 2021

Yang menyatakan



(Ronald Winardi Kartika)

ABSTRAK

Nama : Ronald Winardi Kartika
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Judul Disertasi : Peran Kombinasi Asam Hialuronat dan *Advanced Platelet Rich Fibrin* pada Angiogenesis Luka Kaki Diabetes: Kajian pada IL-6, VEGF, PDGF dan Indeks Granulasi

Luka kaki diabetes (LKD) adalah salah satu komplikasi diabetes melitus (DM). Terapi LKD adalah perawatan luka dan *growth factor* (GF) seperti *advanced-platelet rich fibrin* (A-PRF). Penyandang DM memiliki GF rendah, untuk mengoptimalkan GF yang dilepaskan oleh PRF, ditambahkan asam hialuronat (AH). Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh A-PRF + AH terhadap penyembuhan LKD dengan mengkaji VEGF, PDGF, IL-6, dan indeks granulasi. Desain penelitian *randomized control trial*, dilaksanakan pada bulan Juli 2019 –Maret 2020 di RSPAD Gatot Soebroto dan RSUD Koja, Jakarta. Subjek penyandang LKD yang mengalami luka kronik, kriteria Wagner II, luas luka < 40 cm². Subjek diambil berdasarkan *rule of thumb* dan dibagi tiga secara acak yaitu kelompok terapi topikal A-PRF + AH (n = 10), A-PRF (n = 10) dan kontrol NaCl 0,9% (n = 10). Pada kelompok A-PRF + AH dan A-PRF dilakukan pemeriksaan VEGF, PDGF, IL-6 dari usap LKD dan fibrin gel sedangkan kontrol hanya diperiksa usap LKD. Biomarker dan Indeks Granulasi (IG) diperiksa hari ke-0, ke-3, ke-7. Khusus IG pengukuran ditambah hari ke-14. Data dianalisis menggunakan SPSS versi 20 dengan uji Anova atau Kruskal Wallis.

Pada kelompok A-PRF + AH, kadar VEGF usap LKD hari ke-0 adalah 232,8 meningkat menjadi 544,5 pg/mg protein pada hari ke-7. Pada kelompok A-PRF terjadi peningkatan dari 185,7 menjadi 272,8 pg/mg protein, namun kelompok kontrol terjadi penurunan dari 183,7 menjadi 167,4 pg/mg protein. Kadar PDGF usap LKD kelompok A-PRF + AH hari ke-0 adalah 1,9 pg/mg protein, meningkat menjadi 8,1 pg/mg protein hari ke-7, kelompok A-PRF dari 1,7 meningkat menjadi 5,4 pg/mg protein dan kontrol dari 1,9 meningkat menjadi 6,4 pg/mg protein. Kadar IL-6 usap LKD kelompok A-PRF + AH hari ke-0 adalah 106,4 menjadi 88,7 pg/mg protein hari ke-7, pada A-PRF dari 91,9 menjadi 48,8 pg/mg protein dan kontrol dari 125,3 menjadi 167,9 pg/mg protein. IG kelompok A-PRF + AH hari ke-0 adalah 42,1% menjadi 78,9% dan 97,7% hari ke-7 dan ke-14, pada kelompok A-PRF dari 34,8% menjadi 64,6% dan 91,6%. Kelompok kontrol dari 35,9% menjadi 66,0% dan 78,7% hari ke-7 dan ke-14. Pada kelompok A-PRF + AH dibandingkan A-PRF dan NaCl didapatkan peningkatan bermakna kadar VEGF pada hari ke-3 (p = 0,011) dan hari ke-7 (p < 0,001). Kadar IL-6 menurun bermakna (p = 0,041) pada hari ke-7 saja. Namun persentase IG meningkat bermakna pada hari ke-3 (p = 0,048), ke-7 (p = 0,012) dan hari ke-14 (p < 0,001).

Disimpulkan penambahan AH pada A-PRF meningkatkan VEGF (marker angiogenesis) dan IG (tanda klinis penyembuhan luka), serta menurunkan IL-6 (marker inflamasi) secara bermakna sehingga mempercepat penyembuhan LKD.

Kata kunci: angiogenesis, A-PRF, asam hialuronat, luka kaki diabetes

ABSTRACT

Name : Ronald Winardi Kartika
Study program : Doctor of Medicine
Title of Dissertation : Role of the Combination of Hyaluronic Acid and Advanced Platelet Rich Fibrin on Angiogenesis of Wound DM through IL-6, VEGF, PDGF and Granulation Index.

Diabetic foot ulcer (DFU) is one of complications of diabetes mellitus (DM). Advance wound treatment in DFU such as growth factors (GF) including Advanced-Platelet Rich Fibrin (A-PRF) topical has been developed. People with DM have low GF, so to optimize GF hyaluronic acid (AH) is added. This study analyzed the combination of A-PRF + AH combination in DFU recovery by examining VEGF, PDGF, IL-6, and granulation index (IG).

The study used a randomized control design, done from July 2019–March 2020 at the Gatot Soebroto Army Hospital and Koja District Hospital, Jakarta. Subjects were DFU patients who had chronic wounds, area < 40 cm² and Wagner II criteria. Subjects were recruited according to the rule of thumb and were randomly divided into three groups namely topical A-PRF + AH (n = 10), A-PRF (n = 10) and control NaCl 0.9% groups (n = 10). The A-PRF + AH and A-PRF groups underwent VEGF, PDGF, and IL-6 examinations of the DFS swabs and fibrin gel while the controls could only underwent the DFU swabs. Biomarkers and Granulation Index (GI) were measured on day 0, 3rd, 7th. Special GI measurements were added on day 14. Data were analyzed using SPSS version 20 with the Anova and Kruskal Wallis test.

In the A-PRF + AH group the VEGF level from swab DFU day 0 was 232,8 pg/mg protein increase to 544,5 pg/mg protein on day 7. In the A-PRF group VEGF increase from 185,7 to 272,8 pg/mg protein and control decrease from 183,7 to 167,4 pg/mg protein. Increasing of PDGF levels in group A-PRF + AH day 0 was from 1,9 pg/mg protein to 8,1 pg/mg day 7, group A-PRF from 1,7 increased to 5,4 pg/mg protein and control from 1,9 to 6,4 pg/mg protein. Decreasing of IL-6 level of DFU swab in group A-PRF + AH day 0 was 106,4 pg/mg protein to 88,7 pg/mg protein day 7, in group A-PRF from 91,9 to 48,8 pg/mg protein and control from 125,3 to 167,9 pg/mg protein. The granulation index of DFU group A-PRF + AH on day 0 was 42,1% increased to 78,9% and 97,7% days 7 and 14. In the A-PRF group increased from 34,8% to 64,6% and 91,6%. and controls from 35,9% to 66,0% and 78,7% on days 7 and 14. On the 7th day the VEGF level of the A-PRF + AH group increased significantly ($p < 0.001$), while IL-6 decreased and the granulation index increased significantly with p level of $p = 0.041$ and $p = 0.012$ respectively, compare with other group.

It was concluded that on day 7 the AH to A-PRF increases VEGF (a marker of angiogenesis) and GI (a clinical sign of wound recovery), as well as a decrease in IL-6 (a marker of inflammation) which fully increase in DFU.

Keywords: angiogenesis, A-PRF, diabetic foot ulcer, , hyaluronic acid

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMS	xi
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR SINGKATAN	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Pertanyaan Penelitian	5
1.4 Hipotesis.....	6
1.5 Tujuan Penelitian	6
1.5.1 Tujuan Umum	6
1.5.2 Tujuan Khusus	6
1.6 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Diabetes Melitus.....	9
2.1.1 Komplikasi Diabetes Melitus.....	10
2.1.2 Pengaruh Hiperglikemia terhadap Sel Tubuh	10
2.1.3 Komplikasi LKD	11
2.1.4 Patogenesis Komplikasi LKD	13
2.1.5 Pengelolaan Umum LKD	14
2.2 Proses Penyembuhan Luka	15
2.2.1 Peran <i>Growth factor</i> pada Penyembuhan Luka	16
2.2.2 Peran VEGF pada Penyembuhan Luka.....	18
2.2.3 Peran PDGF pada Penyembuhan Luka	20
2.2.4 Peran Trombosit pada Penyembuhan Luka	22
2.3 Angiogenesis pada Penyembuhan Luka.....	26
2.3.1 <i>Growth Factor</i> Angiogenik di Kapiler.....	26
2.3.2 Peran VEGF dalam Proses Angiogenesis	27
2.3.2.1 Pengukuran Kadar VEGF pada Proses Angiogenesis.....	28
2.4 Gangguan Penyembuhan Luka pada Penyandang DM.....	29
2.4.1 Gangguan Mikrovaskular pada DM.....	31
2.4.2 Gangguan Angiogenesis pada LKD.....	31
2.4.3 Perubahan Struktural Mikrovaskular pada LKD	32
2.4.4 Perubahan Viskositas Darah pada Mikroangiopati DM	32
2.5 Inflamasi Kronik pada Luka LKD	33
2.5.1 Peran Sitokin dan Interleukin pada Penyembuhan LKD	33

2.6 Metode Pengukuran Luas Luka.....	34
2.6.1 Penghitungan Luas Luka Secara Digital	35
2.7 Terapi LKD	37
2.7.1 Terapi Topikal LKD	39
2.8 Peran Platelet-Rich Plasma (PRP) dan Platelet-Rich Fibrin (PRF) pada Penyembuhan LKD	40
2.8.1 <i>Platelet Rich Plasma</i>	40
2.8.2 <i>Platelet Rich Fibrin (PRF)</i>	42
2.8.2.4 Kandungan <i>Growth Factor</i> dan Sitokin	46
2.9 Peran Asam Hialuronat pada Penyembuhan Luka	46
2.10 Kombinasi AH dengan A-PRF untuk Mempercepat Granulasi LKD	48
2.11 Kerangka Teori	50
2.12 Kerangka Konsep	53
BAB 3 METODE PENELITIAN	55
3.1 Desain Penelitian	55
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	55
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	55
3.3.1 Populasi Target.....	55
3.3.2 Populasi Terjangkau	55
3.4 Kriteria Pemilihan Subjek Penelitian	55
3.4.1 Kriteria Penerimaan.....	55
3.4.2 Kriteria Penolakan	56
3.5 Besar Sampel	56
3.6 Teknik Pengukuran Sampel.....	56
3.7 Cara Kerja.....	57
3.8 Batasan Operasional	58
3.9 Variabel Penelitian	59
3.10 Analisis Data	60
3.11 Etika Penelitian.....	60
3.12 Prosedur Penelitian	60
3.12.1 Cara Penetapan Kelompok Penelitian	60
3.12.2 Cara Kerja.....	61
3.13 Alur Penelitian.....	61
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	63
4.1 Karakteristik Subjek Penelitian	63
4.1.1 Karakteristik Klinis LKD pada Kelompok A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl	64
4.1.2 Faktor Komorbid DM pada LKD	65
4.2 Perubahan VEGF pada Usap LKD Berdasarkan Intervensi	65
4.3 Perubahan PDGF Usap LKD yang Mendapat Intervensi	67
4.4 Evaluasi Perubahan IL-6 Usap LKD yang Mendapat Intervensi	68
4.5 Evaluasi Pertumbuhan Jaringan Granulasi Penyembuhan LKD	70
4.5.1 Perubahan Luas Area LKD Sebelum dan Sesudah Intervensi	70
4.5.2 Luas Jaringan Granulasi pada LKD Sebelum dan Sesudah Intervensi	71
4.5.3 Perubahan Indeks Granulasi pada LKD Sebelum dan Sesudah Intervensi.....	71

4.6 Perbedaan Skor Nyeri pada Subjek LKD.....	75
4.7 Penghitungan Jumlah Sampel dan Power Penelitian	77
BAB 5 PEMBAHASAN	79
5.1 Karakteristik Demografi Subjek Penelitian	79
5.1.1 Lama Diabetes Melitus	80
5.1.2 Faktor Komorbid.....	83
5.1.3 Karakteristik Luka Kaki Diabetes.....	88
5.2 Pemeriksaan VEGF dan Angiogenesis	90
5.3 Pemeriksaan PDGF dan Fibrogenesis.....	95
5.4 Pemeriksaan IL-6 dan Inflamasi	99
5.5 Mekanisme A-PRF + AH pada Penyembuhan LKD	103
5.5.1 Pengaruh A-PRF + AH pada Penyembuhan Luka melalui Peningkatan Angiogenesis.....	104
5.5.2 Pengaruh A-PRF + AH pada Penyembuhan Luka melalui Peningkatan Fibrogenesis	107
5.5.3 Pengaruh A-PRF + AH pada Penyembuhan Luka melalui Penurunan Inflamasi	111
5.6 Kelebihan dan Keterbatasan Penelitian.....	114
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN	117
6.1 Simpulan	117
6.2 Saran.....	117
RINGKASAN	119
SUMMARY.....	129
DAFTAR PUSTAKA	139
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	183

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Klasifikasi LKD Berdasarkan Kriteria Wagner	12
Tabel 2.2. Klasifikasi LKD Berdasarkan Kriteria PEDIS	13
Tabel 2.3. Peran Growth Factor pada Penyembuhan Luka	17
Tabel 3.1. Penghitungan Jumlah Sampel	56
Tabel 4.1. Karakteristik Subjek Berdasarkan Perlakuan	64
Tabel 4.2. Karakteristik Awal LKD Berdasarkan Kelompok Perlakuan	65
Tabel 4.3. Komorbid DM pada Penyandang LKD	65
Tabel 4.4. Perubahan Kadar VEGF Usap LKD Berdasarkan Intervensi.....	66
Tabel 4.5. Perubahan Kadar PDGF Usap LKD Berdasarkan Intervensi.....	68
Tabel 4.6. Perubahan Kadar IL-6 Usap LKD Berdasarkan Intervensi.....	69
Tabel 4.7. Perubahan Luas Area (LA) LKD Berdasarkan Intervensi	70
Tabel 4.8. Perubahan Luas Jaringan Granulasi (LG) Berdasarkan Intervensi	71
Tabel 4.9. Perubahan Indeks Granulasi (Δ IG) Berdasarkan Intervensi.....	72
Tabel 4.10. Persentase Indeks Granulasi berdasarkan Intervensi.....	72
Tabel 4.11. Perbedaan Skor NPS pada LKD Berdasarkan Perlakuan	76
Tabel 4.12. Penghitungan Jumlah Sampel Berdasarkan Penelitian	77

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Klasifikasi LKD Berdasarkan Kriteria Wagner	11
Gambar 2.2. Gambaran Klinis Ulkus DM Klasifikasi Wagner	12
Gambar 2.3. <i>Growth Factor</i> pada Penyembuhan Luka	18
Gambar 2.4. Urutan Kejadian Gangguan Angiogenesis pada DM	19
Gambar 2.5. Amplifikasi Sinyal PDGF pada Makrofag	21
Gambar 2.6. Proses Pematangan Trombosit	22
Gambar 2.7. Struktur Trombosit	23
Gambar 2.8. Skema Trombosit dalam Keadaan Istirahat dan Aktif	24
Gambar 2.9. Proses Pembekuan Darah	25
Gambar 2.10. Peran VEGF pada Penyembuhan Luka dengan Merangsang Sel Endotel dan Fase Kaskade Angiogenesis	28
Gambar 2.11. Gangguan Penyembuhan Luka pada DM.....	29
Gambar 2.12. Faktor yang Berpengaruh pada Penyembuhan LKD.....	31
Gambar 2.13. Metode Pengukuran Luas Luka dengan metode Grid.....	35
Gambar 2.14. Metode Pengukuran Indeks Granulasi	37
Gambar 2.15. <i>Growth Factor</i> dalam Platelet dari PRP.....	41
Gambar 2.16. Prinsip dan Metode Pembuatan PRP.....	42
Gambar 2.17. Cara Pembuatan PRF dengan PRF Box	44
Gambar 2.18. Mekanisme PRP pada Penyembuhan Luka.....	45
Gambar 2.19. Struktur Asam Hialuronat	47
Gambar 2.20. Kerangka Teori Faktor yang Memengaruhi Penyembuhan LKD..	50
Gambar 2.21. Kerangka Konsep Kombinasi A-PRF dan AH untuk Mempercepat Penyembuhan LKD dibandingkan A-PRF saja atau Kontrol NaCl.....	53
Gambar 3.1. Alur Penelitian	62
Gambar 4.1. Alur Consort.....	63
Gambar 4.2. Perbandingan Perubahan Kadar VEGF Berdasarkan Intervensi yang Berbeda	67
Gambar 4.3. Perubahan kadar IL-6 Berdasarkan Intervensi	70
Gambar 4.4. Perubahan % IG Berdasarkan Intervensi yang Berbeda.....	73
Gambar 4.5. Tahapan Pembuatan A-PRF + AH	73
Gambar 4.6. Kombinasi A-PRF+AH pada LKD Pra-tibia	74

Gambar 4.7. Pengobatan LKD dengan Krim Kombinasi A-PRF + AH	74
Gambar 4.8. Seorang Laki-laki Sehat Berusia 40 tahun Mengalami Luka di Dorsum Pedis. Pengobatan LKD dengan Topikal A-PRF pada Hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14.	74
Gambar 4.9. Pengobatan LKD dengan Kompres NaCl 0,9% (Kontrol)	75
Gambar 4.10. Ukuran Luas Luka, Indeks Granulasi Menggunakan Image-J	75
Gambar 4.11. Numeric Pain Scale (NPS) pada LKD setelah Intervensi.....	76
Gambar 5.1. <i>Proposed Mechanism</i> A-PRF+AH dalam Peningkatan Jaringan Granulasi	116

DAFTAR SINGKATAN

bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
hEGF	: <i>Human Epidermal Growth Factor</i>
AH	: Asam hialuronat
ABI	: <i>Ankle Brachial Index</i>
ADP	: Adenosin Difosfat
APTT	: <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
A-PRF	: <i>Advanced Platelet Rich Fibrin</i>
ATP	: Adenosin Trifosfat
CRP	: <i>C-Reactive Protein</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
EPC	: <i>Endothelial Progenitor Cell</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
Hb	: Hemoglobin
HbA1C	: Glikohemoglobin
IWGDF	: <i>International Working Group Diabetic Foot</i>
IDS	: <i>Internasional Diabetes Federation</i>
IDSA	: <i>Infection Disese Society of America</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LKD	: Luka Kaki Diabetes
MMP-9	: <i>Matriks Metaloprotease-9</i>
PAI-1	: <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear</i>
PRP	: <i>Platelet Rich Plasma</i>
PRF	: <i>Platelet Rich Fibrin</i>
RSCM	: Rumah Sakit dr. Cipto MangunKusumo
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TIMP	: <i>Tissue Inhibitor of Metaloprotease</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth factor</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik	155
Lampiran 2. <i>Letter of Acceptance</i>	156
Lampiran 3. Status Penelitian.....	157
Lampiran 4. Formulir Persetujuan Mengikuti Penelitian	159
Lampiran 5. <i>Initial Study</i>	161
Lampiran 6. Lembar <i>Informed Concern</i> Penelitian.....	162
Lampiran 7. Contoh Alokasi Subjek Penelitian	165
Lampiran 8. Manuskrip Publikasi	166

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik kronik karena tubuh tidak dapat menggunakan insulin dengan baik. Insulin adalah hormon yang diproduksi sel β pankreas dan gangguan pada insulin akan meningkatkan kadar glukosa dalam darah melebihi batas normal (hiperglikemia). Hiperglikemia yang berlangsung lama dapat menyebabkan kerusakan serius di berbagai organ, terutama saraf dan pembuluh darah.¹

Menurut *World Health Organization (WHO)*, Cina memiliki penyandang DM terbanyak di dunia (109,6 juta), diikuti oleh India (69,2 juta), dan Amerika Serikat (29,3 juta), Brazil (14,3 juta), Rusia (12,1 juta) dan Meksiko (11,5 juta) orang.² Di Indonesia jumlah penduduk tahun 2018 adalah 258.000.000 dengan penyandang DM sebanyak 10,6 juta orang (urutan ke-7 didunia). Berdasarkan hasil riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2018, jumlah penyandang DM terbanyak di Indonesia adalah DKI Jakarta dan jumlah tersebut meningkat dari 2,5% menjadi 3,4% atau sekitar 250 ribu penduduk menderita DM.³

Diabetes melitus banyak memberikan komplikasi kronik dan yang terbanyak adalah nefropati diabetik (42,6%), diikuti retinopati diabetik (37,6%), penyakit jantung koroner (33%), pembuluh darah perifer (30%), neuropati diabetik (23,4%) dan pembuluh darah otak (19%). Komplikasi kronik DM umumnya akibat gangguan pembuluh darah (angiopati) dan neuropati. Komplikasi kronik makroangiopati adalah 66,5% dan mikroangiopati adalah 81,7%.⁴

Manifestasi mikroangiopati dan neuropati adalah LKD yang merupakan masalah penting di masyarakat yang merupakan penyebab utama amputasi atau kematian akibat DM.^{5,6} Prevalensi LKD sekitar 1,0–4,1% di Amerika Serikat (AS) dan 20,4% di Belanda.⁷ Di Indonesia prevalensi LKD adalah 15% dari penyandang DM. Penyandang LKD mempunyai risiko 15 kali lebih besar untuk mengalami amputasi ekstremitas. Angka kematian adalah 32,5% dan angka amputasi 23,5%. Penyandang DM setahun pasca-amputasi, sebanyak 14,3% meninggal dan 37% meninggal 3 tahun pasca-amputasi. Biaya perawatan LKD cukup besar yaitu Rp1,3 juta sampai Rp1,6 juta perbulan karena perawatan yang lama.⁸

Faktor-faktor yang menghambat penyembuhan LKD antara lain durasi dan tingkat keparahan, hiperglikemia, inflamasi kronik dan kadar fibrinogen serum. Pada DM penyembuhan luka terhambat karena kadar glukosa yang tinggi. Kadar glukosa darah > 200 mg/dL akan menghambat penyembuhan luka.⁹ Dengan pemantauan kadar glukosa darah dan terapi insulin intensif risiko hiperglikemia dapat menurun.

Hiperglikemia juga meningkatkan *irreversible Advanced glycosylation end products* (AGE). Akumulasi AGE di dinding pembuluh darah mengakibatkan aterosklerosis yang menjadi dasar komplikasi kronik diabetik.¹⁰ Disfungsi selular yang disebabkan peningkatan AGE terjadi akibat mekanisme pro-oksidatif sedangkan AGE dan ROS mengganggu vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah, deposisi protein subendotelial, dan inaktivasi oksida nitrat.¹¹ Hiperglikemia menurunkan kemampuan leukosit untuk melawan infeksi karena gangguan aktivitas fagositosis neutrofil.¹²

Hiperglikemia memengaruhi fase inflamasi pada kaskade penyembuhan luka karena memicu inflamasi kronik yang ditandai dengan peningkatan interleukin-6 (IL-6). *Human IL-6* adalah sitokin terfosforilasi dengan 183 asam amino dan memberikan respons inflamasi akut yaitu demam dan berperan penting pada transisi peradangan akut ke peradangan kronik.¹³

Pada inflamasi kronik seperti LKD, IL-6 akan tinggi dan memengaruhi pembentukan enzim protease. Salah satu enzim protease yaitu matriks metaloprotease (MMP) akan mendegradasi *extracellular matrix* (ECM) yang bekerja pada fase awal penyembuhan luka dengan menghilangkan protein yang rusak dan terjadi degradasi membran basal kapiler. Molekul adhesif di permukaan endotel vaskular di sekitar jaringan yang rusak akan teraktivasi sehingga neutrofil dapat menempel pada endotelium.^{13,14} Neutrofil kemudian bergerak melalui kapiler yang pecah atau melalui celah antar sel endotel. Neutrofil memainkan peran utama dalam pengendalian infeksi jaringan. Neutrofil juga terlibat dalam proses penyembuhan luka karena neutrofil menghasilkan beberapa faktor pertumbuhan yang mendorong proliferasi. Pada fase proliferasi MMP berfungsi untuk angiogenesis dan migrasi sel; MMP juga memengaruhi aktivitas beberapa faktor pertumbuhan. Pada kondisi normal, interaksi MMP dengan *growth factor* mampu mempertahankan keseimbangan ECM.¹⁴

Penyembuhan LKD juga dipengaruhi kontrol vaskular (makrovaskular dan mikrovaskular), metabolik, infeksi, tekanan dan manajemen luka. Pengelolaan dengan mengontrol mikrosirkulasi dan *growth factor* digunakan untuk menginduksi neovaskularisasi. Beberapa *growth factor* yang terlibat dalam proses angiogenesis, antara lain *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endotel growth factor* (VEGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *basic fibroblas growth factor* (b-FGF), dan eritropoietin. Biomarker VEGF dan PDGF adalah peranda kuat angiogenesis yang merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka serta berperan penting memasok makanan ke jaringan yang baru terbentuk.¹⁵ Proses angiogenesis diatur secara spesifik oleh angiomodulator melalui keseimbangan faktor stimulator dan inhibitor angiogenesis. Pertumbuhan pembuluh darah ditentukan oleh mediator kimia dan matriks ekstraselular yang dapat meningkatkan proses penyembuhan luka.¹⁶ Pertumbuhan pembuluh darah baru juga dipengaruhi *growth factor* yang banyak terdapat dalam trombosit. Saat aktivasi trombosit, *growth factor* dilepaskan dari trombosit. Sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) yang dilepaskan oleh neutrofil dan makrofag pada saat inflamasi juga berperan pada proses angiogenesis.

Selama ini perawatan standar LKD adalah NaCl 0,9%. Fungsi NaCl adalah mendorong aksi osmotik untuk membantu membersihkan luka secara alami dan mempertahankan lingkungan luka yang lembap untuk meningkatkan penyembuhan. Beberapa dekade ini mulai dikembangkan perawatan luka menggunakan trombosit yang dikonsentrasikan dalam *platelet rich plasma*

Platelet rich plasma (PRP) adalah plasma darah yang mengandung konsentrasi trombosit tinggi setelah menjalani proses tertentu. Kelebihan PRP adalah tingginya kandungan *growth factor* sehingga mampu merangsang penyembuhan tulang dan jaringan lunak serta meningkatkan jaringan kolagen yang berperan dalam proses regenerasi sel. *Growth factor* dalam PRP adalah protein *alpha-granules* yaitu *platelet-derived growth factor* (PDGF), TGF, IL, *platelet-derived angiogenesis factor* (PDAF), VEGF, EGF, *insulin-like growth factor* (IGF) dan fibronectin.¹⁷ Sediaan PRP banyak digunakan di bidang ortopedi, THT, bedah plastik dan bedah mulut yang memberikan hasil positif pada penyembuhan tulang atau jaringan lunak.

Platelet-rich fibrin (PRF) atau *leucocyte-platelet-rich fibrin* (L-PRF) adalah PRP generasi ke-2 yang memanfaatkan trombosit dan leukosit autologus dalam matriks kompleks fibrin untuk mendapatkan *growth factor*. PRF adalah matriks fibrin alami yang mengandung sitokin trombosit dan leukosit autologous dari tubuh penyandang sendiri. *Platelet-rich fibrin* mengandung sitokin dan *growth factor* yang berperan untuk penyembuhan luka. PRF melepaskan protein biologis aktif seperti PDGF, TGF- β , VEGF, dan EGF.¹⁸ PRF adalah cadangan berbagai *growth factor* yang melepaskan *growth factor* untuk digunakan dalam *tissue engineering* dan meningkatkan angiogenesis. *Platelet-rich fibrin* menguatkan sintesis kolagen, osteogenesis, epitelisasi, dan produksi jaringan granulasi serta efek antimikroba. Meskipun demikian, mekanisme neovaskularisasi terkait PRF masih sedikit yang diketahui. Diduga, PRF mengandung *growth factor* yang menginduksi proliferasi sel endotel dan pembentukan tabung kapiler untuk angiogenesis, arteriogenesis, serta vaskulogenesis pada LKD.¹⁹ Untuk menambah *growth factor* dalam PRF dapat diatur kecepatan dan lama pemutaran sentrifus. *Advanced-PRF* (A-PRF) dengan *low speed and low time* dapat meningkatkan jumlah *growth factor*.

Asam hialuronat merupakan glikosaminoglikan dan komponen struktural alami kulit di jaringan ikat yang berperan pada peningkatan angiogenesis, penyembuhan luka, dan LKD. Selain itu AH berperan penting untuk persendian dan kulit, serta menurunkan inflamasi kronik pada LKD. Sinergi AH dan PRP pada regenerasi tulang rawan di OA berupa kombinasi AH dan PRP mengurangi sitokin pro-inflamasi (TNF- α , IL-8, IL-10) dan meningkatkan proliferasi kondrosit articular melalui signal regenerasi yang berhubungan dengan *inhibition inflammation pathways*.^{20,21} Meskipun demikian, belum diketahui apakah kombinasi AH dan A-PRF mempercepat perbaikan jaringan LKD.²²

Wang *et al.*²³ meneliti salep khusus mengandung campuran fragmen AH dari 2 hingga 10 unit disakarida dan dilihat efeknya pada penyembuhan luka mencit DM. Hasil penelitian *in vitro* menunjukkan AH secara bermakna meningkatkan proliferasi, migrasi, dan pembentukan *endothel cell tube* pada kondisi glukosa darah tinggi. Pemberian AH topikal meningkatkan angiogenesis di area luka kulit; mekanisme yang mendasarinya adalah AH meningkatkan fosforilasi *extracellular-signal-reglukosated kinase* (ERK) dan ekspresi TGF- β 1.

Salah satu kriteria perbaikan luka adalah terbentuknya jaringan granulasi yang terbentuk lebih lambat pada DM. Secara makroskopis jaringan granulasi dapat dihitung luasnya menggunakan *software Image-J*. Jaringan granulasi biasanya tumbuh dari dasar luka dan mengisi luka. Gambaran tersebut dapat direkam dengan kamera digital kemudian dianalisis dengan *Image-J* untuk mengetahui volume, area permukaan, perimeter, diameter, serta indeks granulasi (IG) seluruh lapang pandang. Penyembuhan LKD ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi baru yang terlihat pada *Image-J*.

1.2 Rumusan Masalah

Penyembuhan LKD memerlukan waktu lama karena pada DM terjadi gangguan angiogenesis, peningkatan inflamasi, dan gangguan pembentukan jaringan granulasi. Pada penyandang DM juga terjadi penurunan jumlah *growth factor* terutama pada LKD, sehingga akan terjadi hambatan penyembuhan juga. Selama ini perawatan LKD menggunakan kompres NaCl, namun pertumbuhan jaringan granulasi cukup lama sehingga biaya perawatan malahan menjadi mahal.

Untuk mempercepat penyembuhan LKD dipikirkan untuk memberikan *growth factor* karena pada DM *growth factor*-nya rendah. *Growth factor* diambil dari tubuh penyandang sendiri (*autologous*) dari darah perifer yang diolah menjadi PRP (mengandung *growth factor*). Karena *growth factor* dari PRP autologus penyandang DM rendah maka dipikirkan untuk dikombinasi dengan AH yang dapat menginduksi pelepasan *growth factor*.

Saat ini PRP dibuat dalam sediaan injeksi sedangkan untuk kasus LKD diperlukan sediaan topikal gel. Oleh karena itu dipikirkan pemberian A-PRF gel yang merupakan generasi ke-2 PRP dan dikombinasi dengan AH.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah disusun pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh kombinasi terapi A-PRF + AH dibandingkan A-PRF, NaCl terhadap peningkatan angiogenesis pada penyembuhan luka LKD, yang digambarkan dengan peningkatan VEGF usap LKD pada hari ke-3 dan ke-7?

2. Bagaimana pengaruh kombinasi terapi A-PRF + AH dibandingkan A-PRF, NaCl terhadap peningkatan fibrogenesis LKD, yang digambarkan dengan peningkatan PDGF usap LKD pada hari ke-3 dan ke-7?
3. Bagaimana pengaruh kombinasi terapi A-PRF + AH dibandingkan A-PRF, NaCl terhadap penurunan inflamasi pada penyembuhan LKD, yang digambarkan dengan penurunan IL-6 usap LKD pada hari ke-3 dan ke-7?
4. Bagaimana pengaruh kombinasi terapi A-PRF + AH dibandingkan A-PRF, NaCl terhadap pembentukan jaringan granulasi yang digambarkan dengan peningkatan IG pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 pada penyembuhan LKD, yang diukur dengan peningkatan persentase (%) jaringan sehat pada *Image-J*.

1.4 Hipotesis

1. Pemberian kombinasi terapi A-PRF + AH meningkatkan VEGF dari usap LKD hari ke-3 dan ke-7 lebih besar dibandingkan A-PRF saja atau kontrol NaCl.
2. Pemberian kombinasi terapi A-PRF + AH menurunkan PDGF dari usap LKD hari ke-3 dan ke-7 lebih besar dibandingkan A-PRF saja atau kontrol NaCl.
3. Pemberian kombinasi terapi A-PRF + AH meningkatkan IL-6 dari usap LKD pada hari ke-3 dan ke-7 lebih besar dibandingkan A-PRF saja atau kontrol NaCl.
4. Pemberian kombinasi terapi A-PRF + AH meningkatkan IG pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 lebih besar dibandingkan A-PRF saja atau kontrol NaCl.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Mengetahui peran kombinasi AH dan A-PRF pada angiogenesis LKD dengan mengkaji VEGF, PDGF, IL-6, dan IG dalam upaya penyembuhan LKD.

1.5.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui efek pemberian terapi A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl terhadap peningkatan VEGF dari usap LKD hari ke-3 dan ke-7
2. Mengetahui efek pemberian terapi A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl terhadap peningkatan PDGF dari usap LKD hari ke-3 dan ke-7.

3. Mengetahui efek pemberian terapi A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl terhadap penurunan IL-6 dari usap LKD hari ke-3 dan ke-7.
4. Mengetahui efek pemberian terapi A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl terhadap peningkatan IG dari usap LKD hari ke-3 dan ke-7.

1.6 Manfaat Penelitian

Bidang Pelayanan

Bila terbukti pemberian terapi kombinasi A-PRF + AH dapat meningkatkan jaringan granulasi pada LKD, maka dapat digunakan sebagai salah satu terapi topikal LKD dengan kriteria luka yang sama

Bidang Akademi

Menambah pengetahuan peran penambahan AH pada A-PRF pada LKD untuk meningkatkan jaringan granulasi dan penyembuhan LKD.

Bidang Penelitian

Dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya tentang kombinasi A-PRF+AH pada peningkatan angiogenesis dengan dosis campuran yang optimal untuk meningkatkan pembentukan jaringan granulasi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, fungsi kerja insulin, atau keduanya. DM diderita semua kelompok usia, dan ekonomi di seluruh dunia. Prevalensi DM meningkat dengan cepat di seluruh dunia. Federasi DM internasional memperkirakan pada tahun 2018, 246 juta orang dewasa di dunia menyandang DM dan diperkirakan mencapai 380 juta pada tahun 2025. Pada 2015, sekitar 5 juta kematian dikaitkan dengan DM.²⁴

Indonesia dengan populasi 237,6 juta orang pada tahun 2010 merupakan negara ke-4 terpadat di dunia dan memiliki penyandang DM ke-7 terbanyak (7,6 juta). Saat ini, prevalensi DM di Indonesia 1,2–2,3% pada orang berusia di atas 15 tahun. Diperkirakan DM berkontribusi pada angka kematian di Indonesia. Penyakit kardiovaskular berkontribusi 30% dari kematian diikuti oleh kanker (13%), dan DM (3%).²⁵ Prevalensi DM diperkirakan terus meningkat terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Variasi geografis turut berpengaruh karena perbedaan etnis, ras, budaya dan gaya hidup. Penyandang DM dengan hiperglikemia yang kurang terkontrol mengalami banyak komplikasi terutama vaskular, yang memengaruhi pembuluh kecil (mikrovaskular), pembuluh besar (makrovaskular), atau keduanya.

Penyakit mikrovaskular yang mendasari tiga manifestasi umum DM adalah retinopati, nefropati dan penyakit saraf yang merusak penyembuhan kulit, bahkan kerusakan kecil pada integritas kulit dapat berkembang menjadi bisul yang lebih dalam dan mudah terinfeksi, terutama pada ekstremitas bawah. Kontrol glukosa plasma secara intensif dapat mencegah komplikasi tersebut.

Penyakit makrovaskular melibatkan aterosklerosis pembuluh darah besar yang mengarah ke angina pektoris dan infark miokard, serangan *transient ischemic attack* (TIA), dan penyakit arteri perifer. Disfungsi imun adalah komplikasi lain dan berkembang dari efek langsung hiperglikemia pada imunitas selular. Penyandang DM sangat rentan terhadap infeksi bakteri dan jamur.⁵

2.1.1 Komplikasi Diabetes Melitus

Banyak mekanisme yang mengaitkan hiperglikemia dengan komplikasi jangka panjang DM, salah satunya adalah reaksi glikosilasi nonenzimatik yaitu proses perlekatan glukosa ke gugus amino bebas pada protein tanpa bantuan enzim. Produk glikosilasi kolagen dan protein lain yang berumur panjang di jaringan interstisium dan dinding pembuluh darah mengalami tata ulang kimiawi yang berlangsung lambat untuk membentuk *irreversible Advanced glycosylation end products (AGE)*, yang terus menumpuk di dinding pembuluh. AGE memiliki sifat kimiawi dan biologik yang berpotensi patogenik seperti menyebabkan pembentukan ikatan silang di antara berbagai polipeptida. Hal tersebut menyebabkan terperangkapnya protein interstisium dan plasma yang tidak terglykosilasi. Terperangkapnya lipoprotein densitas rendah (LDL) menyebabkan protein tidak dapat keluar dari dinding pembuluh dan mendorong pengendapan kolesterol di intima sehingga terjadi percepatan aterosclerosis. AGE juga memengaruhi struktur dan fungsi kapiler, termasuk kapiler di glomerulus ginjal yang mengalami penebalan membran basal dan menjadi bocor. Selain itu AGE berikatan dengan reseptor pada banyak tipe sel seperti sel endotel, monosit, makrofag, limfosit, dan sel mesangium. Pengikatan tersebut menimbulkan beragam aktivitas biologis, seperti migrasi monosit, pengeluaran sitokin serta sintesis matriks ekstrasel. Semua efek tersebut berpotensi menyebabkan komplikasi DM.²⁶

Disfungsi imun adalah komplikasi utama lainnya dan berkembang dari efek langsung hiperglikemia pada imunitas selular. Sel yang mengalami hiperglikemia akan mengalami penurunan fungsi sel imun dan peningkatan inflamasi. Efek pro-inflamasi dan protrombotik dari hiperglikemia merusak vaskular. Pada penyandang DM terjadi pula mikrotrombosis arteri yang menjadi penyebab gangguan mikroangiopati dan menghambat penyembuhan luka.⁵

2.1.2 Pengaruh Hiperglikemia terhadap Sel Tubuh







Hiperglikemia intrasel disertai gangguan di jalur poliol dan menyebabkan penumpukan sorbitol dalam jaringan. Hiperglikemia intrasel disertai gangguan di jalur poliol merupakan mekanisme utama ke-2 yang berperan pada timbulnya komplikasi. Pada sebagian jaringan yang tidak memerlukan insulin untuk transpor

glukosa (saraf, lensa, ginjal, pembuluh darah), hiperglikemia meningkatkan glukosa intrasel, yang dimetabolisme oleh aldosa reduktase sorbitol (poliol) dan akhirnya menjadi fruktosa. Penimbunan sorbitol dan fruktosa meningkatkan osmolaritas intrasel dan influks air serta menyebabkan cedera sel osmotik.²⁷

Hiperglikemia pada DM menyebabkan terjadinya glikosilasi protein serum dan jaringan dengan pembentukan produk akhir glikasi lanjut dengan memproduksi *reactive oksigen species* (ROS). Terjadi aktivasi protein kinase C, yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan menyebabkan disfungsi endotel.²⁸

2.1.3 Komplikasi LKD

Klasifikasi Wagner digunakan pada pengelompokan LKD berdasarkan observasi kedalaman luka dan tingkat nekrosis jaringan. Klasifikasi LKD berdasarkan kriteria Wagner dibagi 5 derajat (dari 0 sampai 5)²⁹, sesuai Tabel 2.1. Gambar 2.1, menunjukkan diagram LKD berdasarkan Wagner, dengan gambaran klinis dijelaskan lebih lanjut pada Gambar 2.2. Derajat LKD 1–3 menunjukkan tanpa gangren, sedangkan derajat 4 dan 5: dengan gangren.

					
<i>Grade 0</i> Tidak ada luka terbuka	<i>Grade 1</i> Luka di Permukaan (Superficial)	<i>Grade 2</i> Luka Dalam (Deep Ulcer)	<i>Grade 3</i> Abses / Osteomielitis	<i>Grade 4</i> Gangren Sebagian Kaki	<i>Grade 5</i> Gangren Seluruh Kaki

Gambar 2.1. Klasifikasi LKD Berdasarkan Kriteria Wagner²

Tabel 2.1. Klasifikasi LKD Berdasarkan Kriteria Wagner²

Derajat LKD	Deskripsi
Derajat 0	Tidak ada ulkus tetapi terdapat faktor risiko
Derajat 1	Ulkus superfisial
Derajat 2	Ulkus dalam, melibatkan ligamen, tendon, kapsul sendi dan fascia namun tidak melibatkan tulang/abses
Derajat 3	Abses yang melibatkan tulang (terlihat di X-ray)
Derajat 4	Gangren lokal di ibu jari kaki, tumit dll
Derajat 5	Gangren luas meliputi seluruh kaki

Sistem lain adalah Klasifikasi Universitas Texas yang didasarkan pada pengamatan kedalaman luka menurut lapisan kulit dan pengamatan terhadap infeksi dan iskemik.³⁰

**Gambar 2.2. Gambaran Klinis Ulkus DM Klasifikasi Wagner²**

Kedua sistem klasifikasi yang ada kurang menggambarkan LKD dengan objektif maka IWGDF memuat sistem klasifikasi PEDIS (*Perfusion, Extent, Depth, Infection, and Sensation*) yang mengevaluasi 5 karakteristik dasar, seperti perfusi, perluasan/ukuran, kedalaman/kehilangan jaringan, infeksi, dan sensasi³¹ (Tabel 2.2.)

Tabel 2.2. Klasifikasi LKD Berdasarkan Kriteria PEDIS³²

Kriteria	Grade	Keluhan dan tanda
Gangguan Perfusi (Perfusion)	P1	Tidak ada
	P2	Penyakit arteri perifer tetapi tidak parah
	P3	Iskemia parah pada kaki
Ukuran (cm ²) <i>Extend/size</i>	E	Ukuran luka
Kedalaman(mm) (<i>Depth/</i> <i>tissue Loss</i>)	D1	Permukaan kaki, hanya sampai dermis
	D1	Luka di kaki sampai di bawah dermis meliputi
	D3	<i>fascia</i> , otot atau tendon Sudah mencapai tulang dan sendi
Infeksi (<i>Infection</i>)	I1	Tidak ada gejala
	I2	Hanya infeksi pada kulit dan jaringan
	I3	Eritema > 2 cm atau infeksi meliputi subkutan tetapi tidak ada tanda inflamasi
	I4	Infeksi dengan manifestasi demam, leukositosis, hipotensi dan azotemia
Hilang sensasi (<i>Sensation</i>)	S1	Tidak ada
	S2	Ada

2.1.4 Patogenesis Komplikasi LKD

Luka kaki diabetes terbentuk dari berbagai mekanisme patofisiologi dan neuropati merupakan faktor paling berperan. Menurunnya input sensorik ekstremitas bawah menyebabkan kaki mudah luka dan berulang. Komplikasi DM lainnya adalah vaskulopati mikrovaskular dan makrovasular yang menyebabkan aliran darah ke ekstremitas bawah berkurang dan terhambatnya tekanan oksigen gradien di jaringan. Hipoksia dan trauma berulang menyebabkan ulkus berkembang menjadi luka kronik.^{31,32}

Neuropati perifer merupakan faktor predisposisi yang paling awal muncul meliputi disfungsi sensorik, autonom dan neuropati motorik. Gangguan serabut sensorik menurunkan sensasi nyeri sehingga kaki mudah luka tanpa disadari. Disfungsi autonom menyebabkan perubahan aliran mikrovaskular dan arteri-vena *shunt* yang mengganggu perfusi ke jaringan, meningkatkan suhu kulit dan edema. Kaki menjadi kering dan mudah timbul fisura karena menurunnya fungsi kelenjar keringat sehingga terjadi hiperkeratosis yang merupakan predisposisi LKD.³²

Neuropati motorik menyebabkan kelemahan otot sehingga terjadi biomekanik abnormal pada kaki dan menimbulkan deformitas seperti *Hammer toes*, *claw toes*, dan *deformitas Charcot*. Neuropati merupakan salah satu penyebab terbentuknya kalus.

Selain neuropati perifer, angiopati diabetik merupakan faktor yang paling sering menyebabkan morbiditas dan mortalitas pada LKD. Manifestasi makroangiopati tampak sebagai obstruksi pada pembuluh darah besar yaitu arteri infrapopliteal dan terganggunya sirkulasi darah kolateral. Hal tersebut menimbulkan penyakit arteri perifer atau *peripheral arterial disease* (PAD) pada ekstremitas bawah. PAD sendiri merupakan faktor risiko yang meningkatkan kejadian LKD. Akibat mikroangiopati adalah terjadi penebalan membran basal kapiler dan disfungsi endotel yang mengganggu pertukaran nutrisi dan oksigen sehingga terjadi iskemia di jaringan.³³

2.1.5 Pengelolaan Umum LKD

Tujuan utama pengelolaan LKD adalah untuk mengakses proses ke arah penyembuhan luka secepat mungkin karena perbaikan LKD yang tidak tepat dapat menyebabkan terjadi komplikasi amputasi dan kematian penyandang DM. Secara umum pengelolaan LKD meliputi kontrol metabolik penanganan iskemia, debridemen, penanganan luka, menurunkan tekanan plantar pedis (*off-loading*), penanganan bedah, penanganan komorbiditas dan menurunkan risiko kekambuhan serta pengelolaan infeksi.³⁴

Terapi ajuvan lain yang sering digunakan dalam pengelolaan LKD adalah terapi oksigen hiperbarik (TOH). TOH merupakan pemberian oksigen untuk pasien dengan tekanan yang lebih tinggi dari tekanan atmosfer normal. Hal tersebut menyebabkan peningkatan konsentrasi oksigen dalam darah dan peningkatan kapasitas difusi jaringan. Tekanan parsial oksigen dalam jaringan yang meningkat akan merangsang neovaskularisasi dan replikasi fibroblas serta meningkatkan fagositosis dan *leucocyte-mediated killing* bakteri.³⁵ Terapi tambahan lain dengan menggunakan *granulocyte colony stimulating factors* (GCSF) merupakan terapi alternatif yang masih dalam penelitian. GCSF diketahui dapat meningkatkan aktivitas neutrofil pada penyandang DM.¹⁸ Pemberian suntikan GCSF subkutan selama satu minggu pada LKD yang disertai infeksi terbukti mempercepat eradikasi kuman, memperpendek waktu pemberian antibiotik serta menurunkan angka amputasi.

Terapi lain yang masih dalam tahap penelitian adalah penggunaan faktor pertumbuhan (*growth factor therapy*) dan *bioengineered tissue*. *Platelet-derived growth factor becaplermin* (PDGF-b, becaplermin) digunakan untuk merangsang

penyembuhan luka dan dianjurkan pada neuropati kaki diabetes. Pemakaian bahan tersebut secara topikal efektif dan aman, namun belum terdapat data yang memadai. Produk *bioengineered tissue* seperti *bioengineered skin* (Apligraf) dan *human dermis* (Dermagraf) merupakan implan biologik aktif untuk mempercepat penyembuhan ulkus kronik. Produk *bioengineering* menginduksi *growth factor* dan komponen matriks dermal melalui aktivitas fibroblas yang merangsang pertumbuhan jaringan dan penutupan luka.³⁶

2.2 Proses Penyembuhan Luka

Definisi luka adalah terputusnya kontinuitas jaringan akibat ruda paksa. Luka dapat sengaja dibuat untuk tujuan tertentu, seperti luka insisi pada operasi atau luka akibat trauma seperti luka akibat kecelakaan. Penyembuhan luka merupakan proses penggantian jaringan yang mati/rusak dengan jaringan baru dan sehat oleh tubuh dengan jalan regenerasi. Luka dikatakan sembuh apabila permukaannya dapat bersatu kembali dan didapatkan kekuatan jaringan yang mencapai normal. Penyembuhan luka meliputi dua kategori, pertama pemulihan jaringan melalui regenerasi jaringan hingga pulih struktur dan fungsinya. Kedua adalah *repair* yaitu pemulihan atau penggantian jaringan oleh jaringan ikat.³⁷

Penyembuhan luka terjadi per primam yaitu penyembuhan setelah tepi luka dilakukan penjahitan dan per sekundam yaitu luka yang tidak sembuh per primam sehingga proses penyembuhan lebih kompleks dan lebih lama. Penyembuhan per sekundam biasanya tetap terbuka dan biasanya dijumpai pada luka kehilangan jaringan, terkontaminasi atau terinfeksi. Penyembuhan dimulai dari lapisan dalam dengan pembentukan jaringan granulasi. Penyembuhan per tertiam atau per primam tertunda adalah luka dibiarkan terbuka beberapa hari setelah debridemen atau setelah bersih, kemudian luka ditautkan (4–7 hari).³⁸

Proses penyembuhan luka dari awal trauma hingga tercapainya penyembuhan melalui tahapan yang kompleks terdiri atas fase homeostasis dan inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi.³⁹

Fase homeostasis. Setelah luka terjadi perdarahan kemudian diikuti oleh aktivasi kaskade pembekuan darah sehingga terbentuk klot hematoma. Proses ini diikuti oleh proses selanjutnya yaitu fase inflamasi.³⁶

Fase inflamasi. Fase inflamasi mempunyai prioritas fungsional yaitu meningkatkan hemostasis, menyingkirkan jaringan mati, dan mencegah infeksi. Pada fase ini platelet yang membentuk klot hematoma mengalami degranulasi, melepaskan *growth factor* seperti *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β), *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), C5a, TNF α , IL-1 dan IL-8. Leukosit bermigrasi menuju daerah luka. Terjadi deposit matriks fibrin yang mengawali proses penutupan luka. Proses ini terjadi pada hari ke-2 sampai hari ke-4.³⁶

Fase proliferasi. Fase proliferasi terjadi dari hari ke-4 sampai hari ke-21 setelah trauma. Keratinosit di sekitar luka mengalami perubahan fenotip. Regresi hubungan desmosomal antara keratinosit di membran basal menyebabkan sel keratin bermigrasi ke lateral. Keratinosit bergerak melalui interaksi dengan matriks protein ekstraselular (fibronektin, vitronektin dan kolagen tipe I). Pada fase proliferasi, makrofag melepaskan faktor proangiogenik sehingga terjadi neovaskularisasi dan jaringan granulasi.³⁶

Fase remodeling/maturasi. Remodeling merupakan fase paling lama pada penyembuhan luka, terjadi pada hari ke-21 hingga 1 tahun. Fase tersebut ditandai oleh kontraksi luka akibat pembentukan aktin miofibroblas dengan aktin mikrofilamen yang memberikan kekuatan kontraksi pada penyembuhan luka. Pada fase tersebut juga terjadi remodeling kolagen. Kolagen tipe III digantikan kolagen tipe I yang dimediasi MMP yang disekresi makrofag, fibroblas, dan sel endotel. Pada masa tiga minggu penyembuhan, luka telah mendapatkan 20% kekuatan jaringan normal.⁴⁰

2.2.1 Peran *Growth factor* pada Penyembuhan Luka

Tumbuhnya jaringan granulasi sudah dimulai sejak awal penyembuhan (hari ke-3 hingga ke-5) dan berlanjut beberapa minggu bergantung pada luas permukaan luka. Jaringan granulasi adalah jaringan fibrosa yang terbentuk dari bekuan darah sebagai bagian dari proses penyembuhan luka yang setelah matang akan menjadi jaringan parut. Terbentuknya granulasi ditandai neovaskularisasi dan fibroblas.

Stimulasi fibroblas dikendalikan faktor pertumbuhan seperti PDGF, *basic fibroblas growth factor* (bFGF), TGF- β , IL-1, dan TNF. Makrofag merupakan unsur sel yang penting pada pembentukan jaringan granulasi. Neovaskularisasi membantu mempercepat proses granulasi dan normalisasi jaringan melalui peningkatan suplai

vitamin, mineral, glukosa dan asam amino ke fibroblas untuk memaksimalkan pembentukan kolagen.⁴¹ Jenis *growth factor* pada penyembuhan luka dijelaskan di Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Peran *Growth Factor* pada Penyembuhan Luka¹⁹¹

<i>Growth Factor</i>	Fungsi
EGF	Migrasi, proliferasi, diferensiasi, re-epitelisasi keratinosit, epidermal
FGF 1,2	Proliferasi fibroblas dan keratinosit, proliferasi, migrasi, ketahanan sel endotel, angiogenesis
IGF	Proliferasi sel
KGF/ FGF-7	Proliferasi keratinosit
PDGF	Kemotaksis, proliferasi, kontraksi fibroblast
TGF- α	Migrasi, proliferasi, diferensiasi, reepitelisasi keratinosit, epidermal
TGF- β 1, β 2, β 3,	Kemotaksis fibroblas, deposit matriks ekstraselular, inhibisi proliferasi sel, inhibisi sekresi inhibitor protease, migrasi, ketahanan sel endotelial, angiogenesis
VEGF	Proliferasi, migrasi ketahanan sel endotelial, peningkatan vasopermeabilitas, angiogenesis

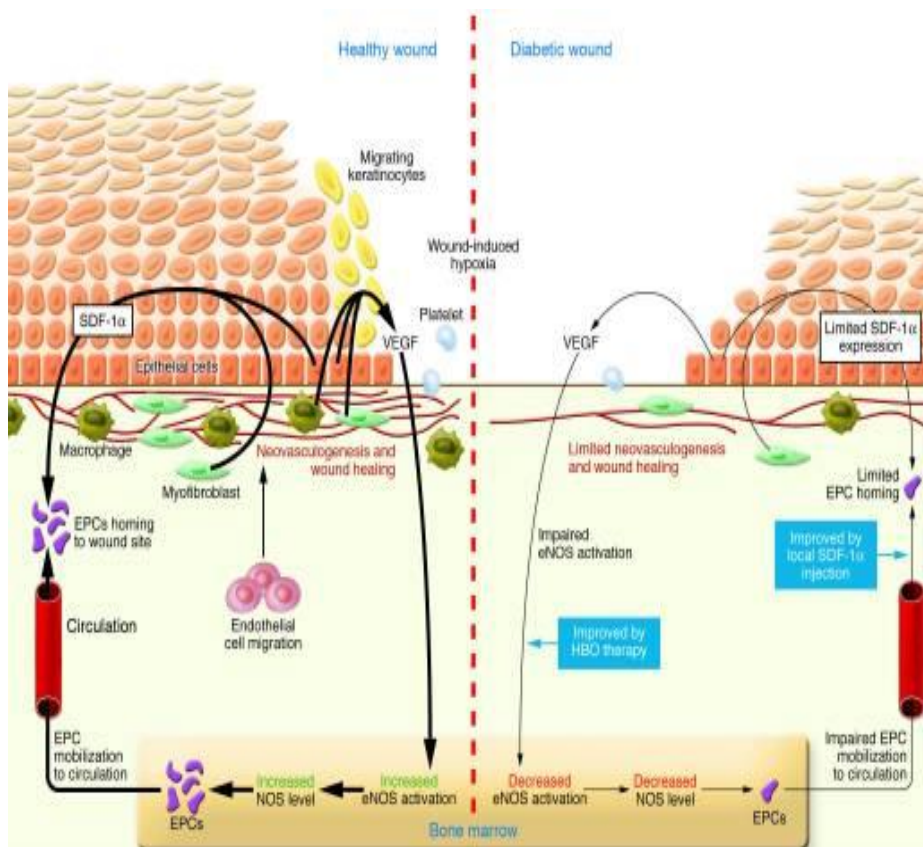
Transforming growth factor β (TGF- β) memiliki spektrum paling luas dan memengaruhi semua jenis sel pada tahap penyembuhan luka. Terdapat efek positif dan negatif TGF- β pada penyembuhan luka, namun mekanismenya sebagian besar tidak diketahui. Penyembuhan luka yang melambat disebabkan peradangan dan TGF- β merangsang pembentukan jaringan ikat oleh keratinosit dan fibroblas.⁴²

TGF β memiliki super famili yaitu TGF- β tipe 1, 2, dan 3 yang terlibat pada setiap tahap penyembuhan luka. Namun terdapat faktor lain berperan pada penyembuhan luka seperti IGF-1, EGF, PDGF. Meskipun TGF- β 1 dianggap sebagai faktor utama pendukung penyembuhan luka, faktor lain seperti IGF-1, EGF, PDGF, dan FGF tetap berkontribusi dalam pembentukan jaringan ikat dalam proses penyembuhan luka.

Fibroblas yang diproduksi pada LKD berbeda dalam merespons stimulasi EGF, IGF-I, bFGF dan PDGF-AB dibandingkan luka normal. Penyembuhan dapat dipercepat karena pengaruh *growth factor* seperti PDGF, EGF, bFGF dan IGF-I. Pembentukan fibroblas yang diinduksi *growth factor* akan membantu fase proliferasi pada penyembuhan LKD.

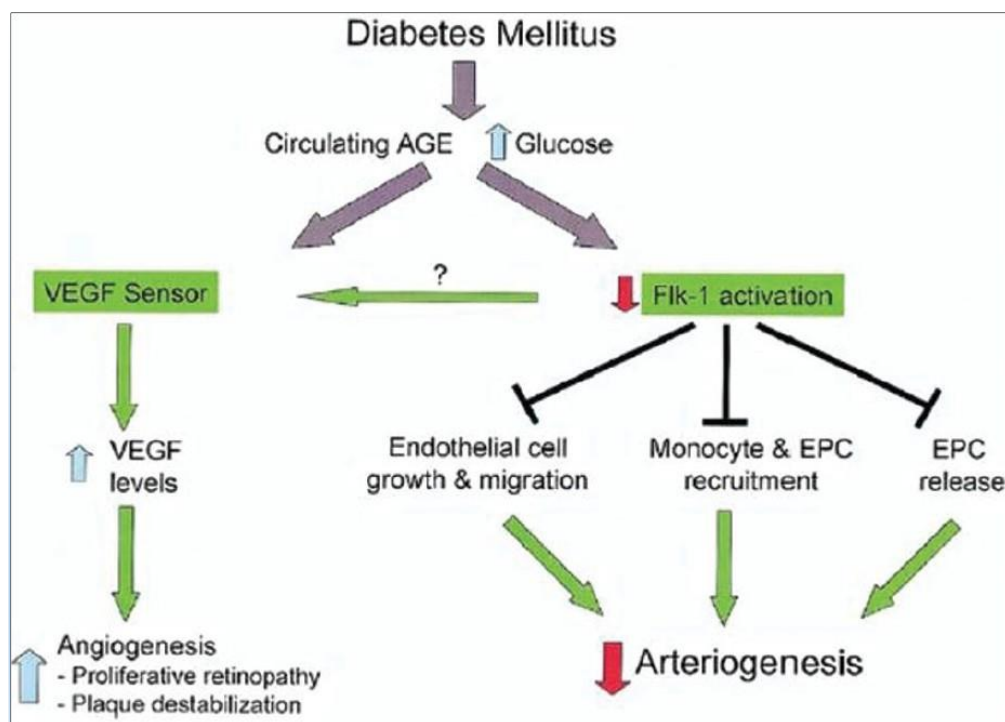
2.2.2 Peran VEGF pada Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan respons selular meliputi aktivasi keratinosit, fibroblas, sel endotel, makrofag, dan *platelet*. *Growth factor* dan sitokin dilepaskan oleh sel tersebut untuk menjaga proses penyembuhan luka. VEGF adalah faktor fisiologis penting pada penyembuhan luka, namun pada DM kualitas respons sangat berbeda.. Pada individu sehat, proses penyembuhan akut luka dipandu melalui integrasi sinyal dalam bentuk sitokin dan kemokin yang dilepaskan oleh keratinosit, fibroblas, sel endotel, makrofag, dan trombosit. Pada luka yang hipoksia, VEGF dilepaskan oleh makrofag, fibroblas, dan sel epitel untuk menginduksi fosforilasi dan aktivasi eNOS di sumsum tulang, yang meningkatkan NO, memicu mobilisasi *endothelial progenitor cell (EPC)* sumsum tulang ke sirkulasi, *stromal cell-derived factor-1 α* (*SDF-1 α*) mempromosikan EPC ke lokasi cedera dan pada permulaan neovaskulogenesis . Pada model tikus DM, fosforilasi eNOS di sumsum tulang terganggu sehingga membatasi mobilisasi EPC dari sumsum tulang ke sirkulasi. Ekspresi *SDF-1 α* menurun di sel epitel dan miofibroblas pada LKD, yang menurunkan mobilisasi EPC ke lokasi luka sehingga penyembuhan luka terhambat. (Gambar 2.3.).



Gambar 2.3. *Growth Factor* pada Penyembuhan Luka³²

Pada LKD, kadar *growth factors* di jaringan luka seperti VEGF, *fibroblast growth factor* (FGF)-2 rendah karena fibroblas tidak mampu meningkatkan produksi VEGF dan FGF-2 pada level normal saat merespons hipoksia. Kadar dan aktivitas VEGF yang menurun pada hipoksia mengganggu penyembuhan luka. Tanpa respons angiogenesis yang tepat, fase proliferasi sel dan deposisi matriks menjadi menurun. Luka kronik di kaki menyebabkan hipoksia jaringan dan kegagalan penyembuhan luka. Selain itu faktor tekanan oksigen lokal pada ulkus kronik menurun sehingga terjadi gangguan replikasi fibroblas, deposisi kolagen, angiogenesis, dan vaskulogenesis. Penurunan VEGF mengganggu angiogenesis dan arteriogenesis (Gambar 2.4.).⁴³



Gambar 2.4. Urutan Kejadian Gangguan Angiogenesis pada DM⁴⁴

2.2.2.1 Peran VEGF pada Angiogenesis

Vaskulogenesis dan angiogenesis dipengaruhi VEGF yang memiliki 5 ligan (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E). Ligan VEGF-A diproduksi sel endotel, keratinosit, sel halus fibroblas, trombosit, neutrofil dan makrofag. Ligan VEGF-A memfasilitasi perbaikan jaringan dengan meningkatkan permeabilitas vaskular sehingga sel inflamasi masuk ke lokasi cedera, meningkatkan migrasi dan

proliferasi sel endotel. Pada angiogenesis, VEGF-A berperan penting pada penyembuhan LKD.

Growth factor yang menginduksi dan mempertahankan pembuluh darah adalah FGF, PDGF, dan angiopoietin. Ligan VEGF berikatan dengan 3 reseptor tirosin kinase yaitu VEGFR-1, VEGFR-2, dan VEGFR-3. Aktivasi VEGFR menimbulkan rantai reaksi yaitu dimerisasi, aktivasi tirosin kinase (autofosforilasi) dan pembentukan signal transduksi yang diikuti reaksi biologi sel seperti sel proliferasi, survival dan migrasi. VEGFR bersifat unik dan sangat bervariasi. VEGFR-1 adalah regulator positif pada migrasi makrofag dan monosit, regulator negatif pada kapasitas sinyaling VEGFR-2, namun regulator negatif lebih mendominasi. VEGFR-2 berimplikasi pada aspek normal dan patologis biologi sel endotel vaskular. VEGFR-3 lebih berperan pada fungsi limfangiosis. Gen rekombinan manusia-VEGF/rh-VEGF dikenal sebagai Tecblarmin.⁴⁵

2.2.3 Peran PDGF pada Penyembuhan Luka

Pertama kali PDGF dikenal sebagai mitogen fibroblas, sel otot polos dan sel endotel serta berfungsi menginduksi kemotaksis untuk sel yang memasuki luka seperti neutrofil dan monosit. Sumber utama PDGF adalah sel fibroblas, sel otot polos, kondrosit, osteoblas dan *mesenchymal stem cells*. PDGF berperan sebagai kemoatraktan untuk hematopoietik dan sel *mesenchymal*, fibroblas, sel otot, dan kemotaksis sel.⁴⁶

Fungsi lain PDGF adalah mengaktifkan TNF- α , merangsang neutrofil dan makrofag, mitogenesis fibroblas, sel otot polos, kolagen, aktivitas kolagenase, dan angiogenesis. Efek utama PDGF adalah stimulasi sintesis matriks ekstraselular (ECM) dan produksi kolagen. Setelah aktif, fibroblas PDGF menghasilkan komponen matriks seperti AH dan fibronektin serta menyintesis kolagen tipe I untuk memperkuat penyembuhan luka.

Fungsi PDGF lainnya adalah mengaktifkan kaskade pensinyalan intraselular melalui reseptor berbeda yang mengarah ke efek pleiotropik di luka. Efek PDGF berbeda selama penyembuhan luka. Pada awal cedera, *growth factor* dilepaskan dari trombosit dan sel endotel berfungsi sebagai sinyal kemotaksis untuk neutrofil,

makrofag, dan fibroblas ke jaringan yang rusak. Stimulasi ke luka menyebabkan produksi PDGF endogen, sintesis ECM, proliferasi fibroblas, dan produksi kolagen. Setelah 2–3 minggu, pensinyalan PDGF berkontribusi pada remodeling luka dengan mengatur pergantian kolagen aktif. Perubahan temporal pada efek PDGF sebagian ditentukan oleh konsentrasi relatif terhadap *growth factor* penting seperti TGF- β , *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), IL-1, *growth factor* epidermal (EGF), dan TNF- α .⁴⁷

Keberadaan PDGF tidak dapat dipisahkan dari inflamasi di jaringan luka. Pada saat terjadi luka, monosit masuk ke jaringan dan menjadi makrofag saat terjadi peradangan. Makrofag dihubungkan dengan fungsinya melakukan fagositosis benda asing, namun makrofag memiliki fungsi lain yaitu angiogenesis dan fibrosis. Pada proses angiogenesis makrofag menyekresikan TNF- α , VEGF, angiogenin, urokinase dan PDGF yang menginduksi neovaskularisasi. Pada proses fibrosis, makrofag menyekresikan FGF, PDGF dan TGF- β yang merangsang fibroblas menghasilkan kolagen dan elastin.⁴⁴

Fungsi PDGF adalah menstimulasi aktivitas fibroblas, miofibroblas, dan sel endotel untuk pertumbuhan granulasi dan meningkatkan fibroblas luka untuk menyintesis *growth factor* pro-fibrogenik yang menstimulasi granulasi, kontraksi dan vaskularisasi. Cara kerja PDGF adalah stimulasi kemotaksis, proliferasi, dan ekspresi gen baru dalam makrofag dan fibroblas secara *in vitro* (Gambar 2.5.).



Gambar 2.5. Amplifikasi Sinyal PDGF pada Makrofag

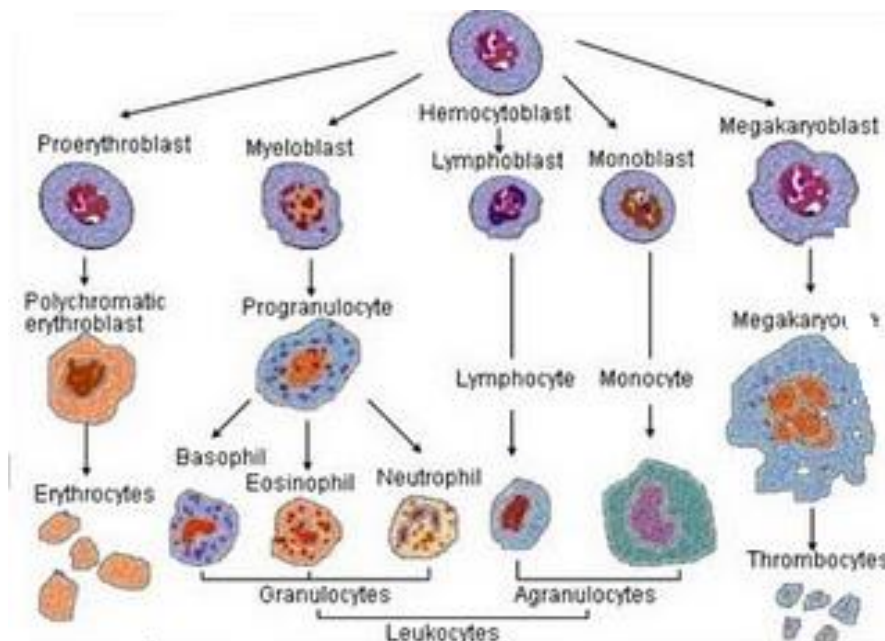
Analisis pengaruh homodimer rantai B rekombinan B di luka insisi dan eksisi yang diberikan PDGF (PDGF-BB) 20–200 pikomol secara topikal menunjukkan penambahan produksi sel inflamasi dan fibroblas. Pada luka insisi, PDGF-BB menambah kekuatan regangan luka 50–70% tiga minggu pertama sedangkan pada luka eksisi, PDGF-BB mempercepat waktu penutupan luka 30%.⁴⁷ *Recombinant human platelet derived growth factors* (rhPDGF-BB) adalah satu-satunya *growth factor* yang disetujui US Food and Drug Administration (FDA).⁴⁵

2.2.4 Peran Trombosit pada Penyembuhan Luka

Trombosit berfungsi pada pembekuan darah sehingga berperan penting ketika terjadi luka. Jumlah trombosit normal manusia 150.000–400.000 per mikro-liter darah. Jumlah trombosit < 150.000 disebut trombositopenia, sedangkan jika > 400.000 disebut trombositosis.⁴⁸ Masa hidup trombosit 5–9 hari dalam darah. Trombosit tua dan rusak dihancurkan limpa kemudian diganti trombosit baru (Gambar 2.6.).

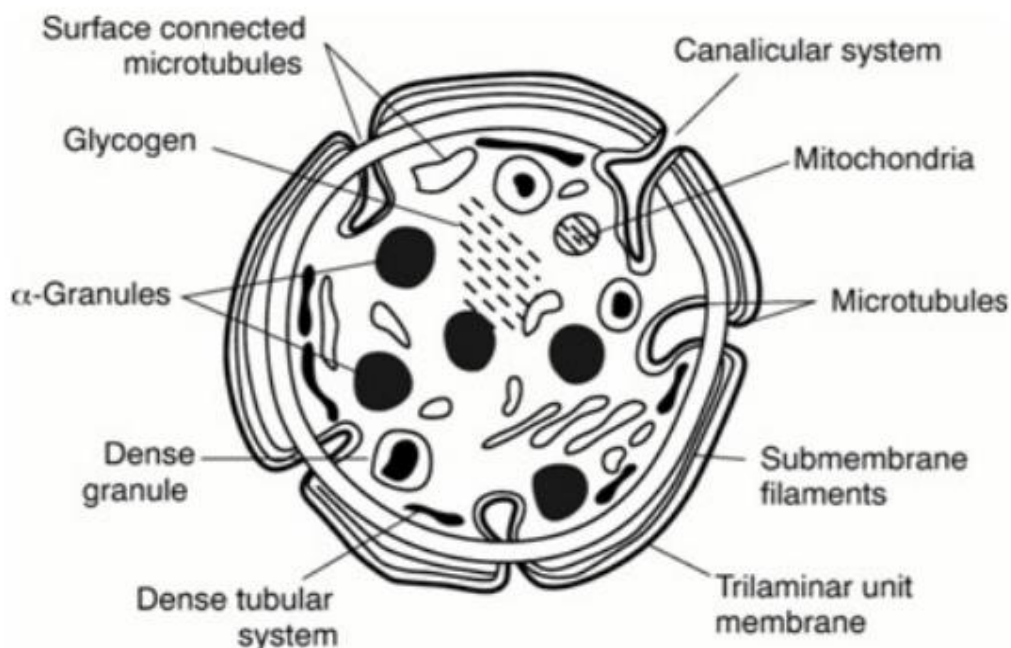
2.2.4.1 Anatomi Trombosit

Trombosit dibentuk di sumsum tulang yang disebut megakariosit, kemudian mengalami pematangan menjadi trombosit yang tidak memiliki inti sel. (Gambar 2.6.).



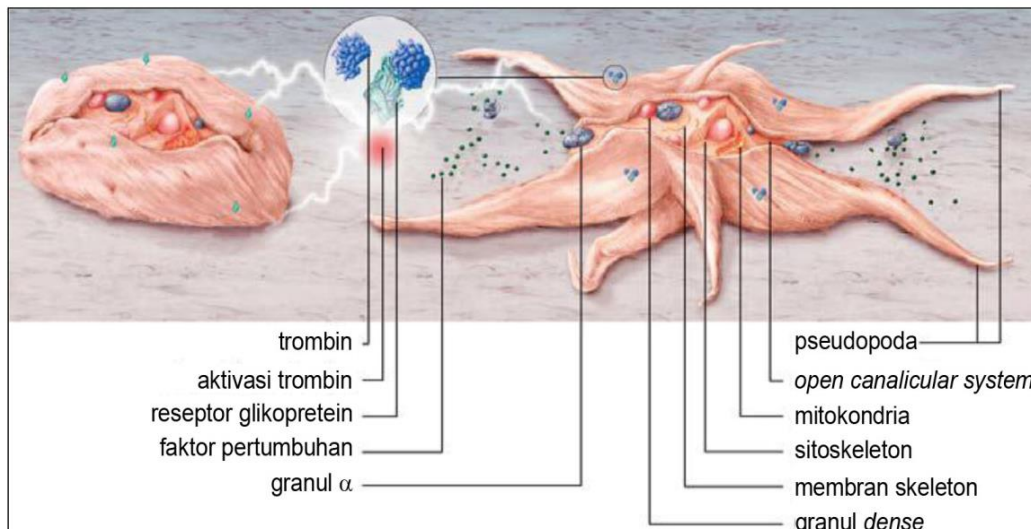
Gambar 2.6. Proses Pematangan Trombosit⁴⁹

Trombosit berbentuk diskoid berukuran 1–3 μm , terdiri atas membran sel, mikrotubulus dan sitoplasma serta memiliki sitoskeleton berbentuk cincin (*contractile microtubules*) di bagian perifer yang mengandung protein polimer disebut tubulin.⁴⁶ sesuai Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Struktur Trombosit⁵⁰

Pada kondisi normal trombosit berada dalam keadaan istirahat, bukan fase aktif. Saat teraktivasi, misalnya oleh trombin, trombosit mengalami perubahan morfologi dengan membentuk pseudopoda untuk merangsang agregasi trombosit dan lepasnya granula dens, granula alfa serta terbukanya sistem kanalikular.⁸ Struktur intraselular trombosit mengandung lisosom, glikogen dan dua macam granula (Gambar 2.7.). Granula ke-1 adalah granula dens yang mengandung ADP, ATP, serotonin dan kalsium. Granula ke-2 adalah granula alfa yang mengandung faktor pembekuan, *growth factor* serta protein yaitu aktin, miosin, tromboastenin yang berperan untuk kontraksi, stabilisasi fibrin (Gambar 2.8.).⁴⁸



Gambar 2.8. Skema Trombosit dalam Keadaan Istirahat dan Aktif⁵⁰

2.2.4.2 Fungsi Trombosit

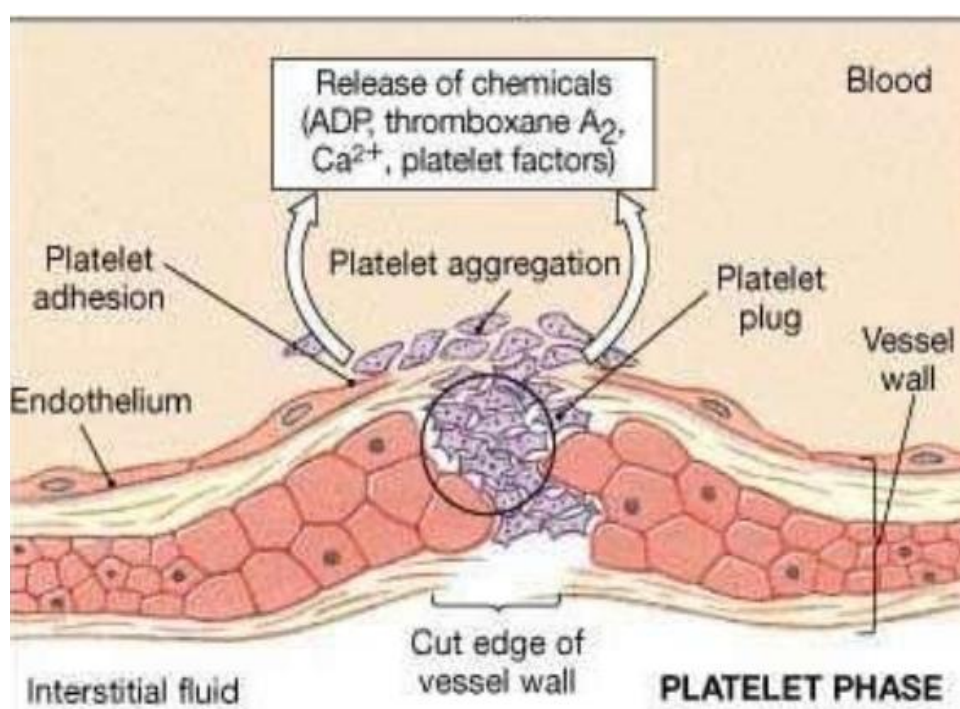
Fungsi trombosit atau platelet adalah untuk pembekuan darah serta berperan pada penyembuhan luka. Ketika pembuluh darah luka atau bocor, maka tubuh melakukan tiga mekanisme utama untuk menghentikan perdarahan, yaitu pembuluh darah berkontraksi agar darah yang keluar lebih sedikit karena lubang kebocoran mengecil. Reaksi tersebut memicu trombosit menempel di pembuluh darah yang cedera kemudian trombosit memberikan sinyal kepada trombosit lain dan pembekuan darah agar menuju ke area cedera untuk membantu menutup luka. Bentuk trombosit awalnya bulat berubah menjadi berduri untuk memudahkan agregasi. Trombosit berkumpul di lokasi luka kemudian memicu pembuluh darah untuk mengkerut agar tidak banyak darah yang keluar dan memicu pembentukan fibrin. Benang fibrin membentuk formasi seperti jaring yang akan menutupi luka sehingga menghentikan perdarahan aktif di luka. Setelah itu dimulai hemostasis sekunder dengan aktivasi faktor koagulasi dan terbentuk formasi sarang fibrin yang menstabilkan sumbatan trombosit. Tahap akhir pembekuan adalah aktivasi leukosit di area luka; leukosit melepaskan sitokin dan *growth factor* yang mengaktivasi fibrinolitik untuk proses lisis bekuan darah.⁵¹

2.2.4.3 Mekanisme Trombosit dalam Pembekuan Darah

Mekanisme trombosit dalam membentuk penyumbat luka terdiri atas adhesi dan agregasi trombosit. Adhesi trombosit adalah perlekatan antar trombosit dengan

jaringan endotel serta jaringan cedera sehingga luka di pembuluh darah menjadi menutup. Proses perlekatan mengakibatkan interaksi permukaan trombosit dengan jaringan cedera sehingga meningkatkan daya lekat trombosit dan memanggil faktor koagulasi lainnya.

Agregasi trombosit adalah kemampuan trombosit melekat satu sama lain untuk membentuk sumbatan. Trombosit yang melekat di jaringan cedera saat proses adhesi menyebabkan trombosit lain melekat kepada sehingga sumbatan menutup luka (Gambar 2.9).⁵²



Gambar 2.9. Proses Pembekuan Darah⁵²

2.2.4.4 Mekanisme Trombosit sebagai Penghasil Faktor Pertumbuhan

Struktur intraselular trombosit terdiri dari lisosom, glikogen dan dua macam granul. Granula pertama adalah granul dens yang mengandung ADP, ATP, serotonin dan kalsium. Granul kedua adalah granula alfa yang mengandung faktor pembekuan, *growth factor* seperti IGF-1, TGF- β , PDGF, dan protein pembekuan lainnya (seperti faktor trombospondin, fibronektin, faktor V, dan von Willebrand).⁵³

Pada studi *in vivo*, *growth factor* TGF- β berpengaruh pada regenerasi jaringan pada penyembuhan luka. *Growth factor* VEGF yang disimpan dan disekresikan oleh

endotelium dan osteoblas dan berperan utama dalam angiogenesis selama perbaikan defek *osseous*, sedangkan PDGF dilepaskan dari trombosit selama pembentukan hematoma dan menstimulasi migrasi osteoblas dan sel progenitor mesenkim.⁵³

2.3 Angiogenesis pada Penyembuhan Luka

Angiogenesis adalah proses fisiologi yang diperlukan dalam proses penyembuhan luka segera setelah perlukaan. Proses tersebut dimulai oleh sinyal molekular meliputi faktor hemostatik, inflamasi, sitokin dan interaksi sel matriks, selanjutnya proses pembentukan kapiler baru melalui *microvascular network* dan akumulasi kolagen.⁵⁴ Angiogenesis dirangsang oleh keadaan hipoksia jaringan serta *growth factor* khususnya VEGF, FGF-2 dan TNF- β . Gangguan proses angiogenesis mengganggu granulasi dan menghambat proses penyembuhan luka.⁵⁵

Pada angiogenesis terjadi kaskade teratur yaitu *angiogenic growth factor* berikatan dengan reseptornya di permukaan sel endotel pada sel induk vena. Pengaktifan reseptor *growth factor* melalui jalur sinyal di sel endotel. Sel endotel aktif melepaskan enzim proteolitik yang melarutkan membran basal di sekitar sel induk pembuluh darah. Sel endotel tumbuh ke luar melalui membran basal dan bermigrasi ke dasar luka menggunakan molekul adhesi permukaan sel yang disebut integrin (α V β 3, α V β 5, dan α 5 β 1); MMPs melarutkan matriks jaringan di sekitarnya. *Vascular sprout* membentuk saluran tubular yang saling terhubung untuk membentuk *vascular loops* yang akan berdiferensiasi menjadi aferen (arteri) dan eferen (vena). Proses pematangan pembuluh darah baru dengan merekrut sel mural (sel otot polos dan *pericytes*) untuk menstabilkan arsitektur vaskular.⁵⁵

2.3.1 Growth Factor Angiogenik di Kapiler

Growth factor angiogenik adalah molekul endogen yang mengatur pertumbuhan dan perkembangan *microvessels*. Regulator kuat remodeling mikrovaskular pada penyakit aterosklerotik adalah VEGF, angiopoietin-1 (Ang-1), dan angiopoietin-2 (Ang-2). Ang-1 diekspresikan dalam sel non-endotel, seperti *pericytes*, sel otot polos, dan fibroblas, sedangkan sumber utama Ang-2 dari sel endotel.⁵⁶

Pertumbuhan kapiler diatur oleh keseimbangan faktor proangiogenik dan antiangiogenik. Angiopoietin-1 mengatur maturasi, migrasi, adhesi, dan

kelangsungan hidup sel endotel sedangkan Ang-2 mengganggu koneksi di sel endotel dan perivaskular serta meningkatkan kematian sel dan regresi vaskular. Faktor angiogenik, seperti Ang-1 dan VEGF, diperlukan untuk neovaskularisasi. Pasokan darah yang tidak cukup karena iskemia arteri mengakibatkan disfungsi *growth factor* vaskular sehingga angiogenesis dan pembentukan pembuluh kolateral tidak adekuat.⁵⁷ *Growth factor* terkait penyembuhan jaringan seperti TGF- β 1 dan β 2, IGF, VEGF telah digunakan di bidang ortopedi, maksilofasial, periodontal, bedah plastik, dan kedokteran olah raga karena memiliki sifat anti-inflamasi dan antimikroba.⁴²

2.3.2 Peran VEGF dalam Proses Angiogenesis

Kerusakan jaringan tubuh pada DM terjadi melalui empat jalur utama yaitu *polyol pathway*, AGE, aktivasi *protein kinase C* (PKC) via peningkatan *diacyl glycerol* (DAG), dan *hexosamine pathway*. Hiperglikemia intrasel meningkatkan sintesis DAG yang meningkatkan ekspresi PKC dalam sel yang akan mengubah berbagai ekspresi gen yang merusak pembuluh darah. Peningkatan aktivitas PKC akan meningkatkan VEGF sehingga permeabilitas vaskular dan proses angiogenesis meningkat.⁵⁸

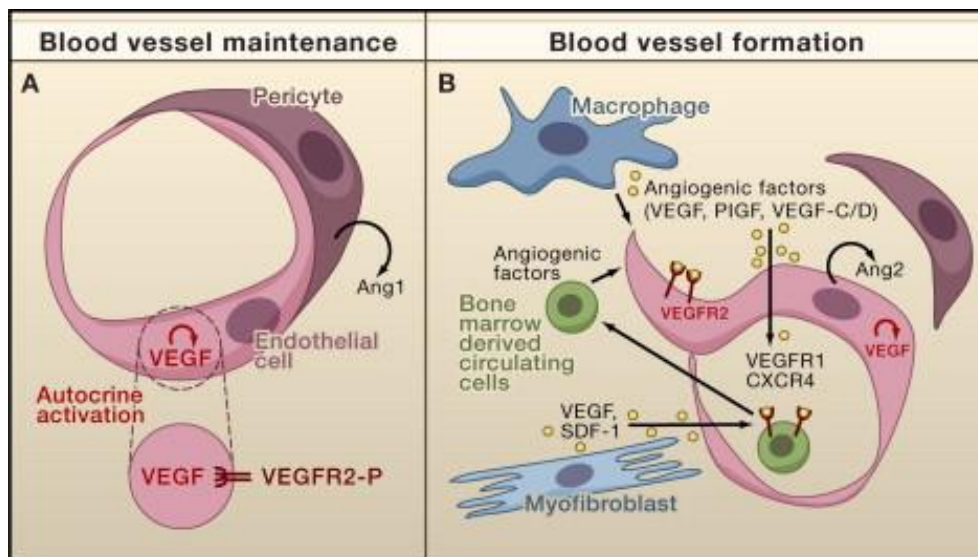
Perubahan vaskular sebagai komplikasi kronik DM bersifat paradoks, yaitu peningkatan angiogenesis pada retinopati proliferasif dan plak aterosklerosis serta penurunan angiogenesis pada penyakit arteri koroner atau LKD. Akibatnya pertumbuhan kolateral di jantung menurun dan gangguan penyembuhan LKD. Paradoks tersebut terjadi karena respons VEGF terganggu pada DM. Pertumbuhan pembuluh darah dari sel endotel yang sedang berdiferensiasi *in situ* disebut vaskulogenesis, sedangkan pertumbuhan pembuluh darah baru dari yang sudah ada disebut angiogenesis atau neovaskularisasi.⁵⁹

VEGF merangsang angiogenesis dalam tiga dimensi yaitu menyebabkan pertemuan sel-sel endotel mikrovaskular, penetrasi ke sel kolagen, dan membentuk struktur seperti kapiler (*capillary-like structures*). Selain itu, VEGF menyebabkan pertumbuhan (*sprouting*) pembuluh darah, respons angiogenik yang kuat, mendorong ekspresi *serine proteases uro-kinase-type* dan *tissue-type plasminogen activators* (PA) dan PA inhibitor-1 (PAI-1) di sel-sel endotel mikrovaskular untuk

mempertahankan keseimbangan proses proteolitik. Pengaruh VEGF terhadap kolagenase dan aktivator plasminogen akan menetapkan lingkungan prodegradasi untuk migrasi dan pertumbuhan sel endotel. Lingkungan tersebut merupakan elemen penting dari rantai proses selular yang menjembatani invasi selular serta remodeling jaringan sebagai aktivitas proangiogenik yang tetap dari VEGF.⁶⁰

Terkait dengan tumor dan luka, VEGF berperan sebagai faktor permeabilitas vaskular yang sangat penting pada angiogenesis. Fungsi utama VEGF dalam proses angiogenesis adalah mendorong kebocoran protein plasma sehingga terjadi pembentukan fibrin gel ekstrasvaskular, suatu substrat untuk penetrasi dan pertumbuhan sel endotel.

VEGF meningkat bersamaan dengan pembentukan pembuluh darah baru diikuti oleh deposisi jaringan granulasi, peningkatan epitelialisasi, peningkatan deposisi matriks, serta peningkatan proliferasi selular. Berkurangnya produksi VEGF dan angiogenesis menjadi salah satu faktor kegagalan penyembuhan luka pada penyandang DM (Gambar 2.10.).⁶¹



Gambar 2.10. Peran VEGF pada Penyembuhan Luka dengan Merangsang Sel Endotel dan Fase Kaskade Angiogenesis⁴⁴

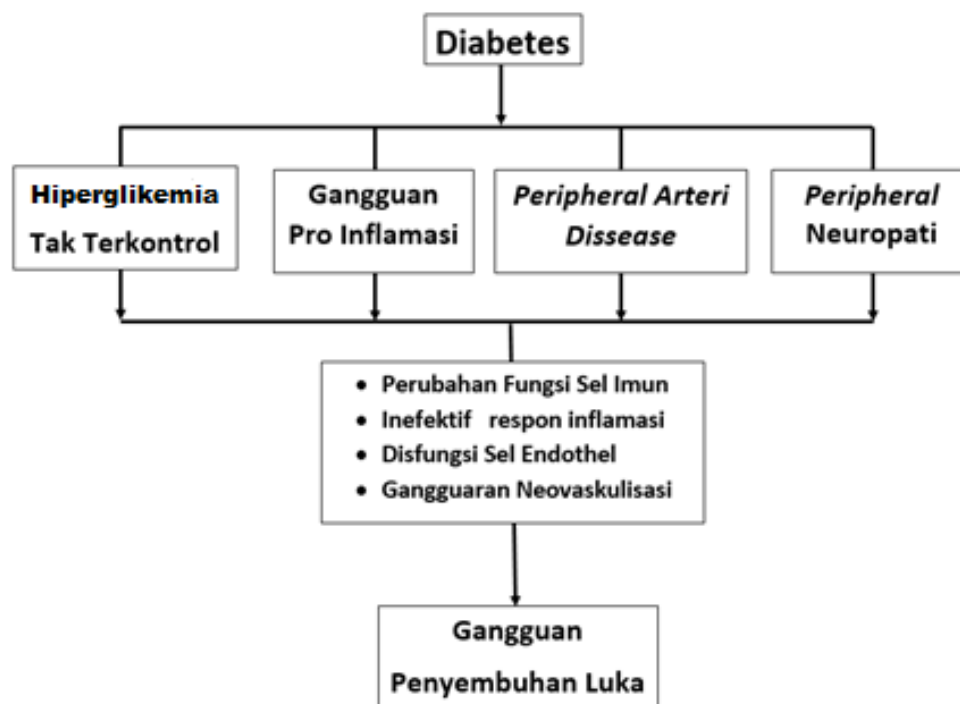
2.3.2.1 Pengukuran Kadar VEGF pada Proses Angiogenesis

Kadar VEGF dapat diukur dari spesimen jaringan, plasma, atau serum dengan metode ELISA.⁶² Secara fisiologis VEGF dan reseptornya (VEGFR) berperan penting pada

penyembuhan LKD namun jika respons angiogenesis berlebihan dapat menjadi patologis seperti kanker. Peran VEGF-A adalah mengatur angiogenesis dan permeabilitas pembuluh darah dengan mengaktifkan dua reseptor yaitu VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR/Flk1 pada tikus). VEGF-C/VEGF-D dan reseptornya serta VEGFR-3 (Flt-4) terutama mengatur limfangiogenesis. Sistem VEGF-VEGFR adalah target penting untuk terapi anti-angiogenik pada kanker, terapi pro-angiogenik pada terapi degenerasi neuron dan penyakit iskemik seperti LKD.⁶³

2.4 Gangguan Penyembuhan Luka pada Penyandang DM

Penyandang DM kronik mengalami penyembuhan luka lebih lama dibandingkan penyandang non-DM. Diabetes melitus mengganggu penyembuhan luka secara intrinsik, termasuk *collagen cross-linking*, fungsi MMP, dan gangguan imunologi terutama fungsi *polymorphonuclear* (PMN). Pada DM kronik terjadi hiperglikemia berkelanjutan serta peningkatan mediator inflamasi yang memicu respons inflamasi kronik (Gambar 2.11.).



Gambar 2.11. Gangguan Penyembuhan Luka pada DM⁴⁴

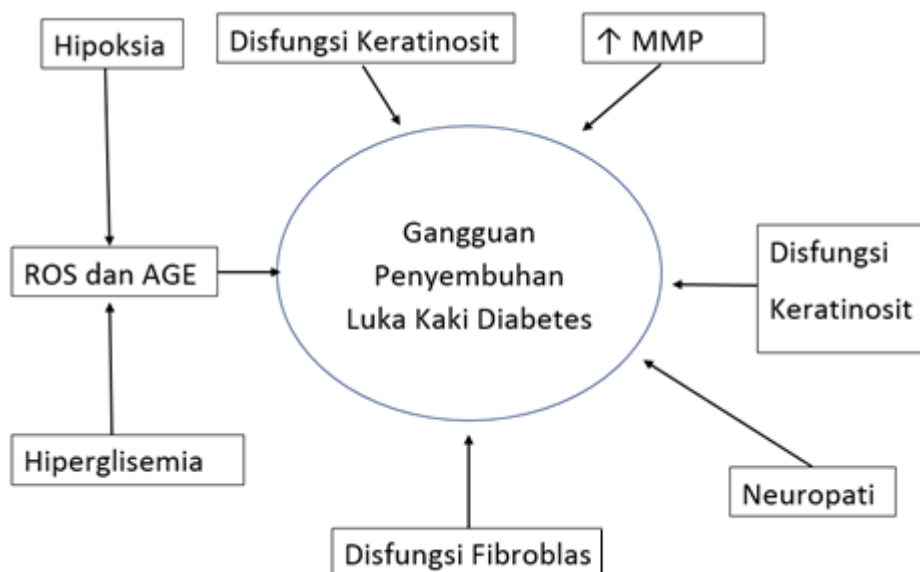
Faktor yang memengaruhi laju penyembuhan LKD adalah sirkulasi peredaran darah yang buruk, defisiensi sistem kekebalan tubuh dan gangguan angiogenesis.³⁷

Sirkulasi darah yang buruk dipengaruhi oleh kendali glukosa darah. Hiperglikemia menyebabkan kesulitan penyembuhan luka karena peningkatan glukosa darah mengakibatkan dinding sel menjadi kaku dan aliran darah ke kapiler permukaan luka terganggu sehingga menghambat aliran darah yang dibutuhkan untuk pengembangan jaringan dermal. Hiperglikemia juga menurunkan fungsi eritrosit dan memengaruhi pelepasan oksigen sehingga perfusi oksigen dan nutrisi untuk penyembuhan luka menurun. Kondisi tersebut diperberat oleh penyempitan pembuluh darah yang menurunkan aliran darah dan oksigen sehingga penyembuhan luka menjadi lebih lambat dan kurang efektif.

Selain memengaruhi sirkulasi darah keadaan hiperglisemia juga memengaruhi sistem kekebalan tubuh karena pengaruhnya terhadap leukosit sehingga menurunkan efisiensi sistem imunitas dan rentan terhadap infeksi yang akan memperlambat proses penyembuhan luka, berisiko sepsis atau gangren dan amputasi. Hiperglikemia juga memengaruhi angiogenesis dengan menurunkan produksi VEGF sehingga angiogenesis menurun. Dengan menurunnya proses angiogenesis proses pembentukan jaringan granulasi terhambat yang berakibat terhambatnya perbaikan penyembuhan luka.

Pengaruh hiperglikemia terhadap disfungsi fibroblas menyebabkan proliferasi fibroblas terhambat, sehingga fibroblas akan menurun fungsinya sehingga penyembuhan luka akan terhambat. Di samping itu juga berpengaruh terhadap disfungsi keratinosit yang akan berpengaruh terhadap produksi jaringan kolagen. Hiperglikemia akan menghambat maturasi sel keratinosit

Selain itu, hiperglikemia akan memperpanjang fase inflamasi. Hal ini ditunjukkan dengan pemanjangan fase inflamasi. Faktor lain yang memperpanjang inflamasi dan menghambat penyembuhan adalah peningkatan kadar MMP yang berhubungan dengan adanya pemanjangan fase inflamasi. Pada keadaan inflamasi kronik, *enzym protease* seperti MMP-9 akan meningkat. Inflamasi kronik ini akan menghambat penyembuhan luka karena *growth factor* dan angiogenesis akan terhambat kerjanya. Beberapa *growth factor* akan didegradasi oleh *enzym protease* sehingga kerjanya tidak akan optimal dalam penyembuhan luka. (Gambar 2.12.).



Gambar 2.12. Faktor yang Berpengaruh pada Penyembuhan LKD³⁷

2.4.1 Gangguan Mikrovaskular pada DM

Penyebab gangguan mikrovaskular adalah DM karena hiperglikemia jangka panjang menyebabkan sel endotel pembuluh darah mengambil lebih banyak glukosa sehingga membran basal dinding pembuluh darah lebih tebal dan lemah. Kondisi tersebut menyebabkan kebocoran kapiler yang mengakibatkan merembesnya eritrosit dan protein serta memperlambat aliran darah. Akibatnya, jaringan tidak mendapat cukup darah dan rusak, misalnya retina (retinopati diabetik), ginjal (nefropati diabetik) dan distal kaki (penyakit pembuluh darah perifer). Saraf dan neuron yang tidak cukup dipasok darah menjadi rusak yang menyebabkan neuropati diabetik terutama neuropati perifer.⁶⁴

2.4.2 Gangguan Angiogenesis pada LKD

Tingkat dan aktivitas VEGF yang tidak normal serta keadaan hipoksia menyebabkan penyembuhan LKD terganggu, karena LKD terletak di ekstremitas yang mengalami iskemia. Karena respons angiogenesis tidak tepat, maka fase penyembuhan luka (proliferasi sel dan deposisi matriks) menjadi terhambat. Pada LKD kronik terjadi hipoksia jaringan yang jika terus meningkat, akan terjadi kegagalan penyembuhan luka. Pada angiogenesis terjadi neovaskularisasi akibat hipoksia atau rangsangan lainnya. Angiogenesis melibatkan interaksi mediator pro

dan anti-angiogenik, *growth factor* sitokin, endotel, dan matriks ekstraselular (ECM). Angiogenesis meliputi degradasi ECM, proliferasi dan migrasi sel endotel, perubahan morfologi dan anastomosis sel endotel. Angiogenesis normal bergantung pada keseimbangan faktor angiogenik (VEGF, FGF-2, TGF- β , angiopoietin) dan angiostatik (angiostatin, endostatin, trombospondins). Pada LKD terjadi ketidakseimbangan faktor angiogenik dan angiostatik dengan fungsi angiostatik lebih dominan yang menyebabkan gangguan penyembuhan LKD.²⁶

2.4.3 Perubahan Struktural Mikrovaskular pada LKD

Gangguan mikrosirkulasi pada DM dapat berkontribusi pada komplikasi sekunder pada ekstremitas seperti infeksi kaki dan ulserasi. Perubahan mikrosirkulasi berupa gangguan kemampuan mikrovaskulatur menjadi vasodilatasi sebagai respons terhadap cedera. Disfungsi sel endotel vaskular dan sel otot polos pembuluh darah berkontribusi pada penurunan vasodilatasi akibat disfungsi sel endotel pada penyandang DM.

Pada DM terjadi gangguan mikrovaskular yang ditandai dengan penebalan membran, berkurangnya elastisitas kapiler, mengecilnya ukuran arterioler karena fungsi vasodilatasi terganggu akibat disfungsi endotel. Perubahan struktur mikrovaskular mengganggu transportasi nutrisi dan oksigenasi pada proses penyembuhan luka. Untuk mengukur sirkulasi perifer dapat digunakan *ankle brachial index* (ABI), *toe brachial index* (TBI), *transcutaneous pressure oksigen* (T_{cpO₂}). Alat tersebut bersifat non-invasif dan dapat mengukur sirkulasi perifer dengan tepat.²⁶

2.4.4 Perubahan Viskositas Darah pada Mikroangiopati DM

Mikroangiopati DM adalah kondisi kronik akibat gangguan metabolisme karbohidrat. Gangguan vaskular lokal adalah campuran perubahan mikrosirkulasi umum pada DM dan perubahan vaskular spesifik di setiap jaringan. Perubahan viskositas protein plasma dan pengaruhnya terhadap aliran darah berperan dalam mempercepat laju aliran darah. Viskositas darah dipengaruhi oleh berbagai faktor, di antaranya protein plasma yang merupakan komponen utama darah. Peningkatan agregasi trombosit yang disebabkan fibrinogen dan imunoglobulin pada kondisi

patologis dapat meningkatkan viskositas darah. Aliran darah melalui mikrovaskulatur terganggu ketika viskositas meningkat, menyebabkan iskemia jaringan dan sindrom hiperviskositas.⁶⁵

2.5 Inflamasi Kronik pada Luka LKD

Pada penyandang DM terjadi gangguan metabolisme terkait hiperglikemia yang secara langsung mengganggu penyembuhan luka. Keadaan hiperglikemia tersebut menyebabkan akumulasi sistemik produk akhir glikasi lanjut (AGEs) yang menginduksi stres oksidatif, merusak fungsi sel kulit, inflamasi kronik, meningkatkan kekakuan ECM dan disfungsi sirkulasi mikro dan makro yang menyebabkan perfusi oksigen buruk⁶⁶

Pada LKD yang sulit sembuh terdapat peningkatan TNF- α , protein kemoatraktan monosit-1, MMP-9, dan FGF-2 di serum jika dibandingkan luka normal. Peningkatan infiltrasi sel imun, ekspresi MMP-9, dan protein *tyrosine phosphatase-1B* (PTP1B) secara negatif mengatur pensinyalan insulin, leptin, dan faktor pertumbuhan. Peningkatan inflamasi, ekspresi MMP-9, PTP1B, dan kadar *growth factor* yang terganggu adalah faktor utama terkait kegagalan penyembuhan LKD.⁶⁷

2.5.1 Peran Sitokin dan Interleukin pada Penyembuhan LKD

Sitokin adalah molekul protein yang diproduksi sel imun untuk memengaruhi sel-sel lain. Sitokin berupa polipeptida atau glikoprotein yang terlibat dalam pensinyalan sel. Terdapat empat tipe sitokin yaitu interleukin, interferon, kemokin, dan TNF.⁶⁶ Interleukin adalah sekelompok sitokin yang pertama kali diekspresikan oleh leukosit yang terutama terlibat pada proliferasi, diferensiasi, dan pematangan sel imun. Aksi interleukin dapat berupa autokrin atau parakrin. Berbagai jenis interleukin dapat ditemukan di dalam tubuh dan diberi nama IL-1 hingga IL-40.⁶⁷ Interleukin-6 adalah sitokin pro-inflamasi regulator utama yang diproduksi oleh berbagai sel terutama leukosit, adiposit, dan sel endotel; bekerja di hati untuk merangsang produksi protein fase akut. Level IL-6 yang beredar akan meningkat pada DM tipe 2 dan berkorelasi dengan resistensi insulin langsung dan tidak langsung. Sitokin IL-6 menghambat sekresi insulin dari sel β pancreas. Kadar glukosa dan kronisitas luka berkorelasi kuat dengan peningkatan ekspresi IL-6 pada penyandang LKD.

Peningkatan glukosa darah dan LKD memiliki korelasi kuat dengan peningkatan IL-6 yang mengganggu infiltrasi makrofag dan menghambat penyembuhan luka. Gangguan penyembuhan luka pada penyandang DM dikaitkan dengan keterlambatan sel imun, migrasi dan aktivasi makrofag. Proses tersebut diatur oleh lingkungan sitokin yang ditunjukkan dengan peningkatan sitokin pro-inflamasi dan penurunan sitokin anti-inflamasi.⁶⁷

2.6 Metode Pengukuran Luas Luka

Penilaian penyembuhan luka seringkali dilakukan untuk melihat perkembangan penyembuhan luka dengan mengukur perubahan luas luka. Metode yang dapat digunakan untuk pengukuran luka dapat dengan pengukuran sederhana, metode penelusuran luka, pengukuran metode kordic atau foto berkala

Metode sederhana dan termurah untuk pengukuran luas luka adalah dengan menghitung luas permukaan luka dengan mengukur dimensi linier menggunakan meteran atau penggaris. Metode dua dimensi ini mengasumsikan bahwa luka memiliki bentuk permukaan geometris, misalnya persegi panjang (panjang x lebar), lingkaran (diameter x diameter) atau oval (diameter maksimum x diameter maksimum tegak lurus terhadap pengukuran pertama). Metode alternatif lain dengan menghitung luas permukaan luka didasarkan pada rumus untuk elips (panjang x lebar x 0,785).^{57,58}

Untuk meningkatkan akurasi pengukuran luas luka dapat menggunakan metode grid. Metode grid dilakukan dengan cara menelusuri tepi luka menggunakan spidol pada kertas mika transparan steril. Setelah itu kertas mika transparan diletakkan pada skala grid (1 kotak = 1x1 cm) dan dilakukan penghitungan jumlah kotak. Pada pengukuran metode grid ini untuk menentukan jumlah kotak pada tepi luka ditentukan bila tepi luka memenuhi lebih atau sama dengan separuh dari 1 kotak, maka diberikan nilai 1, tetapi bila kurang dari separuh kotak, maka diberikan nilai nol. Luas area luka (cm²) didapatkan dari jumlah kotak yang didapatkan x 1 cm².

Selain menggunakan plastik transparan, luas luka diukur menggunakan *plester grid*, yaitu plester transparan yang memiliki skala kotak-kotak berukuran 1 x 1 cm; merupakan pengukuran dua dimensi. Plester transparan ditempel di luka, kemudian jumlah kotak dihitung dan bila tergambar separuh kotak dilakukan pembulatan ke

atas (dihitung 1 kotak), sebaliknya bila jumlah kotak terisi kurang dari separuh dianggap nol (Gambar 2.13.).⁶⁸



Gambar 2.13. Metode Pengukuran Luas Luka dengan metode Grid⁶⁸

Keterbatasan metode grid adalah pengukuran secara subyektif dan dipengaruhi keandalan dan akurasi teknik menelusuri tepi luka.⁵⁸

Pengembangan metode grid adalah metode planimetrics. Metode ini mengukur luas dengan membuat gambar dua dimensi atau planar dari foto atau penelusuran luka. Selebar kertas Gambar transparan diletakkan di atas foto atau penelusuran luka secara manual atau menggunakan komputer. Jumlah kotak dalam batas luka dihitung menggunakan komputer kemudian dimasukkan ke sistem pemrosesan data.^{57,59}

Pengukuran luas LKD dengan foto berskala dengan skala pengukuran di tepi foto. Untuk menghitung panjang dan lebar, digunakan penggaris yang diekspresikan dalam pengukuran sederhana. Foto berskala berguna untuk perbandingan tetapi berpotensi kesalahan pembesaran.⁵⁷

2.6.1 Penghitungan Luas Luka Secara Digital

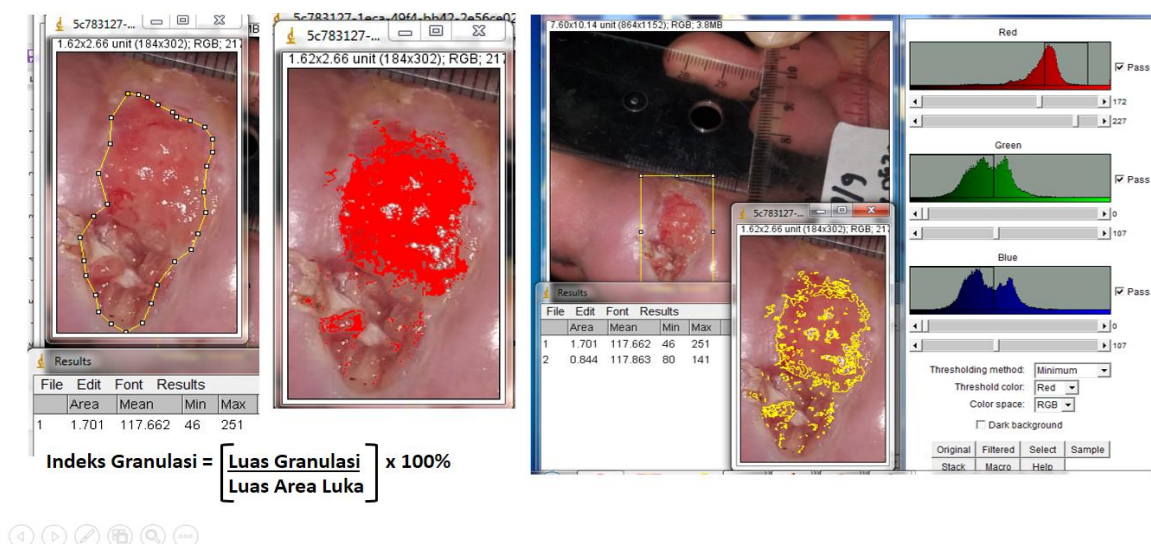
Metode lain untuk pengukuran luas luka secara digital adalah dengan menggunakan metode Kordic. Metode ini merupakan pengukuran tiga dimensi yang digunakan untuk menghitung luas luka dan volume yang dikembangkan oleh Savo Kordic dengan menggunakan software pengukuran luka dengan program visual basic .net.

Untuk menghindari kesalahan pembesaran, telah banyak digunakan program ImageJ. Dengan program ImageJ, selain luas area luka, bisa juga menggunakan luas jaringan granulasi. Petanda penyembuhan luka adalah terbentuknya jaringan granulasi. Luka difoto digital dan diolah dengan program Image-J. Pada program Image-J dapat dibedakan jaringan sehat (warna merah) dan jaringan kurang sehat (warna biru). Proporsi warna merah dibandingkan warna biru menjadi petanda penyembuhan luka. Image-J adalah domain publik berbasis Java program pengolah gambar yang dikembangkan di National Institutes of Health. Program ini dapat memecahkan masalah pengolahan dan analisis gambar sehingga banyak digunakan di berbagai bidang seperti astronomi, biologi, fisika dan lain-lain. Adapun cara menghitung luas permukaan luka dan luas jaringan granulasi menggunakan Image-J sebagai berikut.³³ Langkah pertama adalah memilih foto yang akan dihitung luasnya, kemudian dimasukkan ke program Image-J. Langkah kedua adalah penentuan skala, yaitu membuat garis lurus menggunakan tools “straight line” di atas penggaris yang sudah ada pada foto, sepanjang 1 cm, kemudian klik analyze → klik “set scale” → ketik 1.00 pada kolom “known distance” → ketik “centimeter” pada kolom “unit of length”. Langkah ketiga adalah mengukur luas luka dengan memilih tools “polygon selections” lalu klik *mouse* pada setiap titik mengelilingi tepi luka yang dikehendaki sampai bertemu kembali pada titik awal. Tepi luka adalah batas diskontinuitas kulit sehat dan luka. Setelah itu klik “analyze” → klik “measure” akan terlihat tampilan yang menunjukkan luas luka dalam cm^2 hingga dua desimal di belakang koma. Luas luka dicatat dan dimasukkan dalam *database*.

Pengukuran luas granulasi dengan menggunakan foto yang sama dengan foto pada pengukuran luas luka, yang dilanjutkan dengan membuat sebuah garis bantu di tengah luka menggunakan “arrow tools” sepanjang 1 cm sebagai skala pada penentuan luas granulasi. Dilakukan penentuan area luka total seperti cara di atas. Setelah itu klik “edit” → klik “cut” → klik “file” → klik “new” → klik “internal clipboard”. Kemudian didapatkan file gambar baru berupa potongan area luka. Pada file baru ini, lakukan penentuan skala menggunakan garis bantu yang telah dibuat → klik “analyze” → klik set “set scale” → ketik pada kolom “known distance” dengan 1.00 → ketik “centimeter” pada kolom “unit of length”. Sebelumnya, penentuan area granulasi sudah dilakukan melalui observasi visual. Area granulasi

merupakan gambaran permukaan luka yang berwarna merah terang dan tidak rata seperti buah strawberi (“*strawberry like appearance*”). Langkah berikutnya adalah pengukuran luas granulasi tersebut dengan cara klik “*image*” → klik “*adjust*” → klik “*color threshold*” → klik “*RGB*” pada kolom “*color space*” → atur kombinasi intensitas antara warna merah, hijau dan biru sehingga didapatkan area yang sesuai dengan observasi visual. Kemudian klik “*analyze*” → klik “*measure*”, sehingga akan terlihat tampilan yang menunjukkan luas area granulasi. Hasil luas area granulasi kemudian dicatat di dalam *database*. (Gambar 2.14.).⁶⁹

Analisa Luas Area Luka dengan Image J



Gambar 2.14. Metode Pengukuran Indeks Granulasi

2.7 Terapi LKD

Pengelolaan holistik LKD meliputi *metabolic control*, *wound*, *microbiological*, *infection*, *vascular*, *mechanical*, *pressure* dan *education control*.

Metabolic control dilakukan dengan mengontrol efek hiperglikemia terhadap penyembuhan luka. Terapi LKD dengan *wound control* meliputi debridemen dan nekrotomi, pembalutan, obat untuk mempercepat penyembuhan dan jika perlu dengan operasi. Indikasi operasi adalah jika didapat jaringan nekrosis yang makin luas.

Pada *infection control* diperlukan antibiotik adekuat sesuai kultur pus namun terkadang diperlukan terapi empirik sesuai mikroorganismen anaerob/aerob.

Perawatan terdiri atas debridemen, balutan, pengelolaan penyakit arteri perifer dan antibiotik terutama untuk melawan *P. aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* dan strain anaerob), serta revaskularisasi arteri. Lama penggunaan antibiotik bergantung keparahan infeksi dan ada tidaknya infeksi tulang dapat berkisar 1–6 minggu atau lebih. Antibiotik hanya digunakan jika ada bukti infeksi dan berlanjut sampai ada bukti infeksi telah sembuh.

Pada *vascular control* dilakukan pemeriksaan kondisi pembuluh darah meliputi ABI, TcPO₂, *toe pressure* (tekanan > 30 mmHg) dan angiografi. *Pressure control* dilakukan dengan menghindari beban tekanan di daerah luka menggunakan bantal di kaki saat berbaring untuk mencegah lecet di tumit dan kasur dekubitus. *Nonweight bearing* menggunakan *crutches*, kursi roda, dan tongkat. Pada *education control* diberikan penjelasan kepada penyandang dan keluarga tentang penyakitnya, rencana tindakan diagnostik dan terapi, risiko yang akan dialami dan prognosis.

Untuk menangani LKD perlu ditinjau mengapa penyembuhan luka lambat pada penyandang DM. Faktor-faktor yang dapat memengaruhi penyembuhan LKD adalah (1) Sirkulasi yang buruk karena DM mempunyai risiko dua kali lebih besar mengalami penyakit pembuluh darah perifer. Penyakit vaskular perifer menyebabkan pembuluh darah menyempit yang mengurangi aliran darah ke anggota badan. Kondisi tersebut memengaruhi kemampuan eritrosit untuk melewati pembuluh dengan mudah. Kadar glukosa darah yang lebih tinggi dari normal meningkatkan ketebalan eritrosit yang memengaruhi aliran darah menghambat suplai nutrisi dan oksigenasi jaringan serta menurunkan sistem kekebalan. (2) Kekurangan sistem kekebalan tubuh. Pada DM terjadi masalah aktivasi sistem kekebalan. Jika sistem kekebalan tidak berfungsi dengan baik, penyembuhan luka lebih lambat dan risiko infeksi lebih tinggi. Kadar glukosa darah yang tinggi meningkatkan risiko infeksi karena bakteri berkembang lebih cepat di aliran darah. Hiperglikemia menyebabkan sel imun tidak dapat melawan bakteri sehingga infeksi dapat mengakibatkan gangren atau sepsis dan amputasi. (3) Neuropati perifer terjadi karena glukosa darah yang secara konsisten lebih tinggi dari normal. Seiring waktu, kerusakan terjadi pada saraf dan pembuluh darah yang dapat menyebabkan daerah yang terkena kehilangan sensasi. Neuropati umumnya di tangan dan kaki.

Pada neuropati, penyandang tidak dapat merasakan luka yang merupakan alasan utama mengapa LKD cenderung lebih sering. Untuk mengobati LKD harus ditinjau dari infeksi, perfusi jaringan atau perdarahan dan kontrol glukosa darah. Pada luka di perifer perlu ditinjau faktor neuropati perifer yang memengaruhi penyembuhan luka.⁷⁰

Meskipun banyak kemajuan telah dicapai, masih banyak kekurangan terapi topikal LKD yang memerlukan perbaikan dan pengaturan klinis kaki multidisiplin untuk mengurangi angka amputasi. Modalitas terapeutik yang ditetapkan (revaskularisasi dan debridemen) tetap menjadi andalan manajemen.⁶⁸

2.7.1 Terapi Topikal LKD

Terapi topikal LKD standar adalah dengan kompres NaCl 0,9% yang merupakan cairan isotonis fisiologis nontoksik dan tidak menimbulkan hipersensitivitas. NaCl juga melindungi granulasi jaringan dari kondisi kering dengan menjaga kelembapan luka. Selain itu NaCl memiliki respons anti inflamasi dengan menurunkan gejala nyeri dan eritema di luka, serta meningkatkan aliran darah menuju area luka. NaCl sebagai anti inflamasi dapat menurunkan edema dengan menarik cairan dari luka melalui proses osmosis⁷¹ Kompres NaCl kurang efektif untuk mencegah timbulnya jaringan nekrotik, sedangkan keberadaan jaringan nekrotik pada ulkus menjadi tempat bersembunyi koloni bakteri dan menghambat proses granulasi jaringan sehingga proses penyembuhan luka ulkus diabetikum menjadi berkepanjangan.⁶⁸

Selain menggunakan NaCl, *dressing* juga sering digunakan untuk mengobati LKD seperti *dressing absorben*, hidrogel, *alginate*, *silver* dan *hydrocolloids*. *Dressing* biologis aktif yang menggabungkan sifat hidrogel dan hidrokoloid telah tersedia. Saat ini berkembang penggunaan *dressing* menggunakan *growth factor* lokal, namun harganya mahal. Pengobatan topikal lainnya adalah pengganti kulit yang diolah secara biologis (seperti Dermagraft, Apligraf, HYAFF, OASIS dan Graftjacket), protein matriks ekstraselular (seperti Hyalofill dan E-matrix), serta berbagai terapi lainnya.

Terapi topikal LKD dengan *growth factor* memengaruhi semua fase penyembuhan luka dan dapat digunakan untuk penyembuhan LKD. Berbagai penelitian telah

mengidentifikasi berkurangnya *growth factor* spesifik pada proses penyembuhan luka melalui analisis cairan luka. Pada tahun 1987, Cromack melaporkan TGF- β meningkat pada awalnya kemudian menurun secara bertahap dengan penutupan luka. Di luka kronik jumlah PDGF, *basic FGF/FGF-2*), EGF, dan TGF- β berkurang dibandingkan luka akut. Meskipun kadar *growth factor* menurun, proteinase meningkat di luka kronik yang berpotensi menunda penyembuhan luka. Meskipun menjanjikan, terapi dengan *growth factor* harus dinilai keefektifannya pada ulkus LKD yang sulit sembuh. Bahan terapi topikal dapat diperoleh dari tubuh penyandang misalnya PRF atau PRP.⁷²

2.8 Peran Platelet-Rich Plasma (PRP) dan Platelet-Rich Fibrin (PRF) pada Penyembuhan LKD

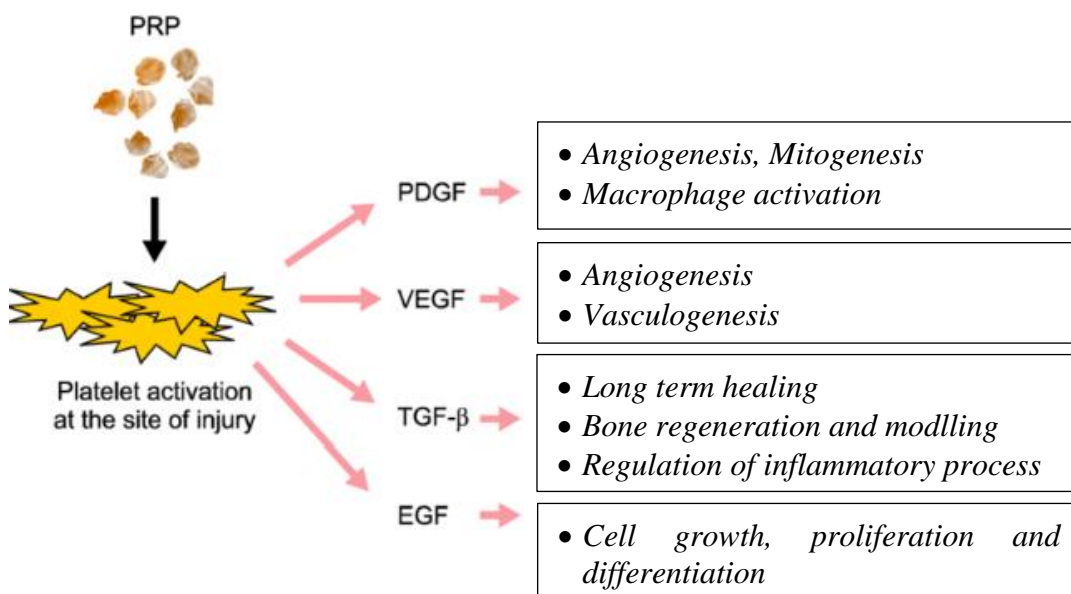
Pada dekade terakhir, telah dilakukan penelitian peran trombosit dalam penyembuhan luka. Trombosit berperan terutama pada fase inflamasi dan fase proliferasi. Pada awal penyembuhan, proses inflamasi sangat diperlukan untuk memulai fase proliferasi. Trombosit memainkan peran penting dalam melepaskan mediator inflamasi yang terlibat dalam perkembangan plak dan disfungsi endotel. Fungsi trombosit selain menilai tingkat penanda inflamasi, juga berfungsi penyedia *growth factor* yang berperan pada fase proliferasi. Adapun bentukan konsentrat trombosit yang lagi dikembangkan adalah bentukan Plasma darah kaya trombosit atau *platelet-rich plasma* (PRP) dan Fibrin kaya trombosit atau *platelet-rich fibrin* (PRF)

2.8.1 Platelet Rich Plasma

Plasma darah kaya trombosit atau *platelet-rich plasma* (PRP) adalah plasma yang diperkaya dengan trombosit untuk merangsang penyembuhan tulang dan jaringan lunak. Terapi plasma darah kaya trombosit menggunakan darah autologus. Trombosit adalah bagian dari darah yang berperan dalam mekanisme pembekuan darah; dengan menambahkan konsentrasi trombosit lebih dari biasanya diharapkan proses penyembuhan akan lebih cepat. Dalam PRP, kandungan trombosit mencapai 5–10 kali lipat dari konsentrasi normal. Begitu pula dengan konsentrasi faktor pertumbuhan.

Proses pengobatan dengan PRP meliputi pengambilan darah, pengelolaan darah menjadi PRP, dan aplikasi sediaan PRP. Dua minggu sebelum prosedur, penyandang diminta untuk tidak mengonsumsi obat anti radang seperti aspirin atau ibuprofen. Selanjutnya darah penyandang diambil sebanyak 20–40 mL kemudian dimasukkan ke *centrifuge* untuk memisahkan komponen darah. Dari darah yang diproses tersebut diperoleh beberapa mL plasma darah yang kaya trombosit.

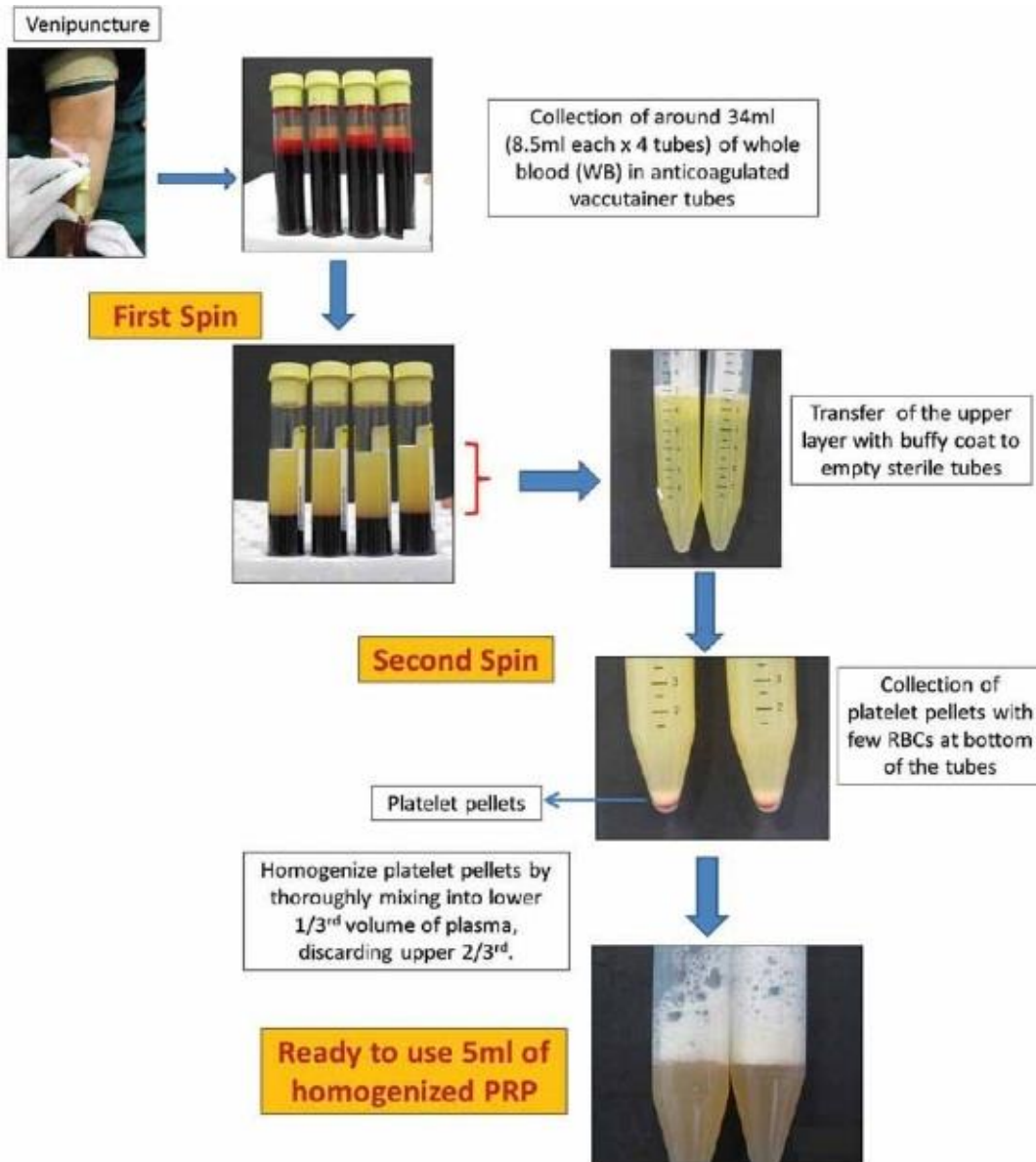
Terapi LKD merupakan tantangan karena sulit disembuhkan sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui manfaat terapi LKD menggunakan kombinasi APRF+AH untuk mempercepat penyembuhan LKD. Pada akhir dekade ini terbukti bahwa platelet mengandung beragam *growth factor* seperti PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF, FGF, IGF, CTGF dan lain-lain. PRP atau PRF mengandung banyak *growth factor* yang berpotensi pada penyembuhan luka. (Gambar 2.15.)



Gambar 2.15. Growth Factor dalam Platelet dari PRP⁷³

Granula- α dari platelet yang belum teraktivasi pada PRP mengandung *growth factor* di sediaan yang bersifat non-fungsional karena belum berinteraksi dengan jaringan. Untuk memulai pelepasan *growth factor*, platelet harus diaktifkan dan trombin adalah aktivator platelet paling poten. Penggunaan trombin sapi untuk mengaktifasi pembekuan dan platelet menimbulkan komplikasi karena pembentukan antibodi terhadap trombin sapi dapat menyebabkan koagulopati.⁶¹

Kalsium klorida dapat dipertimbangkan untuk mengonversi protrombin autolog menjadi trombin yang menjebak platelet di matriks fibrin. Metode lain untuk mengaktivasi platelet ialah kolagen tipe I karena efektifitasnya setara trombin dalam menstimulasi PDGF dan VEGF.⁷⁴ (sesuai Gambar 2.16.)



Gambar 2.16. Prinsip dan Metode Pembuatan PRP⁷⁵

2.8.2 Platelet Rich Fibrin (PRF)

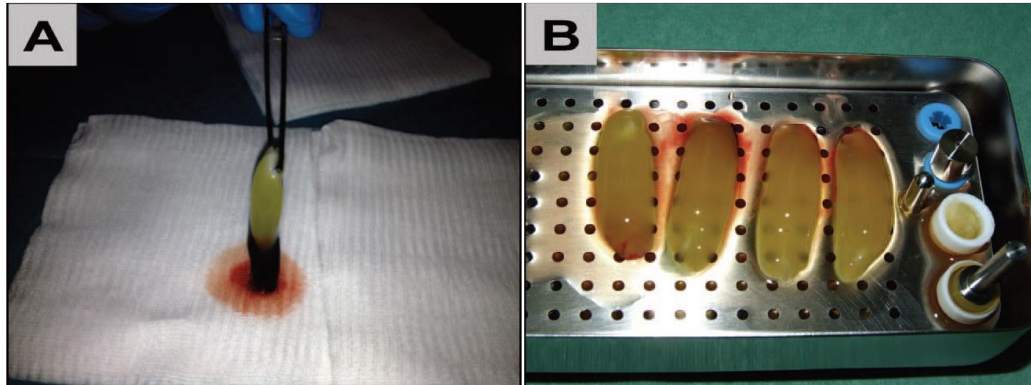
Platelet rich fibrin dikembangkan di Perancis oleh Choukroun *et al.*⁷⁶ pada tahun 2001 untuk meningkatkan penyembuhan tulang pada kasus implan. Stimulasi penyembuhan luka terjadi karena PRF melepaskan *growth factor* dan sitokin yang

tersimpan di matriks fibrin. Setelah diaktifkan, platelet melepaskan *growth factor* untuk menstimulasi jaringan baru.⁷⁷ Platelet mengandung faktor stimulasi angiogenesis yaitu bFGF, VEGF dan faktor angiostatik seperti endostatin dan trombospondin-1.⁷⁸

Platelet rich fibrin merupakan generasi ke-2 PRP dan lebih unggul dari PRP karena persiapannya lebih mudah dan tidak menggunakan trombin sapi sehingga mengurangi kemungkinan infeksi silang dan risiko koagulopati.⁷⁹ Struktur PRF yang lebih halus dan fleksibel menguntungkan untuk *cytokine enmeshment* dan selular serta membantu hemostasis di luka berdarah. Studi *invitro* menunjukkan bahwa PRF lebih unggul dari PRP karena ekspresi alkaline fosfatase dan induksi mineralisasi yang disebabkan pelepasan TGF- β 1 dan PDGF-AB.^{77,80}

2.8.2.1 Persiapan Pembuatan PRF

Teknik pembuatan PRF diperkenalkan oleh Dr. Joseph Choukroun⁷⁰ dengan mengambil darah vena 27 mL kemudian dimasukkan dalam tiga tabung gelas kering masing-masing 9 mL (*blood collecting tubes*®, Process, Nice, France) tanpa antikoagulan. Tabung segera disentrifugasi dengan kecepatan 708 G (2700 rpm) selama 12 menit sehingga diperoleh gumpalan padat fibrin di bagian tengah tabung di antara lapisan eritrosit di bagian bawah dan lapisan plasma aselular di bagian atas. Lapisan tengah bekuan PRF diambil dengan pinset steril dan dipisahkan dari eritrosit menggunakan gunting kemudian dipindahkan ke cawan steril. Perbatasan PRF dengan lapisan eritrosit kaya akan *growth factor*.⁷³ Karena PRF tidak menggunakan antikoagulan, darah segera mengental setelah kontak dengan permukaan kaca. Membran PRF diperoleh dengan menekan keluar cairan dalam bekuan fibrin. Pengeluaran cairan dari fraksi PRF melalui tekanan mekanis dua lapis kasa menghasilkan gel fibrin cukup padat dan dapat digunakan pada berbagai aplikasi klinis. Membran PRF disiapkan dengan menjepit gumpalan PRF dengan *PRF Box* (Gambar 2.17.).



Gambar 2.17. Cara Pembuatan PRF dengan PRF box

Dari proses tersebut dihasilkan membran dengan ukuran konstan serta eksudat PRF yang mengandung *growth factor* (TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF dll.), matriks glikoprotein (fibronectin, vitronectin, dll.) dan protein khusus untuk penyembuhan LKD.

2.8.2.2 Peran PRF pada Penyembuhan Luka

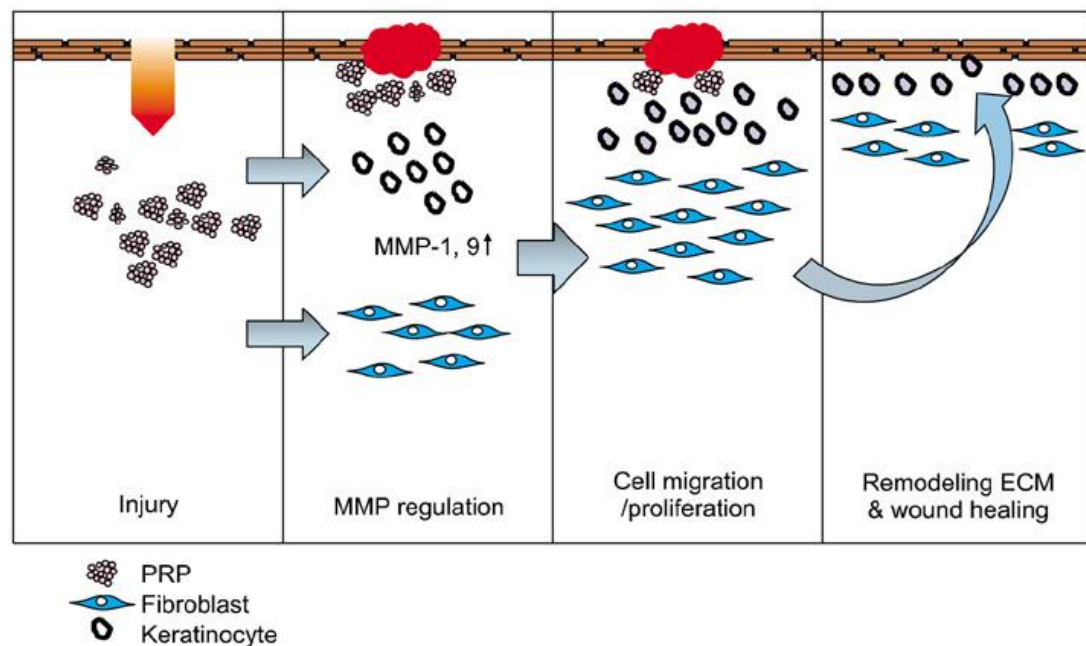
Terdapat tiga fase penyembuhan luka yaitu inflamasi (1–4 hari), proliferasi (2–22) hari dan maturasi (6–12 bulan). Pada fase inflamasi terjadi peradangan dan pada fase proliferasi terjadi pembentukan kolagen, epitelisasi, angiogenesis, jaringan granulasi, deposisi kolagen. Pada fase maturasi atau remodeling terjadi kematangan dan kontraksi kolagen.

Pada penyembuhan luka, PRF sangat berperan pada fase proliferasi melalui pelepasan *growth factor* secara terus menerus di lokasi luka serta menginduksi *viability*, proliferasi dan diferensiasi sel. Stimulasi PRF melepaskan *growth factor* TGF- β 1 dan PDGF-AA pada hari ke-5 penyembuhan luka.⁸¹ Peran lain PRF adalah meningkatkan proliferasi fibroblas, osteoblas, angiogenesis, dan menginduksi sintesis kolagen. Faktor fibrogenik endogen sangat berguna pada penyembuhan luka melalui mekanisme adhesi mekanis oleh fibrin. Mitogenesis sel endotel diinduksi oleh *protein kinase activation pathway* yang meregulasi sinyal ekstraselular.⁸² Stimulasi proliferasi fibroblas oleh PRF lebih tinggi dibandingkan rekombinan PDGF yang berfungsi sebagai lem fibrin.⁸³

Dhurat *et al.*¹⁷ meneliti L-PRF untuk penyembuhan LKD (n = 3) pada osteomielitis dan lesi kulit yang terinfeksi bakteri gram positif seperti *S. aureus* dan *S. viridans*;

gram negatif seperti *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter*; ragi seperti *Candida* selama enam bulan. Ketiga subjek itu menunjukkan penebalan *cortico-periosteal* dan atau osteolisis kortikal spons. Serum L-PRF dan supernatan dimasukkan ke lesi kulit dan tulang setelah debridemen dan hasilnya, lesi kulit pada ketiga subjek sembuh dari infeksi. Hasil awal ini menunjukkan bahwa L-PRF dapat menjadi cikal bakal metode baru pada terapi luka. Penggunaan L-PRF untuk terapi regeneratif lesi kronik seperti LKD dengan osteomielitis perlu diteliti lebih lanjut agar hasilnya dapat digeneralisasi.

Selain berperan pada percepatan penyembuhan luka melalui induksi faktor pertumbuhan, PRF juga berperan aktif dalam menginduksi proliferasi dan migrasi sel-sel kulit melalui peningkatan ekspresi MMP-1 dan MMP-9 (Gambar 2.18.).⁸⁴



Gambar 2.18. Mekanisme PRP pada Penyembuhan Luka⁸⁴

2.8.2.3 *Advanced Platelet Rich Fibrin*

Advanced platelet rich fibrin (A-PRF) pertama kali dijelaskan pada 2014 sebagai konsep baru untuk rekayasa jaringan berbasis sel dengan menurunkan rpm sambil meningkatkan waktu standar PRF. Untuk mendapatkan PRF, diambil darah vena tanpa menambahkan antikoagulan. Protokol untuk PRF standar (S-PRF) adalah menggunakan *centrifuge* 2700 rpm atau 360 G, selama 12 menit. Berbeda dengan

PRF standar, teknik pembuatan APRF menggunakan *low speed centrifuge* (1500 rpm atau 200G selama 8 menit) karena gaya sentrifugal (kecepatan dan waktu) memengaruhi distribusi sel *growth factor* yang sesuai untuk penyembuhan luka dan regenerasi jaringan.

Imunohistokimia untuk monosit, limfosit T dan B, granulosit neutrofilik, sel induk CD34-positif, terdeteksi di sekitar *buffy coat*. Penurunan rpm sambil meningkatkan waktu sentrifugasi A-PRF meningkatkan granulosit neutrofilik di bagian distal fibrin dan trombosit lebih banyak di dalam APRF dibandingkan PRF standar. Pada kelompok S-PRF, neutrofil banyak ditemukan di permukaan eritrosit. Granulosit neutrofilik berkontribusi pada diferensiasi monosit menjadi makrofag sehingga A-PRF mungkin memengaruhi regenerasi jaringan, terutama melalui monosit/makrofag dan *growth factor*.

2.8.2.4 Kandungan *Growth Factor* dan Sitokin Pro-Inflamasi dalam *Platelet Rich Fibrin* (PRF)

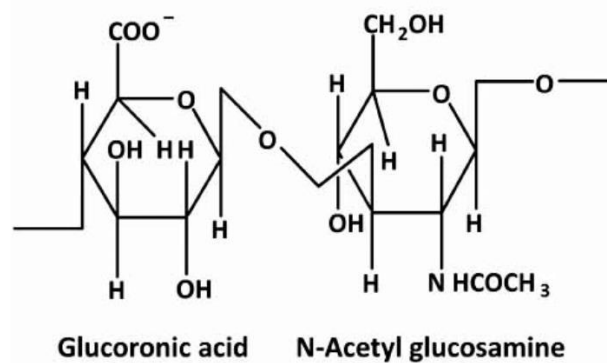
Platelet rich fibrin yang diberikan pada LKD akan meningkatkan *growth factor* dan sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan dari respons proliferasi dan fibroblas. Respons pro-inflamasi berupa IL-1, IL-6, IL-4, sedangkan *growth factor* dari PRF berupa TNF- α , FGF-2, TGF- β 1, PDGF-BB, VEGF Trombosit dan sitokin berperan penting dalam membentuk elemen penentu yang bertanggung jawab atas potensi terapi PRF. Sitokin segera digunakan dan dihancurkan di luka penyembuhan. Keseimbangan sitokin dan matriks fibrin dalam PRF sangat penting pada penyembuhan LKD. ⁸⁵

2.9 Peran Asam Hialuronat pada Penyembuhan Luka

Pada tahun 1934, Karl Meyer dan John Palmer mengisolasi glikoaminoglikan dari *vitreous humour* mata sapi sebagai AH. Asam hialuronat merupakan polisakarida dengan komponen matriks ekstraselular yang disintesis di membran plasma sel fibroblas yang mengaktifkan banyak mediator inflamasi dan *growth factor*. Asam hialuronat merekrut makrofag dan memodulasi respons inflamasi.

Asam hialuronat merupakan glikosaminoglikan alami komponen struktural kulit yang dapat diperoleh dari makanan atau suplemen dan didistribusikan secara luas

di seluruh jaringan ikat, saraf, dan epitel. Asam hialuronat berperan penting terutama untuk persendian dan kulit karena memiliki kapasitas lebih besar dalam mempertahankan kelembapan dibandingkan polimer alami. Keunggulan AH lainnya adalah memiliki sifat antioksidan dan mengurangi peradangan sehingga digunakan secara luas untuk mengobati osteoarthritis (OA).⁸⁶ Struktur. Asam hialuronat adalah polimer disakarida, yang terdiri dari asam D-glukuronat dan N-asetil-D-glukosamin, dihubungkan melalui ikatan glikosidik β . (Gambar 2.19.)



Gambar 2.19. Struktur Asam Hialuronat²³

Asam hialuronat menunjukkan sifat pensinyalan pleiotropik termasuk efek anti-inflamasi, antiapoptotik, dan antifibrotik pada hewan model serta memiliki sifat analgesik dengan aktivitas spesifik di reseptor opioid. Produk pelembab dan serum banyak mengandung asam hialuronat. Serum mengandung molekul lebih kecil dengan konsentrasi tinggi sehingga mampu menyerap hingga lapisan kulit yang lebih dalam dan memberikan hasil lebih optimal. Asam hialuronat menghambat enzim kolagenase yang merupakan enzim proteolisis kolagen⁸⁷

Asam hialuronat memengaruhi migrasi sel, adhesi sel dan angiogenesis. Fibroblas berperan utama pada penyembuhan luka dengan membentuk komponen matriks ekstraselular seperti kolagen, elastin dan proteoglikan. Fibroblas juga berperan penting pada migrasi keratinosit dari tepi luka untuk mencapai penutupan luka dan pembentukan kembali matriks yang menghasilkan kekuatan kontraksi maksimal penyembuhan luka.

Luka kronik melibatkan penuaan dini fibroblas, lebih dari 15% sel fibroblas menjadi tua sehingga ulkus menjadi sulit untuk sembuh. Fibroblas di luka kronik

mengalami penurunan kemampuan untuk memproduksi *growth factor* yang secara normal merangsang respons mitogenik. Penurunan respons terhadap bFGF, EGF dan PDGF-BB berhubungan dengan disfungsi pengiriman sinyal intraselular. Fibroblas tua mengalami penurunan kemampuan untuk berproliferasi dan tidak berespons terhadap stimulasi TGF- β 1 akibat penurunan ekspresi gen reseptor TGF- β 1. Jalur pengiriman sinyal TGF- β dipengaruhi oleh kekuatan mekanik dan merupakan bagian penting untuk fungsi fibroblas dermis. Pada fibroblas tua, berkurangnya sinyal yang diperantarai oleh TGF- β dan ekspresi CTGF/CCN2 berperan pada penurunan produksi kolagen.⁸⁸

Penambahan AH pada fibroblas tua dapat memperbaiki kekuatan mekanik dan mengembalikan fungsi fibroblas dalam proliferasi sel dan sintesis MES. Peningkatan kekuatan mekanik dan dukungan struktural pada MES menghasilkan perubahan morfologi fibroblas menjadi memanjang yang berhubungan dengan peningkatan jalur transmisi sinyal TGF- β dan berakhir pada target CTGF/CCN2 dan prokolagen tipe I. Stimulasi fibroblas diperantarai oleh ikatan langsung material AH terhadap reseptor selular. Penambahan AH monomer eksogen pada kultur fibroblas dapat merangsang pengiriman sinyal TGF- β dan produksi kolagen. Pemberian AH pada fibroblas tua di luka kronik dapat meningkatkan deposit kolagen dan migrasi sel akan sangat bermanfaat dalam mencari pilihan terapi untuk penyembuhan luka kronik.

2.10 Kombinasi AH dengan A-PRF untuk Mempercepat Granulasi LKD

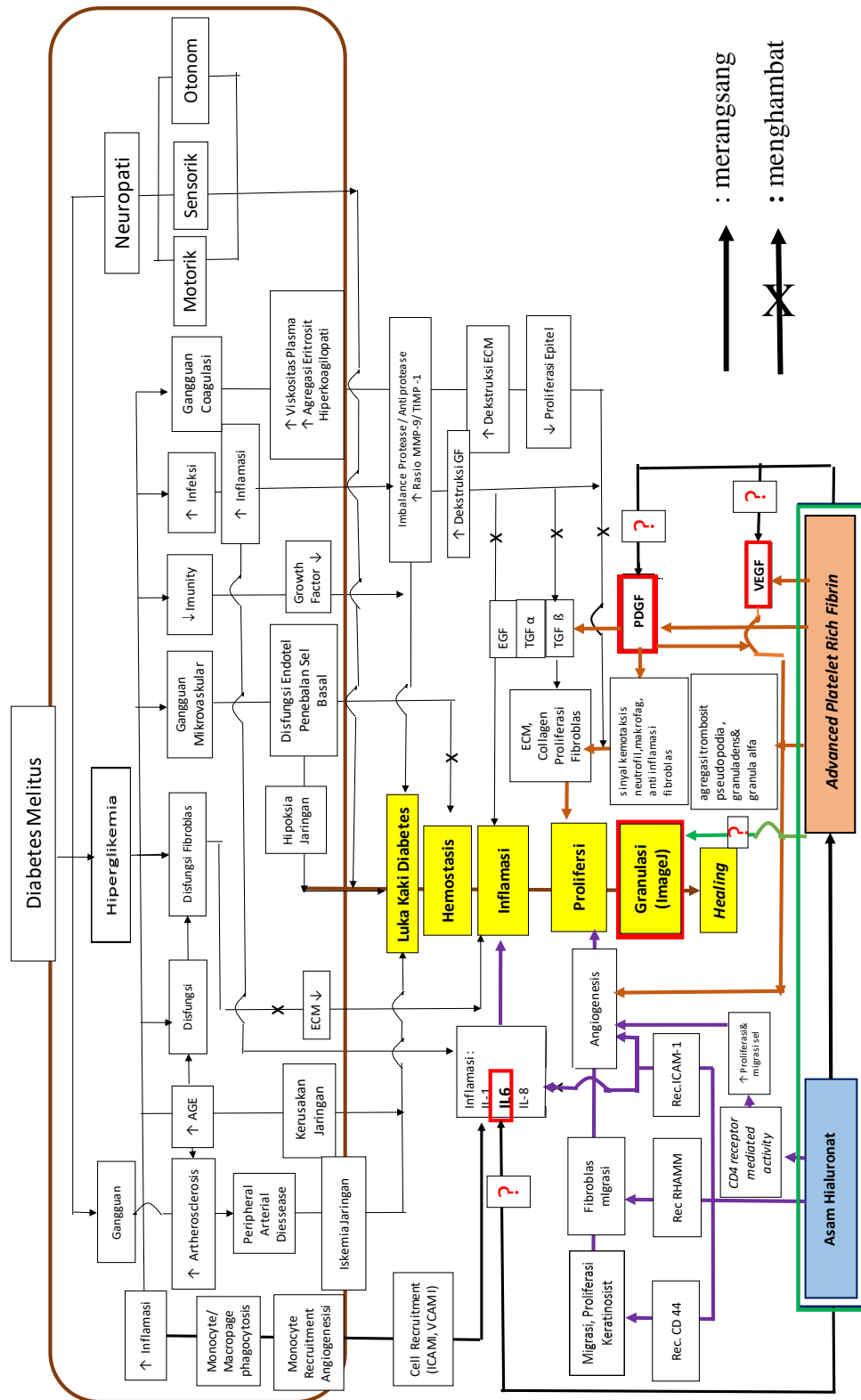
Kombinasi HA dan PRP mengurangi sitokin pro-inflamasi dan meningkatkan proliferasi kondrosit articular dan diferensiasi kondrogenik melalui jalur Erk1/2 HA-dependent dan jalur PRP-dependent Smad2/3. Aplikasi klinis kombinasi PRP dan AH lebih efektif dibandingkan PRP atau HA saja; keduanya merupakan pilihan terapeutik untuk osteoarthritis dan tendinopati kronik. Efek kombinasi PRP dan AH tidak sepenuhnya dipahami, diduga PRP menstimulasi proses penyembuhan jaringan baru dengan memproduksi *growth factor* dan sitokin yang dilepas platelet. Penambahan AH pada PRP dapat meningkatkan pelepasan *growth factor* pada hari ke-5.²²

Lio *et al.*²² melaporkan bahwa kombinasi AH dengan PRF menstimulasi *growth factor* seperti TGF- β , meningkatkan indeks proliferasi dan deposisi kolagen secara bermakna. AH juga berinteraksi dengan transformasi TGF- β 1 dari PRF sehingga melindungi *growth factor* dari degradasi triptik dan kolagen oleh enzim protease. Afat *et al.*⁸⁶ melaporkan kombinasi AH dengan L-PRF mengurangi edema setelah bedah mulut gigi molar 3 walaupun patomekanismenya belum jelas. Asam hialuronat memengaruhi tiga reseptor utama dalam modulasi regenerasi jaringan yaitu migrasi, proliferasi dan aktivasi sel keratinosit (CD44). Hal tersebut dilakukan untuk *restore epidermis*, migrasi fibroblas (RHAMM), kontrol inflamasi dan neoangiogenesis (ICAM-1), serta promosi deposit ECM seperti serat kolagen yang berkontribusi pada penyembuhan luka.⁹⁰

Penyembuhan luka dimulai dan dikembangkan oleh proses integrasi kompleks peristiwa selular, fisiologis, dan biokimia, seperti peradangan, migrasi sel dan proliferasi. Interleukin-6 adalah sitokin multifungsi dan dapat mengatur respons peradangan dari proses penyembuhan luka secara tepat waktu. Asam hialuronat adalah komponen penting ECM dan memberikan kontribusi bermakna terhadap proliferasi sel dan migrasi. Kombinasi PRF dan AH memberikan efek sinergis pada migrasi sel penyembuhan luka dengan aktivasi ERK (Extracellular signal-regulated kinase) dan MAPK (Mitogen-activated protein kinase) yang akan promosi penyembuhan luka dengan meningkatkan migrasi dari keratinosit.

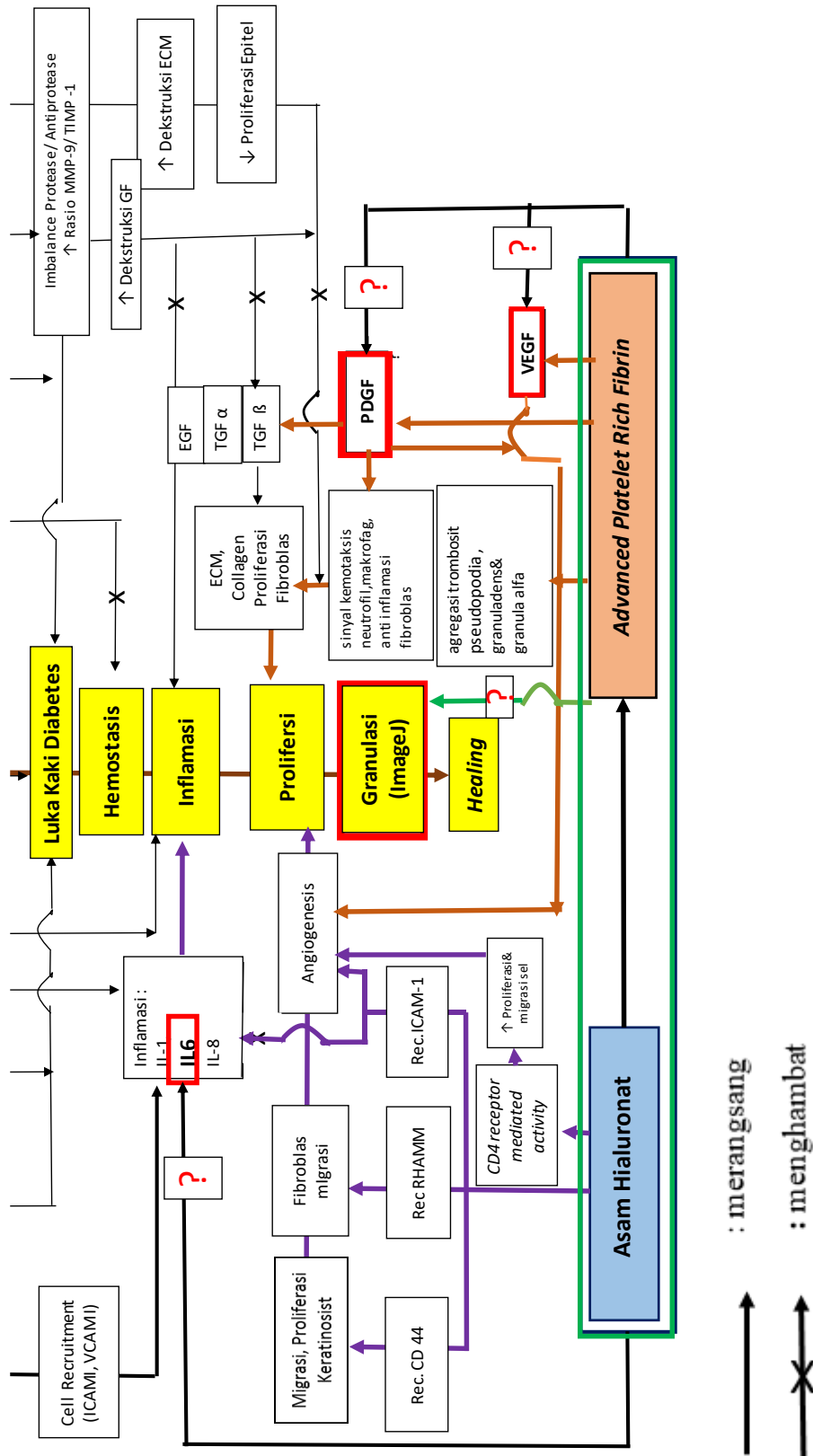
Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengonfirmasi efek sinergis AH dan PRF pada terapi kombinasi APRF-AH dalam stimulasi penyembuhan luka.⁹¹

2.11 Kerangka Teori



Gambar 2.20. Kerangka Teori Faktor yang Memengaruhi Penyembuhan LKD

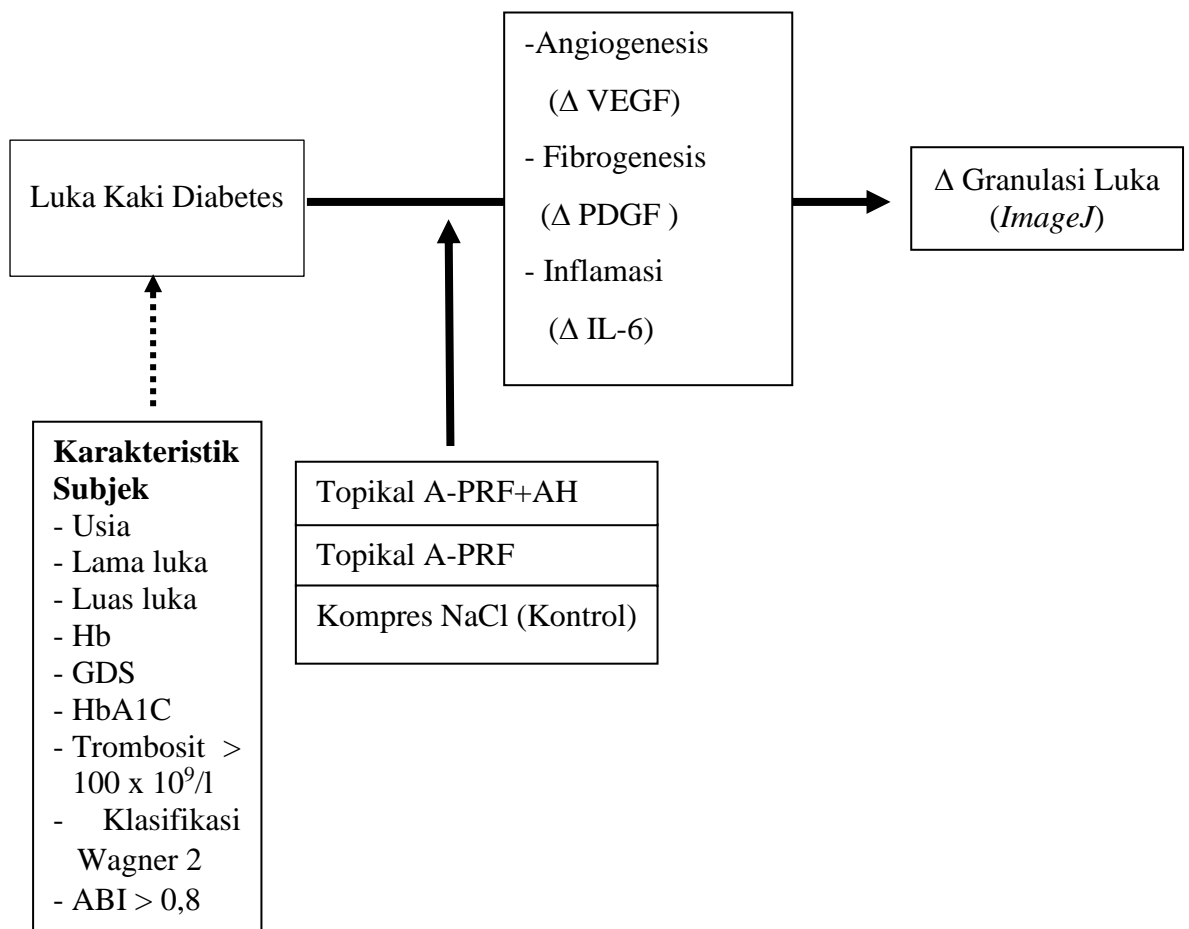
Kerangka Teori (Lanjutan)



Penjelasan Kerangka Teori

Diabetes Melitus adalah keadaan hiperglisemia yang menyebabkan beberapa gangguan keseimbangan tubuh antara lain peningkatan inflamasi, *atherosclerosis*, peningkatan AGE, disfungsi fibroblas dan penurunan *growth factor* serta imunitas tubuh.⁵³ Pada penyandang DMT2 memiliki resiko terjadinya LKD yang disebabkan oleh gangguan neuropati motorik dan sensoris, penurunan aliran darah yang disebabkan oleh penyakit oklusi pembuluh darah perifer dan peningkatan kekentalan pembuluh darah serta infeksi. Durasi fase penyembuhan luka pada LKD agak berbeda dengan luka akut. Adapun fase penyembuhan luka normal melalui fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi/granulasi).³⁶ Hambatan penyembuhan LKD karena tidak terkontrol glukosa darah pada penyandang DMT2 sehingga terjadi peningkatan inflamasi, dan penurunan *growth factor*.¹⁵⁵ Disamping itu juga terjadi disfungsi dari fibroblas yang menyebabkan gangguan pembentukan jaringan epitel pada penutupan luka.¹⁵⁹ Pemakaian bahan topikal yang mengandung *growth factor* mulai dikembangkan antara lain menggunakan *Advance Platelet Rich Fibrin*.¹⁴¹ Walaupun mengandung banyak *growth factor* pada fibrin dari A-PRF, namun pada LKD *growth factor* tersebut tidak bisa bekerja dengan optimal karena pemanjangan fase inflamasi pada fase penyembuhan LKD. Untuk mengoptimalkan fungsi dari *growth factor* yang dihasilkan oleh A-PRF, kombinasi A-PRF + AH diharapkan dapat mempercepat penyembuhan LKD. Disamping sifat sinergi dari AH dan PRF pada kombinasi A-PRF + AH, campuran homogen tersebut diduga dapat meningkatkan angiogenesis melalui reseptor CD-44, RHAMM dan ICAM-1 serta peningkatan proliferasi dan migrasi dari fibroblas.^{137,171} Peningkatan angiogenesis pada penyembuhan LKD karena efek dari A-PRF + AH dapat digambarkan dengan peningkatan penanda VEGF dan PDGF.¹⁶⁹ Sedangkan efek penurunan inflamasi akibat pemberian topikal A-PRF + AH pada LKD digambarkan dengan perubahan penanda IL-6¹⁷² Secara klinis, penyembuhan LKD dievaluasi melalui pembentukan jaringan granulasi dengan penggunaan *software ImageJ*¹⁶³

2.12 Kerangka Konsep



Gambar 2.21. Kerangka Konsep Kombinasi A-PRF dan AH untuk Mempercepat Penyembuhan LKD dibandingkan A-PRF saja atau Kontrol NaCl

Penjelasan Kerangka Konsep

Penyembuhan LKD dipengaruhi oleh faktor usia, lama luka, luas luka, Hb, GDS, HbA1C, Trombosit, derajat LKD (Klasifikasi Wagner) dan aliran darah ke tungkai bawah (*Ankle Brachial Index*) Subjek dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok yang mendapatkan topikal A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl. Untuk mendapatkan mekanisme pembentukan jaringan, dilakukan evaluasi beberapa penanda yang seperti VEGF, PDGF dan IL-6 diukur dengan metode ELISA Ekspresi penanda VEGF menggambarkan angiogenesis, ekspresi PDGF menggambarkan fibrogenesis. Sedangkan untuk menggambarkan keadaan inflamasi pada topikal

LKD dilihat dari ekspresi IL-6. Disamping mengevaluasi beberapa penanda, untuk menilai penyembuhan LKD secara klinis, dilakukan pengukuran peningkatan pembentukan jaringan granulasi yang diamati dengan software ImageJ.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah uji klinis acak terbuka pada penyandang LKD untuk mengetahui pengaruh terapi kombinasi topikal AH dan A-PRF dibandingkan A-PRF saja atau kontrol NaCl ditinjau dari perubahan angiogenesis (Δ VEGF), fibrogenesis (Δ PDGF), inflamasi (Δ IL-6) dan Δ jaringan granulasi (*Image-J*)

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di RSUD Koja dan RSPAD Gatot Subroto dan data diambil pada bulan Juli 2019–Maret 2020

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Target

Populasi target adalah penyandang LKD Wagner 2 dan luas luka $< 40 \text{ cm}^2$.

3.3.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah semua penyandang LKD klasifikasi Wagner 2 yang datang ke RSUD Koja dan RSPAD Gatot Soebroto pada bulan Juli 2019 – Maret 2020. Sampel penelitian adalah populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian.

3.4 Kriteria Pemilihan Subjek Penelitian

3.4.1 Kriteria Penerimaan

- Subjek dewasa (> 18 tahun), laki-laki dan perempuan dengan LKD
- Klasifikasi Wagner grade 2
- Luka di bawah lutut > 4 minggu (kronik)
- Luas area luka $< 40 \text{ cm}^2$
- $\text{ABI} \geq 0,8$
- Tidak ada tanda infeksi (*Score IWGDF Risk Stratification System* < 2)
- Bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani *informed consent*.
- Mengikuti seluruh rangkaian kegiatan hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14

3.4.2 Kriteria Penolakan

- Hemoglobin < 8,0 g/L, HbA1c > 12,0% (108 mmol/mol)
- Trombosit *concentration* < 100 x 10⁹/L
- Hemodialisis rutin
- Menderita *haemophilia, sickle cell anaemia, leukemia*
- Data tidak lengkap

3.5 Besar Sampel

Besar sampel dihitung menggunakan rumus uji beda rerata ≥ 2 kelompok, yaitu:

$$n_1 = n_2 = n_3 = n = 2 \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta) SD}{x_1 - x_2} \right]^2$$

Keterangan:

n = jumlah sampel minimal yang dibutuhkan

Kesalahan tipe I ditetapkan 5% hipotesis dua arah sehingga $Z\alpha = 1,96$

Kesalahan tipe II ditetapkan 10%, maka $Z\beta = 1,28$

Tabel 3.1. Penghitungan Jumlah Sampel

Marker Penyembuhan dan Luas luka	$Z\alpha$	$Z\beta$	$x_1 - x_2$	SD	n
<i>Marker Penyembuhan luka</i>					
VEGF	1,96	1,282	-	-	-
IL-6	1,96	1,282	-	-	-
PDGF	1,96	1,282	-	-	-
Indeks Granulasi (<i>Image-J</i>)	1,96	1,282	5,22	1,119	4

Besar sampel ditentukan dengan *rules of thumb* untuk > 2 kelompok, yaitu minimal 7 subjek per kelompok kemudian dihitung berdasarkan rumus uji beda *mean rule of thumb*, yaitu 21 subjek. Untuk mengantisipasi *drop out* dan meningkatkan ketajaman analisis statistik, besar sampel ditambah 10% menjadi 30 subjek dan besar sampel setiap kelompok 10 subjek.

3.6 Teknik Pengukuran Sampel

Pengukuran VEGF, IL-6, PDGF dari usap LKD dilakukan pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7, dengan teknik ELISA (kit) dan diperoleh data numerik dengan satuan pg/mL. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Terpadu FKUI. Reagen ELISA yang dipakai adalah Human VEGF/ELISA Kit, Human IL-6/ELISA Kit, dan Human PDGF AA/ELISA Kit dengan Kit Insert dari LifeSpan BioSciences, Inch.Cat:LS-

F4604. Luas jaringan granulasi diukur dengan kamera digital (Oppo Reno ®, dual camera 48 mega pixel, China) dengan akurasi 0,1% pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14. Hasil foto luka diolah dengan program *Image-J* (*software program Java*).

3.7 Cara Kerja

Semua penyandang LKD dilakukan anamnesis dan pemeriksaan fisik sesuai protokol rumah sakit. Penyandang yang memenuhi kriteria penerimaan dan tidak memenuhi kriteria penolakan dijelaskan mengenai prosedur penelitian dan diminta persetujuan tertulis bila bersedia mengikuti penelitian. Subjek dijelaskan bahwa penelitian berlangsung 14 hari dan subjek harus kontrol pada hari ke-3, ke-7, dan ke-14. Setelah subjek menandatangani *informed consent*, luka segera dibersihkan atau didebridemen.

Jumlah darah yang diambil sesuai luas luka berdasarkan metode grid yaitu 20–40 mL. Dari 10 mL darah vena perifer dapat diolah menjadi 4–5 mL A-PRF dan dari 1 mL A-PRF dapat digunakan pada LKD dengan luas 10 cm².

Penelitian dilakukan dengan tahapan berikut.

Tahap 1 (hari ke-0, ke-3, dan ke-7): Usap LKD dengan Lidi Kapas

Usap LKD diambil dari semua kelompok untuk diperiksa VEGF, PDGF, IL-6 dan protein total. Selanjutnya dilakukan randomisasi dan subjek dibagi tiga yaitu kelompok 1 (kombinasi A-PRF + AH), kelompok 2 (A-PRF) dan kelompok 3 (kontrol, NaCl 0,9%)

Tahap 2 (hari ke-0, ke-3, dan ke-7): Pengambilan Darah Subjek

Untuk kelompok 1 (kombinasi A-PRF + AH) dan kelompok 2 (A-PRF) diambil darah vena sesuai luas luka kemudian darah dipisah menjadi 2 tabung. Tabung 1 tanpa antikoagulan dijadikan A-PRF sesuai protokol pembuatan A-PRF dan sisa darah dimasukkan ke tabung 2 (dengan antikoagulan) untuk pemeriksaan darah lengkap, GDS, HbA1C dan albumin. Pada kelompok kontrol, darah hanya untuk pemeriksaan darah lengkap, GDS, HbA1C dan albumin.

Tahap 3 (hari ke-0, ke-3, dan ke-7): Pembuatan A-PRF, Kombinasi A-PRF + AH dan Gel Fibrin untuk Pemeriksaan ELISA

Dari sampel darah 20–40 mL tanpa antikoagulan dilakukan sentrifugasi 200 G selama 8 menit. Fibrin dan *buffy coat* dipisahkan dari eritrosit. Perbandingan A-PRF : AH adalah 1 : 0,6 dengan *vortex* selama 20 detik, kemudian dilakukan pemeriksaan VEGF, PDGF dan IL-6 dengan metode ELISA.

Tahap 4 (hari ke-0, ke-3, dan ke-7): Aplikasi Luka dengan Bahan

Terapi topikal dilakukan dengan memberikan 1 mL bahan untuk luas 10 cm² sesuai kelompoknya (kelompok 1 A-PRF + AH, kelompok 2 A-PRF saja, kelompok 3 kompres NaCl). Luka ditutup dengan kasa steril sebagai balutan sekunder untuk menjaga kelembapan. Untuk menilai penyembuhan secara klinis, luka difoto pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14 pada saat luka dibuka pertama kali. Semua foto LKD diolah dengan program *Image-J*.

3.8 Batasan Operasional

Pengukuran luas LKD dan aplikasi bahan (A-PRF + AH, A-PRF saja, kontrol NaCl)

- Definisi: cara menentukan luas luka LKD
- Cara ukur: luas LKD diukur dengan menggambar tepi luka di plastik grid mika yang diletakkan di atas luka. Jumlah kotak di plastik grid mika dihitung (1 kotak = 1x1 cm²). Bila kotak terisi separuh, maka dibulatkan ke atas. Untuk luas 10 cm² diaplikasikan A-PRF + AH atau A-PRF saja sebanyak 1 mL.
- Alat Ukur: plastik grid mika
- Skala Pengukuran: numerik

Pemeriksaan Angiogenesis

- Definisi: proses pembentukan pembuluh darah baru dan merupakan proses alami yang berperan penting pada penyembuhan luka. Proses angiogenesis pada LKD dinilai dengan mengukur kadar VEGF pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7.
- Cara ukur: Pemeriksaan kadar VEGF dari LKD dilakukan dengan mengambil sampel dari usap LKD kemudian dimasukkan ke tabung ependorf 1,5 mL berisi PBS 1 mL lalu diperiksa dengan metode ELISA. Sampel dimasukkan ke dalam wadah yang sudah dilapisi antibodi monoklonal spesifik terhadap VEGF dan dalam wadah tersebut dimasukkan *enzyme-linked antibody* yang akan mengikat antigen VEGF. Larutan substrat dimasukkan sehingga terjadi perubahan warna. Spektrofotometri dibaca pada panjang gelombang 450 nm dan kadar VEGF dinyatakan dalam pg/mL. Dari usap LKD juga diukur total protein (TP) dengan satuan mg/mL. Nilai total VEGF diperoleh dari kadar VEGF dibagi TP.
- Alat Ukur: ELISA
- Skala Pengukuran: numerik

Pemeriksaan biomarker *fibrogenesis*

- Jaringan yang memiliki fungsi mengikat serta menyokong jaringan lain. Penyusun fibrosis adalah sel yang tersusun di ECM dan tersusun menyebar. Jaringan fibrosis tersusun atas 3 jenis serat yaitu kolagen, elastin, dan retikular. Biomarker yang digunakan adalah PDGF. Nilai total PDGF diperoleh dari kadar PDGF dibagi TP
- Alat Ukur: ELISA
- Skala Pengukuran: numerik

Pemeriksaan biomarker inflamasi

Definisi: keadaan yang distimulasi oleh faktor kimia (histamin, bradikinin, serotonin, leukotrien, dan prostaglandin) dan dilepaskan oleh sel yang berperan sebagai mediator radang di sistem kekebalan seperti sel PMN dan makrofag. Pada inflamasi aktif terjadi peningkatan marker inflamasi seperti prostaglandin, interleukin-1 (IL-1, IL-6), TNF, C5a, dan TGF- β . Saat ini biomarker yang banyak digunakan untuk mengukur inflamasi adalah IL-6. Nilai total IL-6 diperoleh dari kadar IL-6 dibagi TP.

- Alat Ukur: ELISA
- Skala Pengukuran: numerik

Proses Penyembuhan LKD berdasarkan IG

- Definisi: IG adalah perbandingan luas jaringan granulasi dengan luas permukaan luka yang diperoleh berdasarkan dua indikator yaitu luas permukaan luka dan luas granulasi.
- Cara ukur: Untuk menghitung luas permukaan luka dan luas jaringan granulasi dilakukan pengukuran pada foto luka dengan digital kamera dan diolah menggunakan *software Image-J*.
- Alat Ukur: luas *image* luka dan jaringan granulasi diukur menggunakan *software Image-J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD).
- Skala pengukuran: numerik

3.9 Variabel Penelitian

- Variabel bebas: pemberian terapi topikal LKD sesuai kelompok
Kelompok 1: terapi topikal A-PRF + AH
Kelompok 2: terapi topikal A-PRF

Kelompok 3: kompres NaCl (kontrol)

- Variabel terikat: marker angiogenesis (VEGF), fibrogenesis (PDGF), inflamasi (IL-6), marker klinis (IG)
- Variabel perancu: kontrol glukosa, HbA1C, konsentrasi platelet

3.10 Analisis Data

Data dicatat di formulir penelitian kemudian dilakukan tabulasi, verifikasi, *editing*, diberikan kode dan dianalisis dengan program SPSS versi 20. Homogenitas ditentukan dengan uji Saphiro-Wilk; data sebaran normal dilaporkan dalam rerata dan simpang baku, sedangkan sebaran data tidak normal dilaporkan dalam median dengan nilai minimum dan maksimum.

Guna menjawab pertanyaan penelitian nomor 1,2 dan 3 dilakukan *one way Anova* untuk sebaran data normal atau uji Kruskal Wallis untuk sebaran data tidak normal. Untuk menjawab pertanyaan penelitian nomor 4 dilakukan uji beda dua proporsi menggunakan uji Chi Square. Data dilengkapi dengan interval kepercayaan 95% dengan batas kemaknaan $p < 0,05$.

3.11 Etika Penelitian

Penelitian ini telah lolos kaji etik dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan Nomor: ND-828/UN2F1/ETIK/PPM.00.02/2019. Calon subjek dan keluarga yang bersedia mengikuti penelitian diinformasikan secara lisan dan tulisan tentang manfaat, prosedur, keuntungan dan kerugian penelitian. Calon subjek berhak menyetujui atau menolak ikut serta dalam penelitian. Setelah memahami dan bersedia mengikuti penelitian, subjek menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Apabila menolak ikut dalam penelitian, subjek tetap mendapatkan pelayanan medis yang optimal sesuai standar. Subjek berhak sewaktu-waktu menghentikan keikut-sertaan dalam penelitian. Identifikasi, hasil pemeriksaan dan data penelitian lain dirahasiakan.

3.12 Prosedur Penelitian

3.12.1 Cara Penetapan Kelompok Penelitian

Penelitian ini menggunakan randomisasi dalam blok (*block randomization*) dengan *open label*.

3.12.2 Cara Kerja

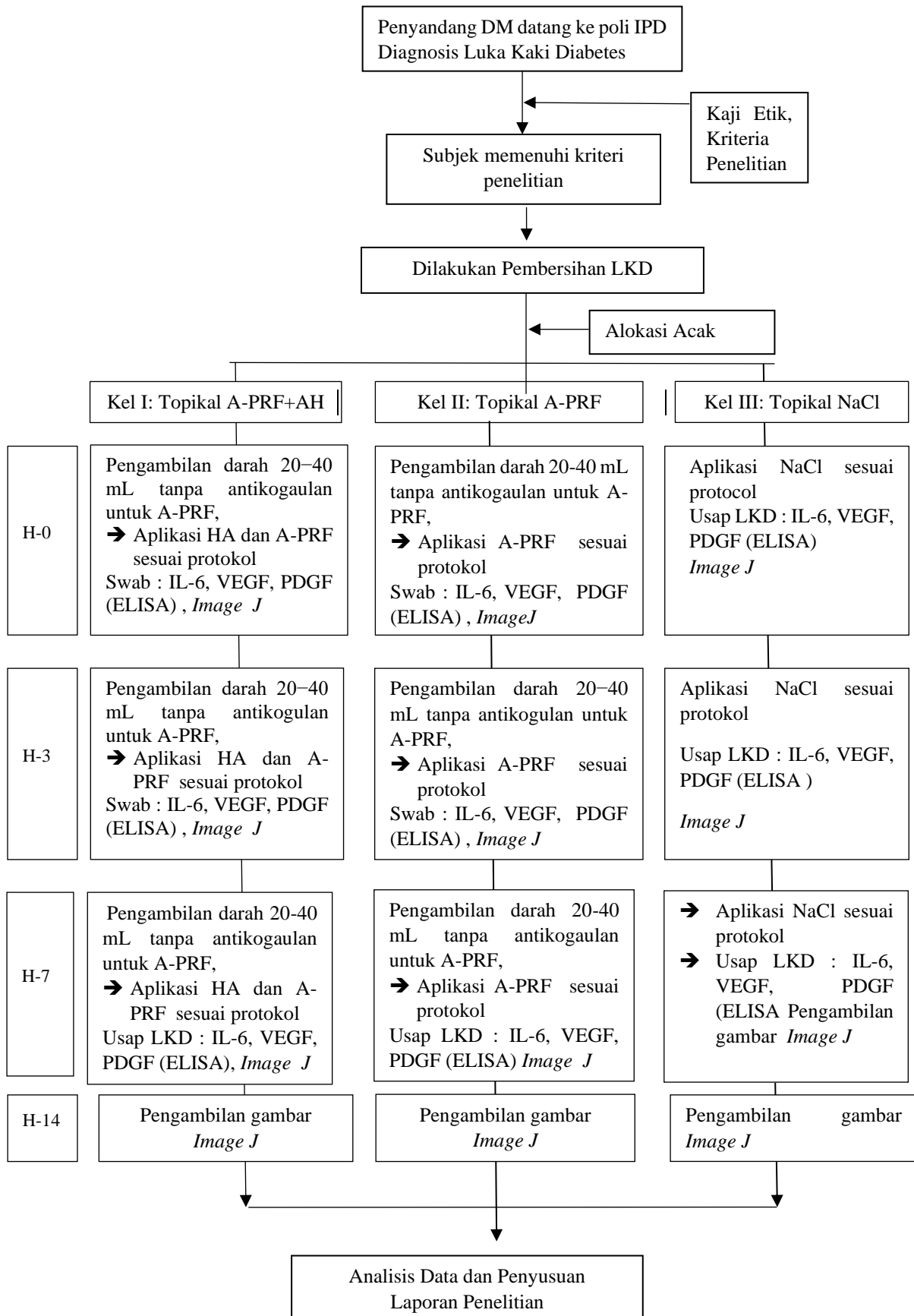
Persiapan penelitian mencakup penyusunan proposal dan pembuatan formulir yang mencakup data demografis subjek LKD. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan meliputi anamnesis tentang sejak kapan menderita DM, pemeriksaan fisis LKD, dan laboratorium dasar. Setelah debridemen (hari ke-0) dilakukan pengambilan darah pada semua subjek untuk pemeriksaan laboratorium darah lengkap, GDS, HbA1C, albumin dan pengambilan foto untuk diproses dengan *software Image-J*.

Untuk membuat A-PRF diambil darah perifer 20–40 mL kemudian disentrifus dengan kecepatan 200 G selama 8 menit dan A-PRF yang dihasilkan diambil sedikit untuk pengukuran biomarker VEGF, PDGF, dan IL-6 dengan metode ELISA. Bahan A-PRF yang diperoleh dicampur dengan AH 2% menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan perbandingan A-PRF: AH = 1:0,6. Dari campuran A-PRF + AH diambil sedikit untuk pengukuran biomarker VEGF, PDGF, dan IL-6 dengan metode ELISA.

Bahan diaplikasi sesuai kelompok perlakuan yaitu LKD diberikan A-PRF + AH atau A-PRF saja secara topikal sedangkan untuk kelompok kontrol hanya diberikan kompres NaCl. Pada saat penyandang kontrol hari ke-3 dan ke-7 dilakukan perlakuan yang sama sesuai kelompoknya serta pengambilan foto pada hari ke-14.

3.13 Alur Penelitian

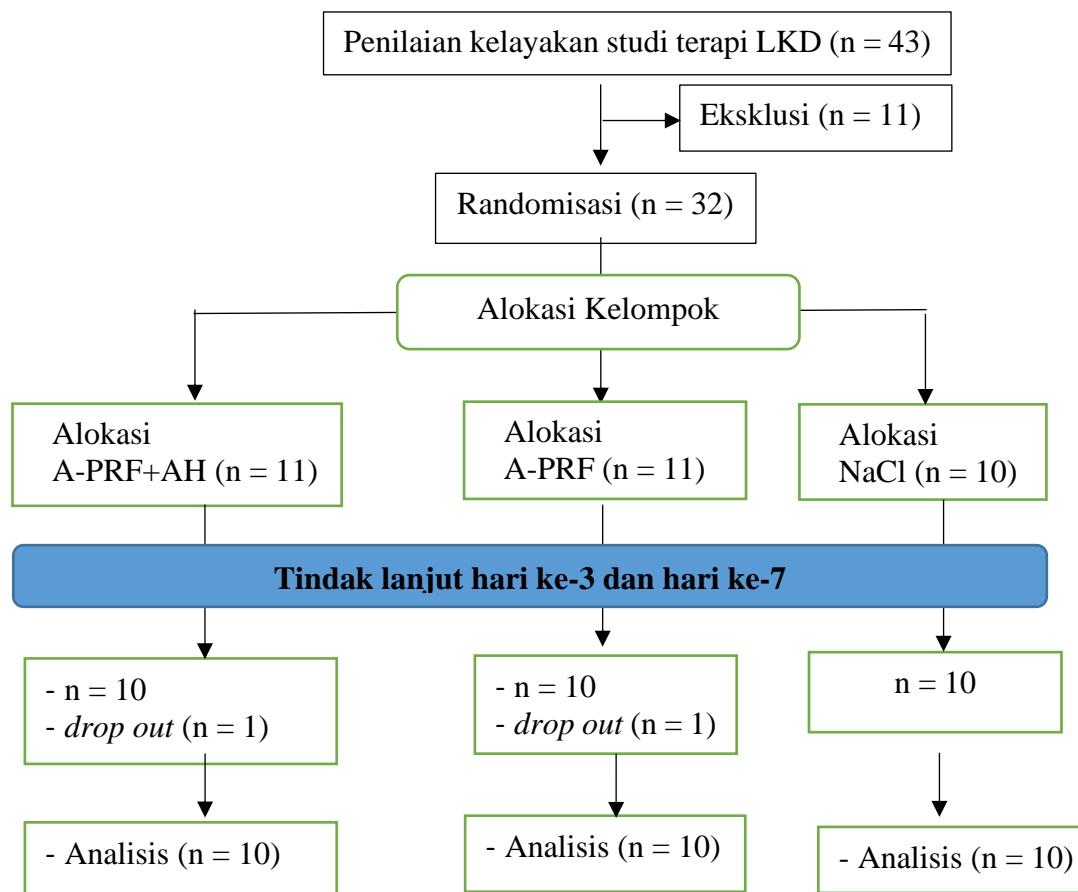
Penyandang LKD yang berobat ke RSUD Koja dan RSPAD Gatot Soebroto diperiksa oleh ahli endokrinologi untuk dipilih menjadi subjek penelitian berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Selanjutnya subjek didebridemen, pemeriksaan darah dan pembagian kelompok perlakuan yaitu kombinasi A-PRF+HA, kelompok A-PRF saja dan kelompok NaCl (kontrol). Aplikasi bahan pada LKD dilakukan sesuai dengan protokol. Pemeriksaan VEGF, PDGF, dan IL-6 dari bahan usap LKD, gel fibrin dan pengambilan foto luka dilakukan pada hari ke-0, ke-3, ke-7. Pada hari ke-14 hanya dilakukan pengambilan foto LKD. Gambar 3.1 menunjukkan alur penelitian dan intervensi pada setiap kelompok dan data yang didapatkan dianalisis untuk penyusunan laporan penulisan.



Gambar 3.1. Alur Penelitian

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini diperoleh 41 subjek LKD yang terdiri atas 6 subjek dari RSPAD Gatot Soebroto dan 35 subjek dari RSUD Koja. Sebelas subjek LKD dikeluarkan dari penelitian karena tidak memenuhi kriteria inklusi dan 3 penyandang tidak bersedia ikut penelitian sehingga subjek menjadi 30 orang (Gambar 4.1.).



Gambar 4.1. Alur Consort

4.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Dari 30 subjek yang memenuhi kriteria penelitian, usia rerata adalah $62,6 \pm 14,1$ tahun (rentang usia 28–81 tahun). Subjek perempuan (10 orang), laki-laki (12 orang) dan rerata IMT 28,2 (SB 2,47).

Pada kelompok A-PRF + AH, nilai leukosit, glukosa darah dan HbA1C lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, namun tidak bermakna. Data karakteristik subjek homogen dan tidak berbeda bermakna pada ketiga kelompok perlakuan (Tabel 4.1.).

Tabel 4.1. Karakteristik Subjek Berdasarkan Perlakuan

Karakteristik	A-PRF+AH (n=10)	A-PRF (n=10)	NaCl (n=10)	
Usia (tahun)	59,8 (SB 12,7)	64,7 (SB 12,0)	66 (SB 12,3)	0,626
Jenis kelamin, n				
Laki-laki	5	4	3	
Perempuan	5	6	7	
Indeks massa tubuh	28,9 (SB 2,7)	27,3 (SB 2,08)	28,4 (SB 2,5)	0,337
Hemoglobin (g/dL)	12,7 (SB 1,2)	13,1 (SB 1,3)	12,05 (SB 1,4)	0,224
Hematokrit (%)	34,1 (SB 4,3)	35,6 (SB 4,6)	33,8 (SB 4,5)	0,145
Leukosit ($10^3/\mu\text{l}$)	13,30 (SB 1,08)*	11,08 (SB 1,33)	9,23 (SB 1,66)	0,985
Trombosit ($10^3/\mu\text{l}$)	354,9 (SB 167,5)	338,8 (SB 164,5)	319,9 (SB 128,4)	0,880
Glukosa darah acak, mg/dL	286,0 (SB 67,5)*	243,8 (SB 47,4)	254,7 (SB 58,6)	0,104
HbA1C (%)	11,34 (SB 1,30)*	9,0 (SB 0,68)	8,5 (SB 0,72)	0,950
Kolesterol total (mg/dL)	214,5 (SB 16,9)	249,3 (SB 16,1) [#]	202,3 (SB 38,6)	0,096
Albumin (mg/dL)	3,3 (SB 0,4)	3,2 (SB 0,5)	3,2 (SB 0,4)	0,662
Anti Platetet	4	3	3	
Statin	3	4	4	

^aData berupa rerata (SB), uji anova

*Kelompok A-PRF + AH memiliki nilai leukosit, Glukosa Darah Sewaktu dan HbA1C berbeda tidak bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan control

[#]Kelompok A-PRF memiliki nilai kolesterol total berbeda tidak bermakna dibandingkan kelompok A-PRF + AH dan control

4.1.1 Karakteristik Klinis LKD pada Kelompok A-PRF + AH, A-PRF dan NaCl

Tabel 4.2. menunjukkan lokasi luka terbanyak adalah di ujung jari (43,3%). Semua luka sesuai dengan kriteria Wagner 2 dengan dasar luka subdermis (90%), fasia (6,6%) dan dermis (3,3%). Sebagian besar sekret yang dihasilkan LKD adalah sedang (63%). Dari ketiga kelompok perlakuan, luas LKD awal adalah 8,3 (SB 7,1) cm² dan tidak ada perbedaan bermakna luas LKD.

Tabel 4.2. Karakteristik Awal LKD Berdasarkan Kelompok Perlakuan

Karakteristik LKD	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	Jumlah (n,%)
Lokasi luka				
Digiti	4	4	5	13 (43,3)
Kaki depan	4	3	4	11 (36,6)
Telapak kaki	1	3	2	6 (20)
Tumit	1	1	1	3 (10)
Area luas luka awal, cm ²	7,0 (1,9–31,9)	4,6 (2,3–19,8)	5,3 (2,0–20,6)	0,848 ^a
Dasar luka (hari ke-1)				
Dermis	0	0	1	1 (3,3)
Subdemis	9	9	9	9 (90)
Fasia	1	1	0	2 (6,6)
Otot	0	0	0	0 (0)
Jumlah sekret				
Sedikit	1	2	4	7 (23,3)
Sedang	9	8	6	23 (76,6)
Banyak	0	0	0	0 (0)
Lama luka				
2 minggu–1 bulan	4	5	7	16 (53,3)
> 1 bulan	6	5	3	14 (46,6)

^aData ditampilkan dalam median (min-maks), uji Kruskal Wallis

4.1.2 Faktor Komorbid DM pada LKD

Tabel 4.3. menunjukkan komorbid subjek LKD sebagian besar adalah hipertensi (43%) diikuti obesitas dengan IMT > 28,3 kg/ cm² (26,6%) dan merokok (16,7%).

Tabel 4.3. Komorbid DM pada Penyandang LKD

Komorbid DM	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	Jumlah (n, %)
Hipertensi	5	4	4	13 (43,3)
Merokok	2	1	2	5 (16,7)
Obesitas	2	3	3	8 (26,6)
Kombinasi dua atau lebih komorbid	1	2	1	4 (13,3)

4.2 Perubahan VEGF pada Usap LKD Berdasarkan Intervensi

Data awal kadar VEGF pada ketiga kelompok tidak berbeda bermakna. Setelah dua kali intervensi, perubahan kadar VEGF (Δ VEGF) kelompok A-PRF + AH dibandingkan sebelum intervensi, terjadi peningkatan pada hari ke-3 sebesar 87,8 pg/mg protein dan hari ke-7 sebesar 311 pg/mg protein. Untuk kelompok A-PRF,

terjadi penurunan Δ VEGF pada hari ke-3 sebesar 5,3 pg/mg protein namun meningkat pada hari ke-7 sebesar 87,1 pg/mg protein, sedangkan kelompok NaCl mengalami penurunan kadar Δ VEGF pada hari ke 3 sebesar 38,9 pg/mg protein dan hari ke-7 sebesar 16,3 pg/mg protein.

Kelompok A-PRF + AH menunjukkan peningkatan Δ VEGF yang bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol pada hari ke-3 dan hari ke-7 (Tabel 4.4.)

Tabel 4.4. Perubahan Kadar VEGF Usap LKD Berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi*	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	Nilai p
Sebelum perlakuan*	232,8 (SB 125,7)	185,7 (SB 100,8)	183,7 (SB 127,2)	0,568
Hari ke-3 perlakuan*	320,6 (SB 165,8)	180,4 (SB 87,4)	144,8 (SB 87,7)	0,007
Hari ke-7 perlakuan*	544,5 (SB 266,8)	272,8 (SB 97,7)	167,4 (SB 98,8)	< 0,001
Δ hari ke- 0–3	87,8(SB 79,6)	-5,3 (SB 37,9)	-38,9 (SB 127,1)	0,011
Δ hari ke- 0–7	311(SB 196,5)	87,1(SB 63,9)	-16.3 (SB 128,2)	< 0,001

* Data rerata (SB), uji anova

uji post-hoc anova:

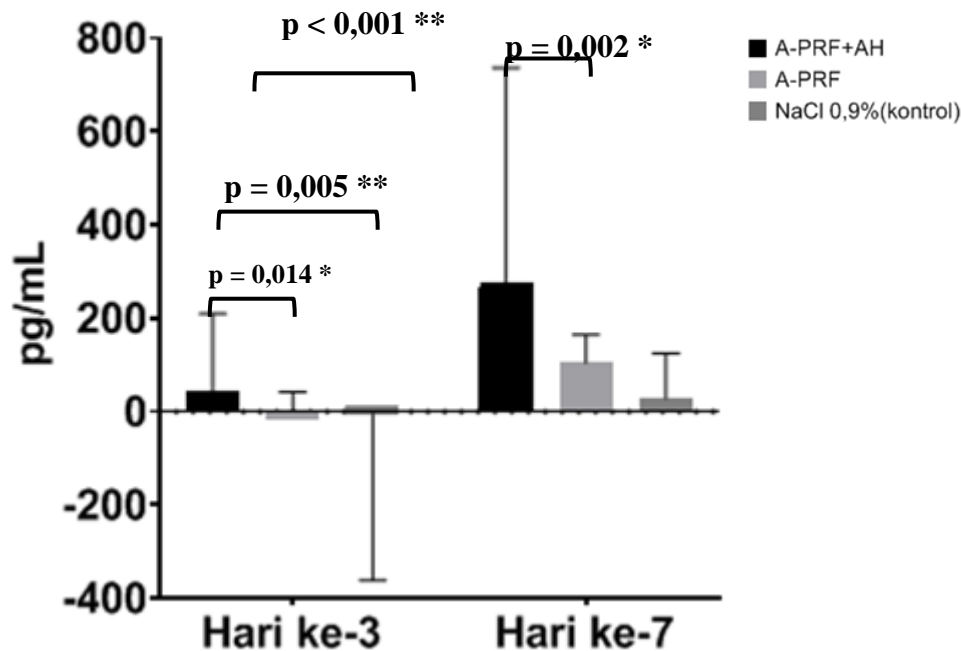
A-PRF +HA meningkat bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 (p = 0,003) dan ke-7 (p < 0,001)

A-PRF +HA meningkat bermakna dibandingkan A-PRF hari ke-3 (p = 0,014) dan ke-7 (p = 0,002)

A-PRF meningkat bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 (p = 0,612) dan ke-7 (p = 0,186)

Tabel 4.4. juga menunjukkan perhitungan lain dengan melihat perubahan nilai absolut kadar VEGF, didapatkan pada kelompok A-PRF + AH meningkat dari hari ke-0 sampai hari ke-3 (232,8 pg/mg menjadi 320,6 pg/mg) dan hari ke-7 (232,8 pg/mg menjadi 544,5 pg/mg). Pada kelompok A-PRF, kadar VEGF menurun pada hari ke-3 (185,7 pg/mg menjadi 180,4 pg/mg) , namun meningkat pada hari ke-7 (185,7 pg/mg menjadi 272,8 pg/mg). Pada kelompok kontrol, nilai absolut VEGF menurun hari ke-3 (183,7 pg/mg menjadi 144,8 pg/mg) dan hari ke-7 (187,7 pg/mg menjadi 167,4 pg/mg). Pada kelompok A-PRF + AH, kadar VEGF meningkat bermakna hari ke-3 (p = 0,011) dan ke-7 (p < 0,001) dibandingkan A-PRF dan kontrol Gambar 4.2. menunjukkan pada analisis beda dua kelompok dengan uji Mann Whitney didapatkan perubahan kadar VEGF (Δ VEGF) kelompok A-PRF + AH berbeda bermakna dibandingkan A-PRF di hari ke-3 (p = 0,014*) dan hari ke-7 (p = 0,002*). Demikian juga Δ VEGF kelompok A-PRF + AH berbeda bermakna dibandingkan kontrol di hari ke-3 (p = 0,005**) dan hari ke-7 (p < 0,001**). Pada

perhitungan perubahan kadar VEGF (Δ VEGF) untuk kelompok A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan A-PRF dan kontrol hari ke-0-3 ($p = 0,011$) dan hari ke- 0-7 ($p < 0,001$), dengan uji Kruskal Wallis.



* Δ VEGF A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan A-PRF pada hari ke-3 ($p=0,014$) dan hari ke-7 ($p = 0,002$)

** Δ VEGF A-PRF+HA meningkat bermakna dibandingkan kontrol pada hari ke-3 ($p=0,005$) dan hari ke-7 ($p < 0,001$)

Gambar 4.2. Perbandingan Perubahan Kadar VEGF Berdasarkan Intervensi yang Berbeda

4.3 Perubahan PDGF Usap LKD yang Mendapat Intervensi

Untuk menggambarkan jalur penyembuhan LKD melalui fibrogenesis dapat dilihat melalui analisis biomarker PDGF sebelum dan sesudah perlakuan ketiga kelompok. Hasil penelitian ini menunjukkan pada kelompok A-PRF + AH terdapat selisih peningkatan pada hari ke 0-3 (Δ PDGF 0-3) dan pada hari 0-7 (Δ PDGF 0-7). Didapatkan A-PRF + AH menunjukkan peningkatan Δ PDGF yang tidak bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol pada hari ke 0-3 ($p = 0,479$, uji Kruskal Wallis) dan hari ke 0-7 ($p = 0,125$, uji Kruskal Wallis), sesuai Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Perubahan Kadar PDGF Usap LKD Berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	Nilai p
Sebelum perlakuan*	1,9 (0,6–8,1)	1,7 (0,8–8,5)	1,9 (0,9–5,9)	0,961*
Hari ke-3 perlakuan*	3,8 (1,5–9,9)	3,1 (0,8–9,1)	2,6 (0,9–12,6)	0,968*
Hari ke-7 perlakuan*	8,1 (4,3–12,9)	4,1 (0,6–14,7)	5,5 (1,9–14,1)	0,199*
Δ hari ke- 0–3	1,3 (-4,7–4,2)	0,7 (-3,7–4,2)	1,1 (-0,7–7,0)	0,479
Δ hari ke- 0–7	3,2 (1,7–12,3)	1,6(-7,1–13,2)	2,4 (-0,3–11,2)	0,125

Data medan (min–maks), uji Kruskal Wallis

* Kelompok A-PRF + AH dibandingkan A-PRF dan kontrol hari ke-0 dan ke-3, tidak berbeda bermakna (uji Kruskal Wallis)

Tabel 4.5. juga menunjukkan perhitungan lain dengan menggunakan kenaikan nilai absolut kadar PDGF kelompok A-PRF + AH, meningkat tidak bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol pada hari ke-3 dan hari ke-7 dengan uji Kruskal Wallis.

4.4 Evaluasi Perubahan IL-6 Usap LKD yang Mendapat Intervensi

Untuk melihat jalur penyembuhan LKD melalui inflamasi dilakukan analisis biomarker inflamasi yaitu IL-6. Data awal kadar IL-6 pada ketiga kelompok tidak berbeda bermakna. Setelah dua kali intervensi, perubahan kadar IL-6 (Δ IL-6) kelompok A-PRF + AH, terjadi penurunan bermakna pada hari ke-3 sebesar 10,9 pg/mg protein dan hari ke-7 sebesar 18,3 pg/mg protein, sedangkan Δ IL-6, kelompok A-PRF terjadi penurunan pada hari ke -3 sebesar 3,7 pg/mg protein dan hari ke-7 sebesar 7,8 pg/mg protein. Perubahan kadar IL-6 (Δ IL-6) kelompok NaCl terjadi peningkatan pada hari ke-3 sebesar 4,3 pg/mg protein dan hari ke-7 sebesar 35,5 pg/mg protein. Kelompok A-PRF + AH menunjukkan penurunan Δ IL-6 yang bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol pada hari ke 0–7 ($p = 0,015$), sesuai Tabel 4.6.

Tabel 4.6. Perubahan Kadar IL-6 Usap LKD Berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	Nilai p
Sebelum perlakuan*	106,4 (83,1–407,6)	91,9 (38,6 –151,6)	125,3 (20,3–287,0)	0,337
Hari ke-3 perlakuan*	99,5 (76,3–302,2)	72,8 (27,1–148,9)	131,1 (5,3–337,5)	0,119
Hari ke-7 perlakuan*	88,7 (44,3–217,9)	48,8 (27,7–156,2)	167,9 (27,7–156,2)	0,041*
Δ hari ke- 0–3	-10,9 (-105,4–17,7)	-3,7(-34,8–3,5)	4,3 (-47,8–50,5)	0,460
Δ hari ke- 0–7	-18,3 (-189,7–44,6)	-7,8(-49,8–31,2)	35,6 (-160,6–108,4)	0,015

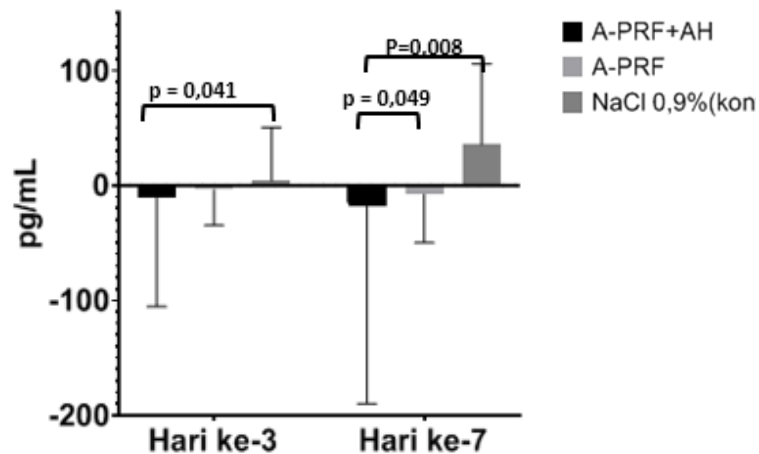
*Data median (min-maks), uji Kruskal Wallis

Kadar IL-6 pada A-PRF + AH menurun bermakna dibandingkan A-PRF hari ke-7 (uji Mann Whitney, $p = 0,023$)

Kadar IL-6 pada A-PRF + AH menurun bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 ($p = 0,049$) dan hari ke-7 (uji Mann Whitney $p = 0,041$).

Tabel 4.6. juga menunjukkan perhitungan lain dengan menganalisis nilai absolut kadar IL-6, pada kelompok A-PRF + AH, kadar IL-6 menurun bermakna dibandingkan A-PRF dan kontrol pada hari ke-7. Penurunan kadar IL-6 pada kelompok A-PRF + AH pada hari ke-3 (106,4 pg/mg menjadi 99,5 pg/mg) dan hari ke-7 (106,4 pg/mg menjadi 88,7 pg/mg). Pada kelompok A-PRF, kadar IL-6 menurun pada hari ke-3 (91,9 pg/mg menjadi 72,8 pg/mg) dan hari ke-7 (91,9 pg/mg menjadi 48,8 pg/mg). Pada kelompok kontrol, kadar IL-6 meningkat pada hari ke-3 (125,3 pg/mg menjadi 131,1 pg/mg) dan hari ke-7 (125,3 pg/mg menjadi 167,9 pg/mg). Pada kelompok A-PRF + AH, kadar IL-6 menurun bermakna hari ke-7 ($p = 0,041$) dibandingkan A-PRF dan kontrol .

Gambar 4.3. menunjukkan analisis dua kelompok, didapatkan Δ IL-6 kelompok A-PRF + AH menurun bermakna dibandingkan A-PRF pada hari ke-7 (uji Mann Whiitneym, $p = 0,049^{**}$) . Sedangkan Δ IL-6 kelompok A-PRF + AH dibandingkan kontrol, didapatkan penurunan bermakna pada hari ke 3 (uji Mann Whitney $p = 0,041$ *) dan hari ke 7 (uji Mann Whitney $p = 0,008^{**}$). Pada Δ IL-6 kelompok A-PRF dibandingkan kontrol , tidak didapatkan perbedaan yang bermakna baik pada hari ke-3 maupun har ke-7



Gambar 4.3. Perubahan kadar IL-6 Berdasarkan Intervensi

4.5 Evaluasi Pertumbuhan Jaringan Granulasi Penyembuhan LKD

Untuk mendapatkan nilai Indeks Granulasi (IG) dilakukan penghitungan luas jaringan granulasi dan luas area luka. Penghitungan IG didapatkan dari pembagian luas jaringan granulasi dengan luas area luka. Penghitungan ini dilakukan pada setiap LKD sebelum dan sesudah intervensi.

4.5.1 Perubahan Luas Area LKD Sebelum dan Sesudah Intervensi

Pada Tabel 4.7. terlihat gambaran rerata penurunan luas LKD dari hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14 yang menunjukkan tidak adanya perubahan yang bermakna pada ketiga kelompok perlakuan. Dilakukan analisis lanjutan Δ atau Δ persen penurunan LKD pada setiap intervensi, menunjukkan tidak berbeda bermakna antara kelompok yang berbeda.

Tabel 4.7. Perubahan Luas Area (LA) LKD Berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	p
Sebelum perlakuan*	7,0 (1,9–31,9)	4,6 (2,3–19,7)	5,2 (2,0–20,6)	0,848
Hari ke-3 perlakuan*	6,3 (1,4–26,1)	3,9 (1,6–17,3)	3,2 (1,9–18,4)	0,616
Hari ke-7 perlakuan*	5,5 (1,1–25,4)	3,6 (0,6–14,4)	2,6 (1,1–17,1)	0,486
Hari ke-14 perlakuan*	5,0 (0,9–18,6)	3,4 (0,6–13,0)	2,3 (0,3–16,2)	0,388
Δ hari ke- 0–3	-0,5 (-0,1–-5,8)	-0,6(-0,03–-2,8)	-1,1(-0,1–-2,3)	0,716
Δ hari ke -0–7	-1,1(-0,3–-5,9)	-1,2(-0,3–- 5,6)	-1,5(-0,2–-3,9)	0,985
Δ hari ke-0–14	-1,5(-0,7–-13,3)	-1,6(-0,4–-8,5)	-2,5(-0,5–-4,4)	0,903

*Data median (min-maks), uji Kruskal Wallis

4.5.2 Luas Jaringan Granulasi pada LKD Sebelum dan Sesudah Intervensi

Untuk menilai angka kesembuhan LKD, di samping mengukur pengecilan luas tepi LKD, evaluasi juga dilakukan dengan penambahan luas jaringan granulasi. Kelompok A-PRF + AH menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan NaCl pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14, seperti pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8. Perubahan Luas Jaringan Granulasi (LG) Berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi	A-PRF+ AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	p
Sebelum Pelakuan	1,2(0,8–5,8)	1,8(0,3–9,2)	1.0(0.6–3.1)	0,477
Hari ke-3 perlakuan*	4,3(1,1–17,9)	2,2(0,3–10,4)	1,3(0,6–3,8)	0,017
Hari ke-7 perlakuan*	4,9(1,2–18,4)	2,6(0,4–11,5)	1,4(0,8–3,9)	0,031
Hari ke-14 perlakuan*	5,0(1,2–18,6)	2,9(0,5–11,8)	1,5(0,9–4,0)	0,030
Δ hari ke- 3–0	2,7 (1,13–13,7)	0,4 (0,01–1,62)	0,1 (0,01–0,77)	0,001*
Δ hari ke- 7–0	3,0 (0,2–14,2)	0,8 (0,05–2,69)	0,3 (0,09–1,17)	0,008*
Δ hari ke- 14–0	3,2(0,23–14,4)	1,0 (0,12–3,0)	0,5 (0,12–1,61)	0,006*

* Data median (min-maks), uji Kruskal Wallis

*Beda bermakna A-PRF+HA dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol, uji Kruskal Wallis

Beda bermakna Δ Luas Granulasi, A-PRF + AH dibandingkan kelompok A-PRF hari ke-3 ($p = 0,013$), ke-7 ($p=0,028$), uji Mann Whitney dan ke-14 ($p = 0,041$), uji Mann Whitney

Beda bermakna Δ Luas Granulasi, A-PRF + AH dibandingkan kelompok kontrol hari ke-3 ($p = 0,001$), ke-7 ($p=0,004$), uji Mann Whitney), dan ke-14 ($p = 0,003$, uji Mann Whitney).

Beda tidak bermakna Δ Luas Granulasi, A-PRF dibandingkan kelompok kontrol hari ke-3 ($p = 0,069$), ke-7 ($p=0,226$), dan ke-14 ($p = 0,121$), uji Mann Whitney).

Tabel 4.8. juga menunjukkan penghitungan lain dengan menganalisis perubahan (delta) kenaikan luas jaringan granulasi pada LKD. Pada kelompok A-PRF + AH terjadi peningkatan bermakna Δ luas granulasi pada hari ke-3 ($p = 0,001$), ke-7 ($p = 0,008$) dan ke-14 ($p = 0,006$) dibandingkan kelompok lainnya.

4.5.3 Perubahan Indeks Granulasi pada LKD Sebelum dan Sesudah Intervensi

Metode penghitungan lain untuk menilai penyembuhan luka dengan menggunakan perubahan indeks granulasi. Pada kelompok A-PRF + AH berbeda bermakna dibandingkan kelompok lainnya pada hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14, sesuai Tabel 4.9.

Tabel 4.9. Perubahan Indeks Granulasi (Δ IG) Berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi	A-PRF+ AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	p
Δ hari 0–3	26,0 (SB 8,4)	12,5 (SB 6,2)	12,7 (SB 5,1)	< 0,001
Δ hari 0–7	41,7 (SB 13,8)	29,0 (SB 9,2)	24,6 (SB 8,8)	0,004
Δ hari 0–14	57,7 (SB 14,1)	50,9 (SB 17,6)	39,9 (SB 14,6)	0,049

Data mean (SB), uji anova

Uji Post Hock Anova **Indeks Granulasi**

A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan kelompok A-PRF hari ke-3 ($p < 0.001$) dan hari ke-7 ($p = 0,042$) dan namun tidak berbeda bermakna dihari hari ke-14 ($p = 0,999$)

A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 ($p < 0.001$) , ke-7 ($p = 0,005$), dan ke-14 ($p = 0,047$)

A-PRF tidak berbeda bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 ($p = 1,000$), ke-7 ($p = 1,000$) dan dan ke-14 ($p = 0,370$)

Pengukuran lain dengan membandingkan nilai absolut IG didapatkan A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan kelompok lainnya (A-PRF dan NaCl) pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 ($p < 0,001$). Pada analisa subkelompok pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 didapatkan kelompok A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan kelompok NaCl (kontrol), namun kelompok A-PRF saja tidak meningkat bermakna dibandingkan kelompok NaCl (kontrol) sesuai Tabel 4.10.

Tabel 4.10. Persentase Indeks Granulasi berdasarkan Intervensi

Waktu Intervensi	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol NaCl (n = 10)	p
Sebelum perlakuan	42,1 (18,4–57,6)	34,8 (14,1–58,9)	35,9(16,1–52,6)	0,910
Hari ke-3 perlakuan	62,3 (33,6–81,3)	47,6 (20,5 – 73,0)	51,3 (30,4–64,2)	0,048
Hari ke-7 perlakuan	78,9 (65,8–95,8)	64,6 (37,2–89,9)	66,0 (43,6–96,4)	0,012
Hari ke-14 perlakuan	97,7 (89,4–99,6)	91,2 (46,0–98,9)	78,7 (72,2–98,4)	< 0,001

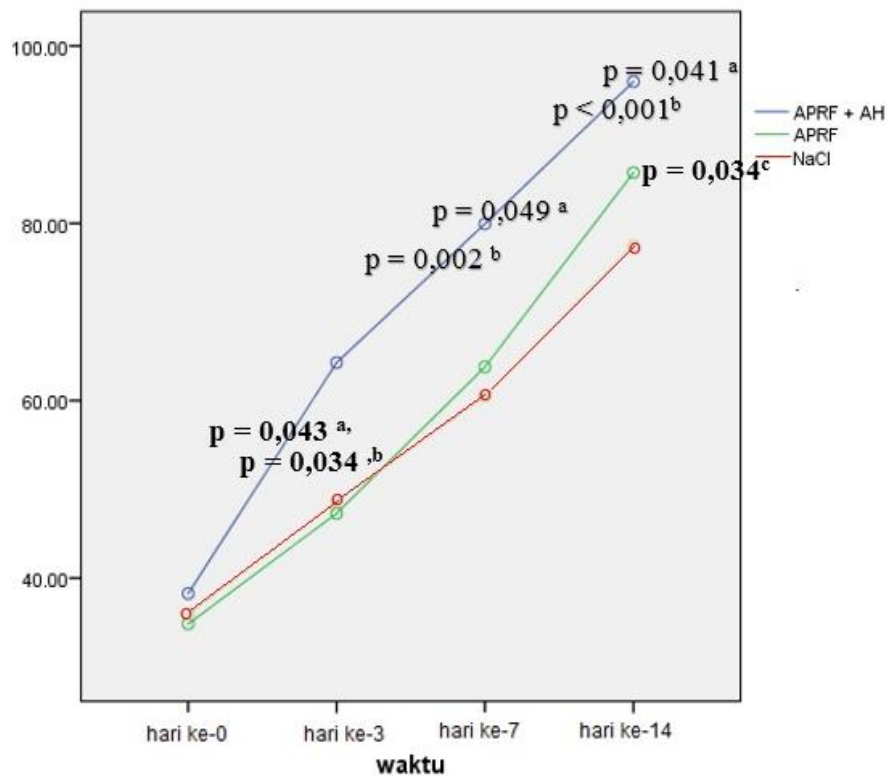
Data rerata (SB), uji anova

Beda bermakna Indeks Granulasi, A-PRF + AH dibandingkan kelompok A-PRF hari ke-3 ($p = 0,043$) m hari ke-7 ($p = 0,049$) dan hari ke-14 ($p = 0,041$), uji mann whitney

Beda bermakna **Indeks Granulasi**, A-PRF + AH dibandingkan kelompok kontrol hari ke-3 ($p = 0,034$), hari ke-7 ($p = 0,002$), dan ke-14 ($p < 0,001$).

Beda tidak bermakna **Indeks Granulasi**, A-PRF dibandingkan kelompok kontrol hari ke-3 ($p = 0,940$) dan ke-7 ($p = 0,650$) namun bermakna di hari ke-14 ($p = 0,034$)

Gambar 4.4. menunjukkan beda persentase Indeks granulasi (% IG) antara sub kelompok A-PRF + AH dibandingkan kelompok A-PRF atau NaCl pada hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14. Didapatkan peningkatan bermakna % IG pada kelompok A-PRF + AH dibanding A-PRF dan NaCl pada hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke 14. Kelompok A-PRF dibanding NaCl, peningkatan IG hanya setelah hari ke -14.



Gambar 4.4. Perubahan % IG Berdasarkan Intevensi yang Berbeda

^a IG kelompok A-PRF + AH dibandingkan A-PRF, uji Mann Whitney

^b IG kelompok A-PRF + AH dibandingkan kontrol, uji Mann Whitney

^c IG kelompok A-PRF dibandingkan kontrol, uji Mann Whitney

Gambar 4.5. menunjukkan tahapan pembuatan kombinasi A-PRF + AH dari tahapan pembuatan A-PRF, pencampuran AH dengan mesin *vortex*. Setelah terbentuk kombinasi A-PRF + AH, bentuk tersebut diaplikasikan pada luka (Gambar 4.6.). Setiap kali kontrol pasien dilakukan pengambilan gambar sesuai dengan kelompoknya yaitu kelompok A-PRF + AH (Gambar 4.7.), A-PRF (Gambar 4.8.) dan kelompok kontrol (Gambar 4.9.). Pengukuran luas luka dan indeks granulasi menggunakan ImageJ (Gambar 4.10).



Gambar 4.5. Tahapan Pembuatan A-PRF + AH



Gambar 4.6. Kombinasi A-PRF+AH pada LKD Pra-tibia



Gambar 4.7. Pengobatan LKD dengan Krim Kombinasi A-PRF + AH

Seorang laki-laki berusia 36 tahun mengalami cedera pretibial dan tidak ada perbaikan luka selama perawatan 4 bulan di kaki kanan. Setelah diberikan Kombinasi A-PRF + AH selama 14 hari, luka mengalami perbaikan.

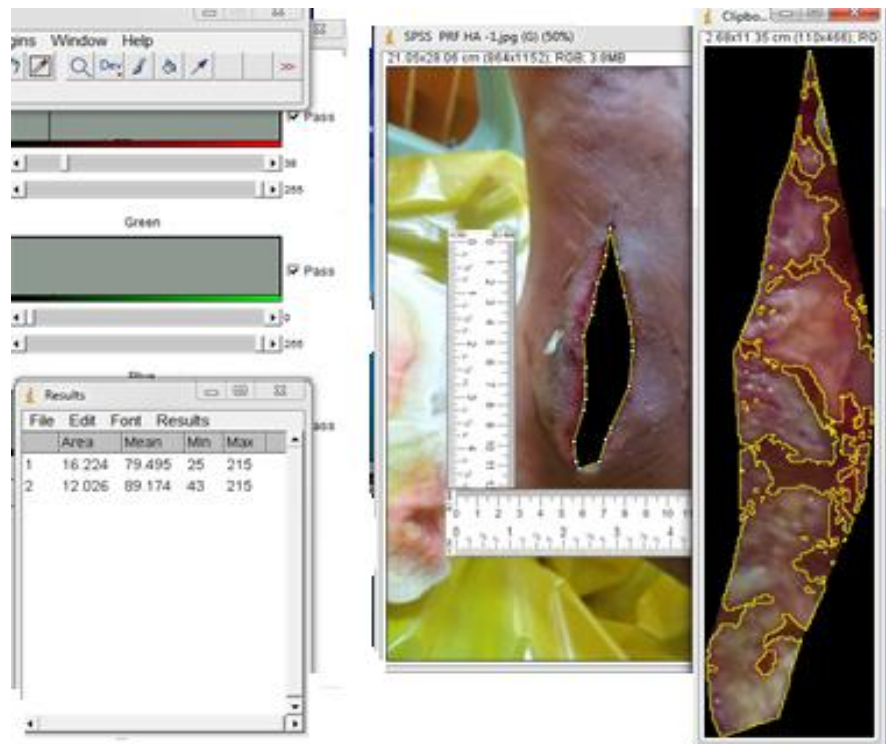


Gambar 4.8. Seorang laki-laki sehat berusia 40 tahun mengalami luka di dorsum pedis. Pengobatan LKD dengan topikal A-PRF pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14.



Gambar 4.9. Pengobatan LKD dengan Kompres NaCl 0,9% (Kontrol)

Laki-laki 54 tahun dengan LKD di pretibial. Penyandang mendapat perawatan luka dengan kasa NaCl 0,9% (kontrol). Didapatkan peningkatan IG dan kontraksi luka.



Gambar 4.10. Ukuran Luas Luka, Indeks Granulasi Menggunakan Image-J

4.6 Perbedaan Skor Nyeri pada Subjek LKD

Numeric Pain Score (NPS) pada pemeriksaan awal ketiga kelompok adalah 7–8 (nyeri berat). Setelah intervensi, skor nyeri menurun pada ketiga kelompok namun pada kelompok A-PRF + AH terjadi penurunan bermakna pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 dibandingkan kedua kelompok lainnya (Tabel 4.11.).

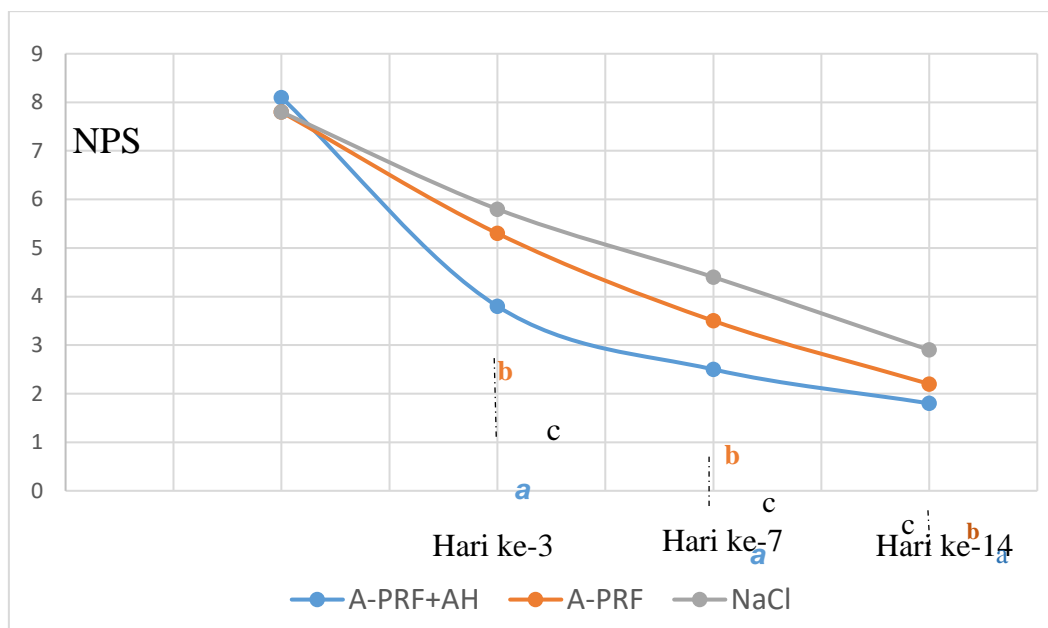
Tabel 4.11. Perbedaan Skor NPS pada LKD Berdasarkan Perlakuan

Waktu Intervensi	A-PRF + AH (n = 10)	A-PRF (n = 10)	Kontrol (n = 10)	p
Sebelum perlakuan	8 (8-9)	8 (7-8)	8 (7-8)	0,164
Hari ke-3 perlakuan	4 (3-5)	5 (5-6)	6 (5-6)	< 0,001*
Hari ke-7 perlakuan	2,5 (1-3)	3 (3-5)	5 (3-5)	0,002*
Hari ke-14 perlakuan	2 (2-3)	2 (2-3)	3 (2-3)	0,002*

Median (min-max)

*A-PRF + AH berbeda bermakna dibandingkan A-PRF saja atau kontrol

Pada analisis sub kelompok, skor nyeri kelompok A-PRF + AH dibandingkan kontrol menurun bermakna pada hari ke-3 ($p < 0,001$), hari ke-7 ($p = 0,007$) dan ke-14 ($p = 0,002$). Pada kelompok A-PRF dibandingkan kontrol, NPS tidak menurun bermakna pada hari ke-3 ($p = 0,063$), namun menurun bermakna pada hari ke-7 ($p = 0,035$) dan ke-14 ($p = 0,007$). Pada kelompok A-PRF + AH, didapatkan penurunan NPS bermakna dibandingkan A-PRF saja pada hari ke-3 ($p < 0,001$) dan hari ke-7 ($p = 0,029$), namun menurun tidak bermakna hari ke-14 ($p = 0,957$). (Gambar 4.11.).

**Gambar 4.11. Numeric Pain Scale (NPS) pada LKD setelah Intervensi**

^a NPS pada A-PRF + AH dibandingkan kontrol, pada hari ke-3 ($p < 0,001$), hari ke-7 ($p = 0,007$), hari ke-14 ($p = 0,002$) uji Mann Whitney

^b NPS pada A-PRF dibandingkan kontrol pada hari ke-3 ($p = 0,063$), hari ke-7 ($p = 0,035$), hari ke-14 ($p = 0,007$) uji Mann Whitney

^c NPS pada A-PRF + AH dibandingkan A-PRF pada hari ke-3 ($p < 0,001$), hari ke-7 ($p = 0,029$), hari ke-14 ($p = 0,957$) uji Mann Whitney

4.7 Penghitungan Jumlah Sampel dan Power Penelitian

Dengan menggunakan rumus beda dua rerata tidak berpasangan:

$$n1 = n2 = \frac{2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \sigma}{(x1 - x2)^2}$$

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

t : derajat bebas = $n_1 + n_2 - 2$

$n1$ = jumlah sampel minimal kelompok 1

$n2$ = jumlah sampel minimal kelompok 2

$Z(1-\alpha)$ = Nilai Z pada distribusi normal dengan $\alpha = 5\%$ dua sisi = 1.96

$Z(1-\beta)$ = nilai Z pada distribusi normal dengan $\beta = 10\% = 1.28$

$x1$ = nilai rerata kelompok 1

$x2$ = nilai rerata kelompok 2

$x1 - x2$ = adalah selisih nilai antara rerata kelompok 1 dan 2 yang dianggap bermakna

δ = SD gabungan kelompok 1 dan 2

Tabel 4.12. Penghitungan Jumlah Sampel Berdasarkan Penelitian

Marker Penyembuhan dan Luas luka	$Z\alpha$	$Z\beta$	$x_1 - x_2$	SD	n
<i>Marker Penyembuhan luka</i>					
VEGF	1,96	1,282	1123,87	1256,74	27
IL-6	1,96	1,282	131,28	653,24	121
PDGF	1,96	1,282	7,91	34,37	197
<i>Luas luka (Image-J)</i>	1,96	1,282	20,28275	7,787	4

Besar sampel ditentukan dengan beda dua rerata tidak berpasangan minimal besar sampel optimal adalah 27 untuk masing masing kelompok, dengan power penelitian $(1-\beta) = 20\%$.

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Karakteristik Demografi Subjek Penelitian

Meningkatnya prevalensi kejadian DM berpotensi menyebabkan komplikasi luka kaki diabetes. Menurut laporan International Diabetes Federation (IDF) jumlah kejadian LKD adalah kasus 9,1 juta hingga 26,1 juta penderita setiap tahunnya.⁸⁹ Angka kejadian LKD cenderung meningkat pada lansia dan wanita karena faktor degeneratif dan hormonal. Penelitian ini menunjukkan rerata usia subjek 62,6 ± 14,1 tahun (kisaran 29–81 tahun). Walaupun perempuan lebih banyak dari laki laki (2 : 1) namun faktor jenis kelamin pada ketiga kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Penelitian di Provinsi Guangdong dengan subjek 5000 penyandang DM, menunjukkan usia ≥ 65 tahun merupakan salah satu faktor risiko LKD (OR = 1,016, 95% CI = 1,008-1,024)²³. Namun penelitian lain ada yang melaporkan usia subjek LKD yang lebih muda yaitu usia 45 tahun. Penyandang DMT2 dengan usia ≥ 45 tahun memiliki risiko LKD 27,6 kali lebih besar dibandingkan dengan usia < 45 tahun.⁷⁰ Menurut penelitian Abdisa *et al.*⁹², pada penyandang DM, faktor usia berkaitan dengan terjadinya LKD. Penyandang DM usia > 50 tahun mempunyai risiko terjadinya LKD 4,8x lebih besar dibandingkan penyandang DM usia < 30 tahun, sedangkan untuk usia 30–39 tahun, dan 40–49 tahun memiliki risiko terjadi LKD masing masing sebesar 2,5 x dan 4,4 x.

Pengaruh jenis kelamin pada ulkus kaki telah menjadi kontroversi, dengan beberapa penelitian menunjukkan jenis kelamin laki-laki sebagai faktor risiko, sementara penelitian lain tidak menunjukkan perbedaan. Walaupun wanita memiliki risiko lebih rendah dibandingkan pria untuk ulserasi kaki, namun wanita dengan faktor risiko ulserasi kaki (obesitas, tekanan kaki bagian bawah, peningkatan mobilitas sendi) harus dianggap memiliki risiko yang sama dengan pria untuk berkembang menjadi LKD.⁹²

Pada penelitian ini 68% subjek penelitian adalah wanita penyandang DMT2 disertai obesitas dengan nilai rerata IMT adalah 28,2 kg/m. Obesitas juga merupakan faktor risiko terjadinya resistensi insulin. Peningkatan resistensi insulin penyandang DMT2 akibat dari obesitas akan memperlambat penyembuhan LKD⁹³

Pada penelitian ini juga didapatkan 90% usia subjek sudah memasuki usia menopause. Pada penyandang DMT2 dengan menopause akan terjadi penurunan kadar hormon estrogen dan progesteron yang memengaruhi resistensi insulin dan akan meningkatkan kadar glukosa darah karena adanya perubahan kepekaan reseptor insulin pada sel pankreas. Pada kadar estrogen tinggi, sel-sel menjadi lebih sensitif terhadap insulin, namun ketika estrogen rendah dan progesteron tinggi, sel sel tubuh menjadi resisten terhadap insulin. Keadaan itu menyebabkan tubuh membutuhkan insulin lebih banyak untuk membantu sel menyerap glukosa darah dan meningkatkan kadar glukosa darah. Hiperglikemia yang berlangsung lama akan meningkatkan risiko komplikasi kronik menjadi lebih besar dan berakibat LKD mengalami hambatan penyembuhan.⁹⁴

5.1.1 Lama Diabetes Melitus

Komplikasi LKD berhubungan dengan lama menyandang DM akibat makro dan mikroangiopati yang menyebabkan terjadinya neuropati perifer yang merupakan patofisiologi utama terjadinya kerusakan pada LKD.⁹⁵ Pada DMT2 sebanyak 2–39% penyandang DM mengalami komplikasi retinopati diabetik, 81,8% nefropati, 5–13% neuropati, dan 8% dengan penyakit kardiovaskular.⁹⁶

Subjek penelitian ini mengalami LKD lebih dari 1 bulan dan mendapat terapi standar sebelum diikutkan pada penelitian. Subjek pada penelitian ini rata-rata menderita DMT2 lebih dari 5 tahun dengan kendali glukosa darah yang tidak teratur. Makin lama luka, risiko penyembuhan makin panjang. Proses penyembuhan luka dipengaruhi lamanya DM. Makin lama seseorang menderita DM, proses penyembuhan lebih lama karena adanya kerusakan pembuluh darah, dan penurunan *growth factor*. Dari laporan RISKESDA 2018 disebutkan 4,1% dari penyandang DM, sebelumnya tidak mengetahui kalau mengalami DMT2 dan datang ke poliklinik dengan luka yang lama sembuh.³

Selain faktor lamanya diabetes proses penyembuhan luka juga dipengaruhi kendali glukosa darah.⁹⁸ Kondisi ini dapat terjadi karena kadar glukosa darah yang melebihi batas nilai normal akan menyebabkan mikroangiopati akibat produksi AGE. Pada penelitian ini didapatkan sebagian besar subjek menunjukkan glukosa darah yang tidak terkontrol. Hal tersebut ditunjukkan dengan rerata glukosa darah sewaktu

279,9 (SB 60,35) mg/dL dengan HbA1C 9,65% (SB 0,90). Nilai HbA1C yang melebihi batas normal menunjukkan kendali glukosa darah yang tidak baik dalam 3 bulan terakhir dan kondisi ini akan memengaruhi penyembuhan LKD, serta meningkatkan risiko mengalami amputasi.⁹⁹

Diperkirakan 15% penyandang DM sepanjang hidupnya akan menderita LKD bila faktor komorbid DM tidak terkontrol. Data RSCM 2011 menunjukkan komplikasi LKD dijumpai pada 8,7% dari total penyandang DM yang dirawat, dengan angka amputasi 30% dan mortalitas 32%.¹⁰⁰ Agar penyembuhan LKD tidak mengalami hambatan, maka beberapa faktor penghambat harus dikendalikan seperti kadar glukosa darah dan infeksi.

Data awal penelitian ini menunjukkan kelompok A-PRF AH memiliki kadar glukosa darah dan HbA1C yang lebih tinggi dari kedua kelompok lainnya walaupun secara statistik tidak bermakna, dengan masing-masing nilai p adalah 0,104 dan 0,950 (Tabel 4.1.). Namun secara klinis perbedaan tersebut cukup memberikan kontribusi pada penyembuhan LKD yang sangat dipengaruhi oleh kadar glukosa darah. Pada LKD yang mengalami gangguan penyembuhan biasanya disertai hiperglikemia yang berkepanjangan sehingga dapat menyebabkan peningkatan glikosilasi non enzimatis pada berbagai organ termasuk pembuluh darah kapiler dan pembuluh darah di jaringan luka serta menghambat proses penyembuhan luka normal. Pada penelitian ini walaupun kelompok A-PRF+HA mempunyai kadar glukosa darah dan HbA1C yang lebih tinggi dari kelompok lainnya, namun penambahan AH dapat memberikan kontribusi untuk membantu percepatan pembentukan jaringan granulasi pada penyembuhan luka melalui jalur peningkatan angiogenesis serta penurunan inflamasi. Asam Hialuronat mempunyai sifat sebagai anti inflamasi, migrasi sel, serta menghambat peradangan.⁸⁴

Patofisiologi kombinasi AH dengan PRP pada kasus OA untuk menurunkan inflamasi sejalan dengan penambahan AH pada PRF dalam menurunkan inflamasi pada LKD.⁸⁵

Mekanisme lain yang dapat menghambat penyembuhan LKD adalah peningkatan stres oksidatif yang dipengaruhi oleh faktor lamaya menyandang diabetes. Peningkatan stres oksidatif akan menyebabkan gangguan proliferasi selular sampai terjadinya apoptosis.

Di samping itu terjadi pula gangguan pada interaksi selular dengan matriks ekstraselular (ECM). Ketidakseimbangan protein matriks dan inhibitorynya dapat menyebabkan degradasi matriks yang disebabkan oleh enzim proteolitik. Terjadi peningkatan MMP, terutama MMP-1, MMP-2, MMP-8, dan MMP-9, dan sitokin proinflamasi seperti *interleukin-1* (IL-1) dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) yang dilepaskan oleh neutrofil dan makrofag. Keadaan ini menghambat pembentukan jaringan granulasi seperti pada DMT2 dan komplikasi vaskular lainnya.¹⁰²

Pada penelitian ini 86% subjek LKD menderita DMT2 lebih dari 10 tahun dengan kendali glukosa darah yang tidak teratur. Keadaan hiperglikemia kronik juga menyebabkan penurunan fleksibilitas sel darah merah pada saat melewati pembuluh darah kapiler akibat kekakuan pada dinding sel darah merah itu sehingga pelepasan oksigen dari kapiler ke jaringan menurun.¹⁰³ Di samping menyebabkan gangguan fleksibilitas sel darah merah, hiperglikemia juga memengaruhi fungsi fagositosis sel makrofag, penurunan imunitas selular, penurunan berbagai macam faktor pertumbuhan serta gangguan mobilisasi EPC dari sumsum tulang menuju ke daerah luka.¹⁰⁴ Di samping itu hiperglikemia juga dapat meningkatkan risiko infeksi karena dapat menyebabkan peningkatan kepekaan makrofag terhadap sitokin, sehingga mengurangi kemampuan fagositosis dan fungsi bakterisida. Hal tersebut berkaitan dengan adanya penurunan cadangan glikogen pada sel dan berkurangnya kemampuan glikolisis. Penurunan fungsi makrofag pada hiperglisemia kronik juga akan menghambat polarisasi makrofag 1 (M1) yang bersifat proinflamasi menjadi M2 yang bersifat anti inflamasi yang diperlukan pada penyembuhan luka.¹⁰⁵

Parameter lain untuk memprediksi penyembuhan LKD adalah HbA1C yang berkorelasi dengan rerata kadar glukosa darah pada periode 3 bulan. Kecepatan proses penyembuhan LKD akan terhambat pada kadar HbA1C yang tinggi. Kadar HbA1c antara 7,0 –8,0 % dapat meningkatkan proses penyembuhan LKD (OR 2,01; 95% CI 1,02–3,96, $p < 0,05$) dibandingkan pada HbA1C > 8 % (yang setara dengan glukosa darah acak rata-rata > 180 mg/dL) tanpa menyebabkan peningkatan mortalitas.⁹⁸ Kadar HbA1C yang tinggi mengakibatkan peningkatan risiko kerusakan jaringan berupa mikroangiopati, neuropati, serta menurunkan kadar GF yang sangat diperlukan pada proses penyembuhan luka.¹⁰⁶

Hemoglobin terglikosilasi (HbA1c) adalah bentuk hemoglobin yang diukur dengan mengidentifikasi rerata konsentrasi glukosa plasma selama periode waktu yang lama. (120 hari sebelumnya). Didapatkan korelasi positif linier yang bermakna antara kadar HbA1c dan glukosa darah sewaktu ($p < 0,001$). Pengaruh lain tingginya kadar HbA1C adalah peningkatan kadar trigliserida dan kolesterol yang akan menyebabkan disfungsi sel endotel sehingga produksi NO sebagai vasodilator akan menurun.¹⁰⁹

Studi lain dilakukan di Manjunath *et al.*¹⁰⁸ menunjukkan hal yang tidak jauh berbeda. Subjek dengan HbA1 C di atas 7 mengalami risiko infeksi yang menyebabkan luka sulit sembuh. Hal ini disebabkan pada HbA1C $> 9,1\%$ pasien akan mengalami gangguan respons imun dan berkaitan dengan peningkatan sitokin inflamasi yang akan mempermudah terjadinya infeksi.

Sementara itu Dave *et al.*¹⁰⁹ menyatakan bahwa individu dengan HbA1c 5,6% memiliki penyembuhan luka $0,35 \text{ cm}^2$ per hari sedangkan HbA1c 11,1% angka penyembuhan luka $0,001 \text{ cm}^2$ per hari. Hal tersebut menunjukkan HbA1c berbanding terbalik dengan tingkat penyembuhan.^{99,109} Setiap kenaikan 1% pada HbA1c, laju penyembuhan area luka per hari berkurang $0,028 \text{ cm}^2$. Shashanka¹⁰⁶, mendapatkan HbA1c antara 7,0 dan 8,0%, nilai rerata penyembuhan LKD adalah $0,157 \text{ cm}^2$ per hari (95% CI: 0,003–0,312) sedangkan individu dengan HbA1c $\geq 8,0\%$, nilai rerata penyembuhan luka $0,028 \text{ cm}^2$ per hari (0,051–0,107).

Pada penelitian ini walaupun kelompok A-PRF + AH memiliki nilai rerata HbA1C ($11,34 \pm 1,30\%$) yang lebih tinggi dibandingkan kelompok A-PRF ($9,0 \pm 0,68\%$) dan kontrol ($8,5 \pm 0,72\%$), namun perbedaan nilai HbA1 C kelompok A-PRF + AH tidak berbeda bermakna ($p = 0,950$). Walaupun kelompok A-PRF + AH memiliki kadar HbA1 lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, namun penambahan AH pada A-PRF membantu pembentukan jaringan granulasi lebih cepat dibandingkan kelompok lainnya, karena AH berfungsi sebagai pengendali situasi inflamasi kuat di permukaan LKD.

5.1.2 Faktor Komorbid

Faktor lain yang dapat mengganggu proses penyembuhan LKD adalah adanya faktor komorbid seperti hipertensi, merokok dan obesitas. Pada penelitian ini didapatkan

beberapa faktor komorbid antara lain hipertensi sebanyak 43,1%, obesitas 26,6% dengan IMT rata rata 28,3 kg/m² dan merokok 13,3%. Subjek yang mempunyai dua komorbid 16,7%. (Tabel 4.1.). Menurut *American Diabetes Association (ADA)* 2020, faktor komorbid DM adalah obesitas (81%), hipertensi (73%), hiperkolesterol (37,7%), penyakit ginjal kronik (37%) dan merokok (15%).⁹⁵

Hipertensi pada DM terjadi melalui patogenesis yang kompleks. Penelitian di RSUD M Djamil Padang menunjukkan bahwa sebagian besar penyandang DM tipe 2 memiliki komorbid hipertensi yaitu 54 orang atau 69,2%. Selain itu, disebutkan juga penyandang DMT2 dengan komorbid hipertensi mengalami ulkus diabetikum lebih banyak yaitu sebanyak 53 (p=0,004, uji chi-square).⁶⁷ Hipertensi dengan tekanan darah (TD) > 130/80 mmHg) berhubungan dengan kejadian LKD (p = 0,001) dan merupakan faktor risiko (OR = 13,7; 95%CI = 3,03–62,18), artinya penyandang DM tipe 2 yang menderita hipertensi memiliki kemungkinan menderita LKD 13,7 kali lebih besar dibandingkan penyandang DM tipe 2 yang tidak menderita hipertensi. Penyandang DM dengan hipertensi dapat mengakibatkan disfungsi endotel sehingga kadar NO menurun dan memicu terjadinya adhesi-agregasi trombosit sehingga menyebabkan hipoksia jaringan dan memicu LKD.¹⁰⁷ Selain itu hipertensi pada LKD juga dapat menyebabkan kekakuan dinding pembuluh darah terutama mikrovaskular sehingga mengganggu fleksibilitas bentuk sel darah merah pada saat keluar dari kapiler menuju jaringan serta menghambat pergerakan leukosit yang diperlukan pada penyembuhan luka¹⁰⁸

Pada penelitian ini 68% subjek penelitian adalah wanita penyandang DMT2 disertai obesitas dengan nilai rerata IMT adalah 28,2 kg/m. Obesitas sangat berpengaruh terhadap penyembuhan LKD.¹⁰⁹ Pasien obesitas dengan IMT > 30 kg/m² memiliki odd rasio 1.113 mengalami penyembuhan yang lebih lama dibandingkan dengan pasien non-obesitas.¹¹² Pada pasien dengan obesitas akan terjadi resistensi insulin, inflamasi kronik dan pelepasan interleukin yang banyak dari lemak *adipose* sehingga terjadi infiltrasi makrofag pada jaringan adiposa, hati, otot, dan pankreas yang memproduksi sitokin pro-inflamasi, yang bertindak secara autokrin dan parakrin untuk mengganggu pensinyalan insulin di jaringan perifer atau menyebabkan disfungsi sel β dan defisiensi insulin.¹¹³

Penyandang DMT2 dengan LKD, 61% mengalami penyembuhan sempurna pada berat badan normal sedangkan 49% akan sembuh dalam waktu 7 bulan pada berat badan obesitas. Hal tersebut karena penyandang DM dengan obesitas berisiko *pes planus* akibat beban berlebihan yang ditumpukkan di arkus pedis.¹¹⁴ Obesitas, terutama dengan IMT lebih dari 30 kg/m², dapat memperberat risiko terjadinya deformitas pada kaki diabetes sehingga dapat menurunkan status fungsional kaki saat berjalan.⁹³ Adanya deformitas kaki pada DMT2 dengan obesitas dapat meningkatkan kejadian LKD sebesar 42,09 kali lebih besar dibandingkan penyandang DMT2 yang tidak mengalami deformitas kaki. Berbagai penelitian menunjukkan, obesitas pada DMT2 dapat mengganggu penyembuhan luka sehingga luka menjadi kronik. Peradangan kronik yang terjadi di permukaan luka disertai dengan tingginya *weigh bearing* dapat meningkatkan hambatan pada penyembuhan luka.¹¹⁵ Penelitian ini sejalan dengan studi di Singapura yang menyatakan bahwa deformitas merupakan risiko yang berhubungan dengan LKD.⁷⁰ Abdisa *et al.*⁹² melaporkan terdapat hubungan antara peningkatan berat badan dan peningkatan tekanan plantar dalam pengaturan kaki "normal". Penurunan berat badan dapat mengurangi tekanan kaki plantar dan berpotensi mengurangi perkembangan ulserasi pada penyandang neuropatik. Penyandang DM dengan IMT 25–29,9 kg/m², memiliki risiko lima tahun terkena ulkus kaki diabetik 1,4 kali lebih besar dibandingkan IMT normal (kriteria WHO).¹⁰⁹

Wanita dengan Indeks Masa Tubuh (IMT) 30 kg/m² memiliki risiko 28 kali lebih besar untuk mengalami diabetes dibandingkan wanita dengan berat badan normal. Risiko diabetes akan meningkat 93 kali lebih besar pada IMT 35 kg/m² dibandingkan wanita berat badan normal.¹¹⁵ Kondisi ini diperberat dengan adanya obesitas dan kurang melakukan aktivitas fisis yang sering dijumpai pada perempuan. Dengan korelasi pearson terlihat bahwa faktor-faktor seperti usia, jenis kelamin dan tingkat aktivitas fisis yang berbeda mempunyai korelasi bermakna dengan IMT. Semakin tinggi tingkat aktivitas fisis di salah satu domain, semakin rendah IMT pada wanita ($r = -0,578$, $p < 0,01$).¹¹⁶ Didapatkan hubungan antara obesitas dengan hambatan penyembuhan LKD yang berkaitan dengan keadaan proinflamasi dengan peningkatan akumulasi sel inflamasi. Penyandang DMT2

dengan komorbid obesitas juga mengalami penurunan fungsi leukosit sehingga mudah terjadi infeksi.

Pada obesitas, penyembuhan luka tertunda dikaitkan dengan perubahan struktur jaringan lemak di sekitar luka, ketidakcukupan aliran darah ke daerah luka, stres oksidatif, dengan perubahan mediator imun.¹¹⁷ Hal ini diperberat terjadinya risiko peningkatan resistensi insulin pada pasien obesitas. Obesitas dikaitkan dengan peningkatan risiko pengembangan resistensi insulin dan DM2.¹¹⁸ Pada obesitas, jaringan adiposa melepaskan sejumlah asam lemak non-esterifikasi, gliserol, hormon, sitokin pro-inflamasi dan faktor lain yang terlibat dalam pengembangan resistensi insulin.¹¹⁹ Penyandang obesitas yang mengalami peningkatan resistensi insulin akan mengalami gangguan pembentukan jaringan granulasi pada LKD. Hal ini berkaitan dengan dengan penurunan sebagian besar faktor pertumbuhan, termasuk TGF- β , PDGF, dan IGF-1, serta peningkatan sitokin proinflamasi, seperti TNF- α dan IL-1 β . Selain itu, gangguan penyembuhan berkaitan dengan disregulasi pergantian kolagen, termasuk peningkatan MMP dan penurunan aktivitas penghambat jaringan metaloproteinase (TIMP) serta penurunan angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, dan deposisi kolagen¹²⁰

Merokok merupakan salah satu faktor komorbid lain pada penyandang DM2 dengan LKD. Pada penelitian ini didapatkan 5 subject (16,7%) yang mempunyai kebiasaan merokok. Merokok cukup memberikan kontribusi pada lama penyembuhan LKD pada subjek tersebut, karena didapatkan LKD dengan hambatan penyembuhan luka. Penelitian di RS Karyadi Semarang menunjukkan di antara 70 penyandang DM2 yang dirawat, 35 orang di antaranya (50%) dengan LKD, dan 71,4% dari penyandang LKD tersebut mempunyai kebiasaan merokok. Berdasarkan analisis bivariat menunjukkan merokok mempunyai faktor risiko LKD sebesar 3,33 kali ($p = 0,030$).⁸

Studi dari Xia *et al.*¹²¹ menyebutkan asap rokok berisi lebih 4.000 racun berbeda. Meskipun sulit untuk diidentifikasi toksin spesifik mana yang berbahaya terhadap penyembuhan luka, namun nikotin, tar, karbonmonoksida dan hidrogen sianida adalah elemen yang berkontribusi pada lingkungan untuk penyembuhan luka yang buruk.

Pada meta-analisis Xue *et al.*¹²² pada 18 studi, didapatkan hubungan antara merokok dan penyembuhan luka kaki diabetik, tingkat kesembuhan kelompok perokok rata-rata 62,1%, (20,0–89,6%) dibandingkan kelompok non-perokok, tingkat kesembuhan rata-rata 71,5%, (40,2–93,8%). Hubungan yang bermakna antara merokok dan penyembuhan luka kaki diabetik ($z = 3,08$; $p = 0,002$), dengan rasio odds (OR) 0,70 (95% CI = 0,56–0,88), menunjukkan merokok memiliki efek negatif secara keseluruhan pada penyembuhan luka penderita kaki diabetes

Merokok sigaret telah dilaporkan dikaitkan dengan diabetes dan komplikasi makrovaskularnya serta mikrovaskular berhubungan dengan neuropati perifer, perubahan vaskular sehingga mengganggu penyembuhan luka. Satu mekanisme yang mendasari adalah stres oksidatif di dalam sel yang diinduksi merokok. Stres oksidatif mengakibatkan kerusakan sel pada neuropati diabetik ditandai dengan tingginya tingkat generasi spesies oksigen reaktif (ROS) termasuk ozon, superoksida, hidrogen peroksida, oksigen singlet, dan peroksida organik sel yang merusak sistem saraf.¹²²

Asap rokok dapat memperburuk neuropati diabetik melalui reaksi oksidatif. Sebagai sumber radikal bebas dan oksidan, asap rokok dapat menyebabkan stress oksidatif stres di banyak organ termasuk sistem saraf dan pembuluh darah, yang menyebabkan kerusakan sel serta apoptosis. Asap rokok mengandung “glikotoksin” yang merupakan produk glikasi yang sangat reaktif yang dapat dengan cepat menginduksi pembentukan AGE di luar sel. Peningkatan protein dan lipid yang dimodifikasi dalam sirkulasi perokok mengikat reseptor untuk AGE (RAGE), yang mengaktifkan NADPH oksidase dan ekspresi pro-inflamasi. Jadi salah satu penjelasan mengapa rokok menghambat penyembuhan LKD adalah karena peningkatan inflamasi. Merokok memperlambat aliran darah di kulit dan memperlambat penyerapan insulin ke dalam darah serta mengurangi efektivitas kerja insulin sehingga risiko LKD pada penyandang DM yang merokok lebih besar dibandingkan yang tidak merokok.¹²³

Berdasarkan penelitian metanalisis oleh Liu¹²⁴, delapan studi (lima studi kohort dan tiga studi kasus kontrol), menunjukkan bahwa merokok secara bermakna meningkatkan risiko amputasi kaki diabetik (OR = 1,65; 95% CI, 1,09–2,50; $p < 0,001$) dibandingkan dengan non-merokok.

Selain meningkatkan risiko terjadinya LKD, merokok juga dapat memengaruhi proses penyembuhan LKD karena adanya gangguan makro dan mikro vaskular yang menyebabkan terjadinya penurunan respons vasodilatasi sehingga menurunkan aliran darah sampai sekitar 50%. Nikotin yang terkandung di dalam rokok akan dapat menyebabkan kerusakan endotel kemudian terjadi penempelan dan agregasi trombosit yang selanjutnya terjadi kebocoran sehingga lipoprotein lipase akan memperlambat lemak darah dan mempermudah timbulnya aterosklerosis. Aterosklerosis berakibat insufisiensi vaskular sehingga aliran darah ke arteri dorsalis pedis, poplitea, dan tibialis juga akan menurun.¹²⁴

Selain itu, merokok menyebabkan pembentukan ROS dalam leukosit sehingga memudahkan terjadinya agregat trombosit di sirkulasi yang dapat melekat di endotel kapiler. Kondisi iskemia ini diperberat oleh adanya peradangan lokal.¹²⁵ Merokok menyebabkan pembentukan produk akhir glikasi lanjutan (AGEs) dan menghambat pensinyalan insulin melalui jalur NF-E2-related factor 2 (Nrf2) yang menyebabkan stres oksidatif, stres retikulum endoplasma, disfungsi mitokondria, kerusakan asam deoksiribonukleat (DNA) dan apoptosis pada neuron perifer. Selain itu merokok juga menyebabkan aktivasi sistem adrenergik yang menyebabkan vasokonstriksi kapiler.¹²²

5.1.3 Karakteristik Luka Kaki Diabetes

Lokasi LKD sangat ditentukan oleh patomekanisme LKD yaitu neuropati diabetik (sensorik, motorik dan autonom), gangguan perfusi jaringan akibat angiopati, mobilitas sendi terbatas, dan peningkatan tekanan plantar akibat kelainan biomekanik yang terjadi pada telapak kaki. Pada penelitian ini didapatkan lokasi luka terbanyak dijumpai di *digiti* yaitu 13 subjek (43,3%), diikuti di kaki depan sebanyak 11 subyek (36,6%), di telapak kaki 6 subyek (20%) dan tumit 3 subyek (10%) subjek.

Penelitian Pit hova¹²⁶ dalam interval 5 tahun, 835 ulkus diabetes dibagi menjadi 3 kelompok menurut penyebabnya yaitu neuropatik, neuroiskemik dan iskemik. Pada kelompok neuropatik sebagian besar ulkus ditemukan pada permukaan plantar jari kaki (40,4%) dan pada daerah kepala metatarsal plantar (39,1%); sebaliknya,

kelompok iskemik memiliki lokasi paling sering di ujung jari kaki (63,6%), sedangkan kelompok neuroiskemik memiliki ulkus terbanyak yang tersebar di permukaan plantar dan ujung jari kaki (51,8%). Distribusi LKD sangat bergantung pada etiologi ulkus ($p < 0,001$), yaitu lebih dari 75% dari semua ulkus terletak di area jari kaki dan kaki depan.

Hal ini berbeda dengan penelitian oleh Zeine⁹⁶, yang menunjukkan karakteristik LKD di Sydney Australia, lokasi luka 36,4% pada *forefoot* dan $> 45,1\%$ terletak pada plantar / telapak kaki. Kondisi ini berhubungan dengan obesitas (IMT 28,3%) pada masyarakat Sydney sehingga terjadi peningkatan tekanan berat badan, kelainan biomekanik akibat kelainan neuromotorik sehingga beban berat badan banyak menumpuk pada daerah kaki depan terutama pada saat berjalan.

Obesitas merupakan salah satu faktor yang menentukan lokasi dan faktor penentu penyembuhan LKD, melalui tekanan berat badan titik tumpu telapak kaki pada saat berjalan (*weigh gait bearing*). Pada penelitian ini dijumpai sebanyak 8 subjek obesitas (26,6%), sehingga lokasi LKD di telapak kaki hanya 6 subjek (20%).

Lokasi LKD dapat memengaruhi penyembuhan luka. Lokasi luka yang terletak di ujung jari dan kaki depan dapat terjadi akibat beban tekanan yang terjadi pada saat berjalan. Selain itu terdapat juga adanya pengaruh aliran darah yang menurun pada ujung jari dan telapak kaki bagian depan sehingga pembentukan jaringan granulasi akan terhambat. Penelitian pada luka tikus DM oleh Dave *et al.*¹⁰⁹, menunjukkan adanya hubungan antara hiperglisemia, kadar serum lipid dan penurunan aliran darah di daerah luka yang dapat menyebabkan hambatan proses penyembuhan. Selain penurunan aliran darah kondisi ini dapat juga terjadi karena respons inflamasi luka yang tinggi, produksi ROS dan MMP yang berlebihan dan berkepanjangan.¹²⁶

5.1.3.1 Pengambilan Bahan Pemeriksaan ELISA pada LKD

Penyembuhan LKD dapat dinilai secara klinis dan pemeriksaan biomarker. Beberapa pemeriksaan klinis yang dapat dinilai adalah pengecilan luas luka, pertumbuhan jaringan granulasi, hilangnya jaringan nekrotik dan epitelialisasi.⁶⁸ Selain itu dapat juga dinilai berdasarkan pemeriksaan biomarker

seperti *growth factor*, produk oksidan, inflamasi dan antiinflamasi.¹⁰⁹ Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan usap LKD menggunakan lidi kapas untuk mendeteksi adanya peningkatan VEGF dan PDGF serta penurunan mediator inflamasi seperti IL-6²⁶. Pemeriksaan ini merupakan cara yang baru dan pertama kali dilakukan. Penelitian oleh Liu *et al.*¹⁴ mencoba melakukan pemeriksaan MMP dari bahan cairan luka. Cara lain yang digunakan untuk memeriksa biomarker pada LKD menggunakan teknik invasif seperti biopsi jaringan atau *adhesive patch skin biopsy*.

Penelitian oleh Michael *et al.*¹²⁸ sudah menggunakan pemeriksaan usap pada buccal untuk mendeteksi kelainan DNA, pada kasus *cerebral palsy* pada bayi dan kasus alzheimer. Sel-sel yang didapat dengan cara *swab* atau apus yang menggunakan *cotton bud* atau sikat kecil untuk dilakukan analisis lebih lanjut dengan teknik PCR. Cara tersebut mempunyai akurasi cukup baik dengan sensitivitas 93%. Untuk meningkatkan sensitivitas pemeriksaan peneliti lain mengganti usap lidi dengan sikat halus (isohelix DNA/RNA buccal swab). Metode tersebut dapat menggantikan pemeriksaan DNA dengan PCR dari bahan darah atau rambut.¹²⁷ Penelitian lain di UGM menggunakan biopsi jarum halus dengan blok parafin untuk deteksi TGF- β untuk evaluasi biomarker pada LKD.¹²⁸

Penggunaan usap LKD dengan usap lidi kapas pada penelitiin ini mengambil ide dari penelitian di atas. Teknik ini dikembangkan lebih lanjut setelah dilakukan studi pendahuluan dengan kertas whatman dan cotton swab untuk meyakinkan apakah protein dan *growth factor* yang ada pada permukaan LKD bisa dideteksi. Penelitian pendahuluan ini berhasil mendeteksi VEGF, TIMP dan IL-6. Berdasarkan keberhasilan studi pendahuluan ini, kami kemudian melanjutkan penelitian untuk dilakukan pemeriksaan VEGF, PDGF dan IL-6 pada tiga kelompok subjek penelitian pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7.

5.2 Pemeriksaan VEGF dan Angiogenesis

Salah satu pemeriksaan yang digunakan sebagai parameter untuk menilai proses angiogenesis adalah VEGF. Pada penelitian ini didapatkan peningkatan kadar VEGF pada kelompok A-PRF + AH pada ke-3 (43,1 pg/mg protein) dan ke-7 (311 pg/mg

protein). Didapatkan pula peningkatan kadar VEGF kelompok A-PRF pada hari ke-3 (1,8 pg/mg protein) dan ke-7 (87,1 pg/mg protein). Namun pada kelompok NaCl terdapat penurunan VEGF pada hari ke-3 (4,0 pg/mg protein) dan hari ke-7 (16,3 pg/mg protein). Terdapat peningkatan yang bermakna rerata kadar VEGF kelompok A-PRF+ AH dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol, pada hari ke-3 ($p = 0,003$) dan hari ke-7 ($p < 0,001$), Tabel 4.5.

Kenaikan bermakna kadar VEGF pada kelompok A-PRF + AH terjadi karena pengaruh pemberian AH yang menyebabkan tertahannya (*retain*) VEGF yang dikeluarkan oleh granula- α trombosit. Trombosit yang terperangkap pada fibrin merupakan komponen sel darah yang kaya dengan berbagai *growth factor* antara lain VEGF, PDGF, EGF yang sangat berperan pada proses pertumbuhan pada proses granulasi.

Fungsi AH pada kombinasi A-PRF + AH selain untuk *retain growth factor*, sifat AH juga melindungi *growth factor* dari degradasi oleh protease. Pada penelitian ini terlihat bahwa kelompok A-PRF + AH pada hari ke-3 sudah terjadi peningkatan VEGF yang bermakna, karena AH dapat melindungi degradasi VEGF dari enzim protease. Penggunaan asam hialuronat sebagai kombinasi produk topikal *growth factor* digunakan untuk mengobati luka kulit terbuka. Peran dari AH sebagai anti inflamasi dan memberi perlindungan terhadap *growth factor* dari aktivitas protease.¹²⁶

Penelitian lain oleh Parajó¹³¹ melaporkan AH tersendiri dalam bentuk nanopartikel dalam chitosan (AH/CS) dapat menahan (*retain*) dan *entrap pro-angiogenic factors* VEGF (94%) dan PDGF (54%). Hal ini menunjukkan AH/CS secara optimal dapat menahan VEGF hampir 2 kali lebih banyak dibandingkan PDGF. Bentuk nanopartikel AH merupakan bentuk polisakarida kationik hidrofilik yang mempunyai kapasitas untuk membentuk gel setelah kontak dengan PRF yang berbentuk poli-anion.

Pada penelitian ini nilai absolut kadar VEGF pada kelompok A+PRF+AH mempunyai perbedaan yang lebih bermakna di hari ke-7 ($p = 0,001$) dibandingkan hari ke-3 ($p = 0,022$), sesuai Tabel 4.5. Kenaikan nilai absolut VEGF pada usap hari ke-3 sampai hari ke-7 disebabkan oleh efek akumulasi

VEGF di permukaan luka. Selain itu VEGF pada kelompok A-PRF + AH masih bisa bertahan dan memberikan efek angiogenesis di hari ke-7.

Dari penelitian invitro PRF yang disimpan dalam medium DMEM, didapatkan kenaikan kadar VEGF terus meningkat sampai puncaknya hari ke-7 yang setelah itu mengalami penurunan sampai hari ke-14 pengamatan.¹²⁹ Pada beberapa penelitian sebelumnya kombinasi dosis AH pada kombinasi PRF + AH sangat bervariasi dosisnya. Pada penelitian ini digunakan kombinasi AH (0,2%) sebanyak 0,6 mL dan A-PRF 1 mL. Pada konsentrasi ini (AH 0,075%) akibat sifat higroskopisnya, AH dapat menahan *growth factor* di dalam gel yang terbentuk dari fibrin PRF. Selain itu dengan dosis AH tersebut diharapkan kombinasi A-PRF + AH dapat menstimulasi angiogenesis yang ditandai dengan peningkatan VEGF secara bermakna. Pada penelitian ini, dengan dosis AH 0,075 % pada kombinasi A-PRF + AH diharapkan dapat secara optimal membawa *growth factor* terutama VEGF dan PDGF.

Penelitian lain oleh Ariyati¹³² menggunakan pelbagai macam dosis, AH 3%, 4% dan 10%, menunjukkan AH konsentrasi rendah (3% dan 4%) *crosslink* dengan *Wharton's jelly-derived stem cell conditioned medium* (WJSCs-CM), akan meningkatkan pelepasan VEGF, TGF- β 1 di WJSCs-CM. Tautan silang AH tidak memicu peningkatan level PDGF dan bFGF di WJSCs-CM, baik pada AH konsentrasi rendah maupun tinggi dibandingkan kontrol.

Pada proses penyembuhan luka, VEGF, merupakan salah satu faktor proangiogenik terpenting pada vaskulogenesis, angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi dan penyembuhan luka. Pada penelitian ini, peningkatan VEGF pada hari ke-3 hari ke-7 sejalan dengan peningkatan luas area granulasi hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14. Pembentukan jaringan granulasi sangat dipengaruhi oleh pertumbuhan jaringan vaskular akibat respons jaringan terhadap trauma yang diatur oleh beberapa sitokin dan *growth factor* termasuk di antaranya VEGF dan FGF. Ikatan VEGF dengan fibrinogen dan fibrin ternyata juga penting dalam proses pembentukan jaringan granulasi karena fibrin yang menempel pada permukaan luka dapat berinteraksi dengan sel endotel membentuk cabang pembuluh darah baru (proses *sprouting*). Interaksi spesifik pada rantai asam amino 165 dari VEGF dengan fibrinogen dapat

mengoordinasikan respons vaskular terhadap cedera dengan rasio ikatan VEGF dengan fibrinogen sebesar 3,8 : 1 untuk merangsang proliferasi sel endotel.¹³³

Penelitian lain oleh Utomo *et al.*¹³⁴ secara *invivo* menggunakan kombinasi sodium hialuronat (SH) dan PRP pada rekonstruksi operasi *anterior cruciatum ligament* (ACL) pada kelinci menunjukkan adanya peningkatan VEGF 165. Sodium hialuronat merupakan turunan AH yang memiliki sifat relatif sama dan dapat digunakan sebagai pembawa VEGF yang baik serta meningkatkan revaskularisasi pada ligamen lebih awal pada rekonstruksi ACL. Hal tersebut karena SH dapat menstimulasi migrasi dan aktivasi sel endotel secara *in vitro* dan *in vivo*. Pelepasan VEGF dari SH ternyata terjadi dalam 24 jam pertama yang mendorong proliferasi sel endotel, migrasi dan kelangsungan hidup sel endotel. Aktivasi angiogenik sel-sel endotel berperan mempromosikan proliferasi fibroblas dan sintesis matriks ekstraselular. Efek biologis VEGF eksogen yang berasal dari gel akan menghilang dalam waktu 14 hari dan kemudian tubuh akan menyesuaikan diri seperti keadaan semula.

Penelitian lain oleh Chen¹³⁵ dengan mengkombinasi AH berbagai konsentrasi (3%, 4% dan 10%,) dengan PRF menunjukkan AH 3% merupakan konsentrasi yang optimal untuk mendapatkan ekspresi VEGF di permukaan nanopartikel dan terjadi lebih awal yaitu 82% dilepas dalam 24 jam pertama, sedangkan PDGF-BB baru dapat dilepaskan pada hari ke-2 sampai ke-7.

Pada penelitian ini peningkatan VEGF usap LKD pada hari ke-3 dan ke-7 dengan puncak kadar VEGF dimungkinkan pada hari ke -7. Peningkatan VEGF dari usap LKD, selain disebabkan oleh akumulasi VEGF yang berasal dari gel A-PRF + AH pada hari sebelumnya (VEGF eksogen), juga didapatkan dari penambahan VEGF endogen yang diproduksi di permukaan luka dan meningkat setelah mendapatkan terapi A-PRF + AH. Kadar VEGF akan meningkat secara bermakna pada permukaan luka karena peran beberapa jenis sel, antara lain keratinosit, makrofag, dan fibroblas yang juga dapat menghasilkan VEGF endogen sebagai respons terhadap cedera.¹³⁴ Walaupun keratinosit, makrofag, dan fibroblas pada penyandang DMT2 sudah mengalami gangguan fungsi, namun kombinasi A-PRF + AH dapat menginduksi produksi VEGF endogen pada LKD.

Kombinasi A-PRF+ AH juga akan bersinergi mempersingkat fase inflamasi sehingga luka memasuki fase proliferasi lebih cepat. Selain itu penambahan AH pada gel A-PRF ternyata juga dapat mempercepat polarisasi makrofag M1 yang bersifat pro-inflamasi menjadi makrofag M2 yang bersifat anti-inflamasi.¹²⁹ Selain diproduksi oleh fibroblas dan keratinosit di permukaan luka, makrofag yang sudah terpolarisasi menjadi M2, ternyata juga dapat menghasilkan VEGF yang juga mempunyai sifat anti-inflamasi, imunoregulasi, deposit kolagen dan regenerasi jaringan.¹³⁵ Asam hialuronat (AH) telah terbukti meningkatkan angiogenesis. Mekanisme angiogenesis yang diinduksi AH dipengaruhi CD44 dan PKC δ untuk motilitas sel yang dimediasi reseptor AH (RHAMM), Reseptor RHAMM diperlukan untuk invasi selular yang dipromosikan AH dan pembentukan tabung sel endotel.¹³⁶

Penelitian Wu¹⁰³ pada tikus wistar jantan menggunakan *dressing amnion freeze-dried* dengan penambahan topikal hialuronat Low Molecular Weight (HA-LMW) menunjukkan adanya peningkatan ekspresi VEGF neovaskularisasi pada hari ke-3. Penelitian tersebut menunjukkan penambahan HA-LMW dapat mempercepat onset ekspresi VEGF dan memacu angiogenesis serta maturasi pembuluh darah dengan melalui promosi sel endotel.

Penambahan AH pada A-PRF akan memengaruhi permeabilisasi selektif di sekitar mikropartikel CD41, yang berfungsi sebagai sistem transportasi dan pengiriman bioaktif molekul, berpartisipasi dalam hemostasis dan trombosis, peradangan, angiogenesis, dan imunitas.²² Penambahan AH pada A-PRF juga dapat menghambat agregasi trombosit dan dapat memengaruhi peningkatan pengiriman *growth factor* dari granula α dalam trombosit di PRF. *Growth factor* tersebut berperan penting dalam proses angiogenesis melalui migrasi dan proliferasi sel endotel, dan pembentukan tube struktur *mikro-vessel*^{132,138}

Ikatan PRP dengan AH akan meningkatkan ekspresi P-selektin setelah PRP berinteraksi dengan AH. Pada trombosit yang tidak diaktifkan, P-selektin disimpan dalam butiran- α . Fungsi P -selektin sebagai *Cell Adhesion Molecule* (CAM) pada permukaan sel endotel yang melapisi permukaan dalam pembuluh darah.¹³⁹

Pada penelitian ini , 90% subjek berusia lebih dari 45 tahun, namun pada kelompok A-PRF + AH tidak terjadi gangguan pelepasan VEGF oleh granula- α trombosit. Menurut Taniguchi *et al.*¹⁴⁰ , beberapa *growth factor* yang dihasilkan oleh PRF akan menurun sebanding dengan peningkatan usia di atas 45 tahun, seperti PDGF BB dan IGF-1, namun disebutkan tidak terjadi penurunan yang bermakna untuk pelepasan VEGF dari PRF pada penyandang DMT2 usia diatas 45 tahun.

5.3. Pemeriksaan PDGF dan Fibrogenesis

PDGF merupakan *growth factor* lain yang berkontribusi pada proses penyembuhan LKD. PDGF berperan pada pembentukan jaringan fibroblas yang merupakan salah satu komponen penting angiogenesis. Salah satu turunannya yaitu PDGF AA mempunyai peran penting pada proses proliferasi, migrasi, dan rekrutmen fibroblas. Fibroblas merupakan komponen utama sel mesenkim yang menjadi sumber utama faktor pertumbuhan angiogenik dan matriks ekstraselular (ECM).¹³⁹ PDGF dilepaskan dari degranulasi trombosit di luka dan terdapat di cairan luka. Peran PDGF pada penyembuhan luka pada awal fase inflamasi dengan meningkatkan proliferasi fibroblas, menstimulasi mitogenisitas dan kemotaksis neutrofil, makrofag, dan sel otot polos ke lokasi luka.¹⁴⁰ .

Tabel 4.6. menunjukkan pada awal penelitian dan sebelum dilakukan intervensi, tidak ada perbedaan bermakna kadar trombosit dan PDGF pada setiap kelompok. Walaupun didapatkan adanya peningkatan perubahan PDGF pada hari ke-3 dan ke-7 pada ketiga kelompok (A-PRF + AH, A-PRF dan kontrol NaCl) namun peningkatan perubahan PDGF pada kelompok A-PRF + AH tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna baik pada hari ke-3 ($p = 0,479$) maupun pada hari ke-7 ($p = 0,125$)

Hasil penelitian ini menunjukkan PDGF yang dihasilkan dari granula- α trombosit, tidak terjadi peningkatan yang bermakna pada kelompok A-PRF + AH. Banyak faktor penyebab peningkatan PDGF yang tidak bermakna ini antara lain faktor usia, trombosit, kadar glukosa darah kadar HbA1C dan iskemia tungkai.¹⁴⁰ Pada penelitian ini 27 subyek (90%) merupakan penyandang LKD yang berusia di atas 45 tahun. Menurut Taniguchi *et al.*¹⁴⁰ terdapat pengaruh umur terhadap jumlah dan kualitas *growth factor* yang dihasilkan oleh PRP, usia subjek > 45 tahun

menunjukkan adanya penurunan bermakna jumlah PDGF ($p = 0,049$) dibandingkan pada usia < 45 tahun.

Pada penelitian Jones¹⁴¹, disebutkan pengaruh usia > 55 tahun terhadap fungsi trombosit karena *mRNA diferensial* dan ekspresi microRNA, peningkatan stres oksidatif serta perubahan reseptor trombosit. Hal tersebut akan berkaitan dengan dengan jumlah beberapa *growth factor* yang dihasilkan oleh trombosit antara lain PDGF.

Diabetes sangat berpengaruh pada kadar PDGF karena mikroangiopati sangat berperan pada penurunan PDGF. Studi lain oleh Feng Wu¹³⁷ menggunakan tikus diabetes diinduksi streptozotocin yang dibuat iskemia pada tungkai bawah menunjukkan adanya ekspresi PDGF-BB menurun sebesar 40–50% akibat diabetes dan iskemia pada tungkai.

Pada penelitian invitro oleh Ariyati *et al.*¹³² dilaporkan campuran PRF dengan AH 3% meningkatkan pelepasan TGF- β , PDGF-BB dan FGF. Pada kombinasi A-PRF + AH, AH yang bercampur dengan A-PRF, dapat menyebabkan trombosit lebih permeabel sehingga memicu pelepasan *growth factor* oleh α -granula. Di samping itu kombinasi AH+A-PRF akan terikat ke CD44 dan ikatan tersebut meningkatkan MAP kinase serta reseptor TGF- β 1. Sifat reseptor TGF - β 1 terhadap jaringan granulasi adalah menginduksi fibrogenesis.

Faktor lain yang dapat menjelaskan kadar PDGF yang tidak meningkat pada penelitian ini adalah penggunaan konsentrasi AH yang tidak optimal, sehingga PDGF yang dihasilkan oleh PRF+AH menjadi kurang optimal. Pada awal proposal referensi yang digunakan adalah penelitian oleh Ilio²², yaitu perbandingan AH: PRP adalah 0,6 mL: 1 mL. Pada penelitian ini yang menggunakan subjek DM, kombinasi A-PRF + AH menggunakan AH 0,2% 15 g (0,075%) untuk terapi topikal LKD. Untuk pengambilan bahan pemeriksaan PDGF dengan metode ELISA didapatkan dari swab LKD pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7.

Penelitian invitro terbaru tahun 2019 oleh Ariyati *et al.*¹⁴³ penggunaan kombinasi AH dengan berbagai konsentrasi masing-masing sebesar 3%, 4% dan 10% ditambahkan pada PRF pasien non DM, menunjukkan ternyata konsentrasi AH 3% merupakan konsentrasi AH optimal untuk mendapatkan pelepasan *platelet-derived*

growth factor (PDGF-BB) yang bermakna, setelah itu akan terjadi penurunan pada konsentrasi AH 4% dan 10% .Namun penggunaan lain kombinasi AH 3% pada Wharton Jelly Stem Cell-Conditioning Medium (WJSCs-CM) ternyata tidak meningkatkan PDGF dan b-FGF secara bermakna, hanya terjadi peningkatan bermakna.pada VEGF dan TGF- β 1 saja. Sampai saat ini. dosis AH optimal untuk dikombinasikan dengan PRF pada pasien DMT2 belum pernah dilaporkan. Menurut penelitian di bidang *dermatology*, kombinasi A-PRF dengan AH 3%, adalah konsentrasi optimal karena banyak *growth factor* dilepaskan. Namun penelitian tersebut dilakukan pada subjek non DM.

Studi *in vitro* mengonfirmasi bahwa PDGF-BB yang dilepaskan dari nanopartikel AH dalam 2 hari hanya 10% dan akan mencapai puncak setelah hari ke-7. Pada penelitian ini walaupun didapatkan peningkatan nilai rerata PDGF pada kelompok A-PRF + AH dari 1,9 pg/ mg protein menjadi 8,1 pg/mg protrein) , kelompok A-PRF (1,7 pg/ mg protein menjadi 5,4 pg/mg protrein) dan NaCl (1,9 pg/ mg protein menjadi 6,4 pg/mg protein) namun peningkatan tersebut tidak berbeda bermakna baik pada hari ke-3 maupun hari ke-7

Sampai saat ini belum didapatkan penelitian pendukung mengenai puncak optimal PDGF pada terapi topikal LKD dengan kombinasi PRF+AH. Penelitian oleh Heldin¹⁴⁹ secara *in vivo*, PDGF dihasilkan platelet dan makrofag dan mencapai puncak hari ke-8. Namun penelitian ini pengambilan swab PDGF hanya pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7 saja, sehingga belum terlihat peningkatan bermakna kelompok intervensi. Salah faktor yang berpengaruh pada peningkatan kadar PDGF adalah lamanya intervensi. Penelitian oleh Vokurka³⁹ menjelaskan peran PDGF pada proses penyembuhan luka mulai meningkat secara bermakna pada hari ke-10 setelah intervensi awal peran tersebut terlihat pada fase epitelialisasi penyembuhan LKD.⁹

Penelitian lain *invivo* oleh Grotendorst¹⁴⁴ menunjukkan puncak pelepasan PDGF dari PRF terjadi pada hari ke-10–15. Pada saat tersebut terjadi peningkatan pembentukan jaringan kolagen. Kajian lain secara makroskopis oleh Tan¹⁴⁵ terhadap pengaruh PDGF terhadap collagen juga menunjukkan PDGF mulai terlihat berperan pada pertumbuhan jaringan granulasi lebih cepat pada hari ke-7 sampai ke-15 hingga terjadi epitelialisasi penuh

Pada penelitian ini, pada kelompok A-PRF + AH, kadar PDGF belum meningkat bermakna pada hari ke-3 dan hari ke-7 karena pengaruh glukosa darah yang belum terkontrol dan HbA1C yang tinggi. Peningkatan resistensi insulin pada penyandang DM yang tidak terkontrol akan menyebabkan hiperaktivasi platelet sehingga meningkatkan risiko trombotik karena adanya ikatan fibrinogen dan PAI-1. Kondisi ini akan menghambat pelepasan *growth factor* oleh *granula α* yang terdapat pada trombosit. Pada DM2 kronik dengan HbA1C yang tinggi akan terjadi penurunan PDGF dan FGF-2. Penelitian lain pada penyandang DM2 dengan gangguan mikrovaskular, menemukan kadar FGF-2 dan PDGF-BB menurun secara bermakna. Namun pada keadaan hiperglikemia, VEGF malahan meningkat karena peningkatan aktivasi PKC (Protein kinase C) melalui peningkatan DAG (*Diacyl glycerol*). Hiperglikemia dapat memengaruhi penurunan PDGF melalui aktivasi jalur PKC Θ dan PKC ϵ . Selain itu dapat juga memengaruhi faktor nukleia-kappa B (NF- κ B), PI3K, PLC γ , Src /Jalur Smad1 / Col4, JAK / STAT, PI3K / Akt / mTOR, p38 MAPK, SHP-1 dan ERK / Akt, yang pada intinya pengaruh faktor tersebut adalah hambatan pada migrasi dan proliferasi sel endotel akibat adanya efek inflamasi dan anti angiogenik.¹⁴⁶

Pada awal intervensi LKD, keadaan inflamasi pada luka masih berlangsung sangat tinggi. Mannaioni¹⁵⁰ menyebutkan adanya hubungan antara trombosit dan inflamasi vaskular dan respons imun. Pada proses inflamasi, P-selektin dan histamin akan diekspresikan pada permukaan trombosit sebagai respons terhadap rangsangan agregasi trombosit dan inflamasi. Ekspresi P-selektin dan histamin yang berperan meningkatkan inflamasi pada kasus inflamasi intravaskular dan vaskulitis secara aktif menghambat faktor pertumbuhan. Hal ini juga dapat memperkuat penelitian ini. Inflamasi pada hari ke-3 belum menurun menyebabkan fungsi PDGF yang belum optimal saat itu.

Hasil penelitian ini terhadap peningkatan kadar PDGF pada kelompok A-PRF+ AH tidak terdapat perbedaan yang bermakna dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian *invivo* pada tikus non DM. Didapatkan kadar PDGF terus meningkat sampai hari ke-14, sedangkan pada tikus DM, kadar PDGF meningkat namun tidak bermakna.^{147,148}

Pada penelitian ini pengamatan penanda PDGF hanya sampai hari ke-7, dimana pada waktu tersebut belum terjadi perubahan bermakna antara kelompok A-PRF + AH dengan kelompok lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian pada relawan DM, didapatkan PRF melepaskan TGF- β 1, PDGF-AB, FGF-2, dan VEGF dengan puncak pada hari ke-14.¹⁴⁸

Walaupun banyak studi yang menunjukkan pengaruh yang bermakna kombinasi A-PRF + AH terhadap peningkatan PDGF, namun hasil penelitian ini belum menunjukkan kenaikan PDGF yang bermakna karena ada beberapa faktor yang berpengaruh seperti faktor usia, kontrol glukosa darah yang tidak terkontrol, konsentrasi AH yang belum optimal dan lama pengamatan yang singkat.

5.4 Pemeriksaan IL-6 dan Inflamasi

Pada penelitian ini, pemberian topikal A-PRF + AH akan memengaruhi perubahan kadar IL-6 di LKD. Setelah dua kali intervensi, perubahan kadar IL-6 (Δ IL-6) kelompok A-PRF + AH, dan A-PRF terjadi penurunan pada hari ke-3 dan hari ke-7 sedangkan pada kelompok NaCl terjadi peningkatan pada hari ke-3 dan hari ke-7. Kalau diperhitungkan berdasarkan delta penurunan IL6 antara hari ke-3 dan hari ke-7, pada kelompok A-PRF + AH terdapat penurunan namun tidak bermakna, dan baru bermakna pada hari ke-7, Δ IL6 hari ke-7, $p = 0,015$, sesuai Tabel 4.7.

Penelitian oleh Lin¹⁰⁵ pada pasien sepsis dengan hiperglicemia dengan kontrol glukosa darah yang jelek, didapatkan peningkatan kadar IL-6 sebagai penanda peningkatan inflamasi. Hiperglikemia pada sepsis dapat mengakibatkan hipersitokinemia yang ditandai dengan peningkatan marker inflamasi seperti IL-6, IL-8, IFN- γ and *CXC-ligan chemokine*.

Pada hari ke-7, nilai absolut kadar IL-6 menunjukkan penurunan pada kelompok A-PRF + AH (dari 106,4 menjadi 88,7 pg/mg protein) dan kelompok A-PRF (dari 91,9 menjadi 48,8 pg/mg protein), namun terdapat peningkatan nilai absolut IL-6 pada kelompok NaCl dari 125,3 menjadi 167,9 pg/mg protein). Didapatkan penurunan yang bermakna nilai absolut IL-6 kelompok A-PRF + AH dibandingkan kelompok lainnya pada hari ke-7 ($p = 0,041$). Penurunan bermakna IL-6 pada hari ke-7 (Δ IL-6 hari 0–7) menunjukkan manfaat AH sebagai anti-inflamasi pada

kombinasi A-PRF + AH baru menunjukkan nilai absolut IL6 yang berbeda bermakna pada hari ke-7 ($p = 0,041$) karena efek kumulatif kombinasi A-PRF + AH baru terlihat pada hari ke-7 pada penyembuhan LKD. Hal ini disebabkan stimulasi AH terhadap mediator inflamasi bersifat eksogen dan endogen terhadap LKD sehingga penurunan bermakna IL-6 baru terlihat setelah hari ke-7.

Pada penelitian ini, walaupun kelompok A-PRF + AH memiliki kadar glukosa darah dan HbA1C, lebih tinggi dari kelompok lainnya, namun kombinasi A-PRF dan AH dapat menekan inflamasi pada LKD yang ditandai dengan penurunan IL-6 pada hari ke-7, sesuai Tabel 4.7.

Pemeriksaan IL-6 merupakan salah satu pemeriksaan penanda inflamasi. Pada penyandang DM2 kronik sudah terjadi peningkatan inflamasi secara sistemik. Hal ini ditunjukkan oleh penelitian Lee *et al.*¹⁵⁴ yang menyebutkan pada tikus hiperglikemia (kadar glukosa darah acak > 350 mg/dL dalam periode 4 minggu, didapatkan peningkatan kadar IL-6. Pada tikus hiperglisemia tersebut didapatkan korelasi yang bermakna hiperglikemia dengan kadar IL-6 serta perlambatan penyembuhan luka.

Penyandang DM yg sudah berada dalam kondisi inflamasi kronik, dengan LKD dan kadar glukosa darah yang tinggi akan menyebabkan perpanjangan waktu penyembuhan luka. Inflamasi kronik pada LKD ditandai dengan peningkatan penanda inflamasi IL1, IL6, IL8, TGF- β -1, dan TNF- α . Sitokin IL-6 yang disekresikan oleh limfosit T dan makrofag sangat penting dalam pertahanan.²⁸ Terdapat hubungan IL-6 dan hiperglikemia serta resistensi insulin. Adanya resistensi insulin akan menambah sulit kendali kadar glukosa darah yang berakibat kesulitan penyembuhan LKD.¹⁵⁵

Beberapa penelitian sebelumnya juga menyebutkan adanya hubungan antara tingkat inflamasi dengan penyembuhan LKD. Menurut Zubair¹⁵⁶ pada penyandang DM2 dengan LKD akan terjadi peningkatan kadar IL-6, hsCRP, TNF- α , dan plasma adiponektin yang lebih tinggi dibandingkan yang tanpa ulkus kaki, baik karena infeksi maupun tidak

Peran mediator inflamasi diperlukan pada penyembuhan luka, namun bila proses inflamasi berkepanjangan, dapat berakibat pada hambatan penyembuhan luka.

Sesuai penelitian Lin *et al*¹⁵⁷ tentang peran IL-6 dalam penyembuhan luka akut pada tikus disebutkan IL-6 berperan pada inflamasi akut dan diperlukan untuk resolusi penyembuhan luka yang tepat waktu. Interleukin 6 (IL-6) memainkan peran penting dalam penyembuhan luka dan diketahui meningkat dalam serum penyandang DMT-2. Interleukin-6 menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi dari makrofag, keratinosit dan sel endotel pada permukaan luka tersebut. Luka tikus hiperglikemik menunjukkan ekspresi protein IL-6 dan IL-6R α yang lebih besar pada hari ke-1, hari ke-7, dan hari ke-10 hari pasca-luka dibandingkan luka dengan kadar glukosa darah normal, disertai hambatan penutupan luka pada hari ke-4.¹⁴⁹

Semadi¹⁶² yang menganalisis secara kuantitatif sitokin pro-inflamasi pada luka kulit manusia mendapatkan peningkatan ekspresi IL-1 α , IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dalam fase inflamasi proses penyembuhan luka. Kadar sitokin pro-inflamasi ini (TNF- α , IL-1, dan IL-6) lebih tinggi pada luka kronik sejalan dengan penyembuhan yang lambat karena perpanjangan fase inflamasi (inflamasi kronik) pada LKD.

Studi Zubair¹⁵⁶, yang dilakukan untuk menentukan indikator inflamasi pada patogenesis LKD, mendapatkan korelasi positif antara kadar IL-6 serum yang tinggi pada penyandang diabetes dengan LKD. Didapatkan pula korelasi positif antara kadar serum IL-6 dengan CRP ($p = 0,001$, $r < 0,994$) dan fibrinogen ($p = 0,001$, $r < 0,964$) pada penyandang DMT2 dengan LKD. Penanda IL-6 ini berimplikasi pada penyembuhan luka yang buruk dan berperan pada transisi peradangan akut ke kronik secara sistemik dengan efek stimulasi pada sel T dan B. Di samping itu IL-6 memengaruhi resistensi insulin.

Penelitian invitro menunjukkan AH sendiri mempunyai sifat anti-inflamasi. Efek anti-inflamasi AH ini dengan cara menghambat TNF α sehingga dapat menghambat peningkatan IL-6 dan IL-8. Studi oleh Lana *et al*.²¹ pada kasus osteoarthritis, menunjukkan pemberian AH dapat menghambat ekspresi IL-1 β , MMP-1 dan MMP-3. Selain itu AH juga dapat menurunkan IL-8, iNOS, dan TNF α melalui pensinyalan TLR / MyD88 / MAPK / NF- κ B untuk regulasi fagositosis dan ekspresi sitokin proinflamasi. Hambatan jalur pensinyalan MAPK dapat menurunkan aktivasi NF- κ B dan AP-1 yang menyebabkan peningkatan sintesis dan menghambat degradasi ECM.^{156,157}

Mekanisme lain AH sebagai anti inflamasi adalah dengan menurunkan permeabilitas interstisial. Mekanisme ini sudah dibuktikan oleh penelitian Rooney *et al.*¹⁵⁸ pada kasus Sistitis interstisial (IC) yang diberikan AH menunjukkan penurunan permeabilitas urotelium dinding kandung kemih karena menurunkan sitokin akibat hilangnya lapisan glikosaminoglikan (GAG).

Pada penelitian ini, pada semua kelompok didapatkan IL-6 yang melebihi batas normal karena semua subjek memiliki HbA1C lebih dari nilai normal. Pada hari ke-3, pada kelompok A-PRF + AH belum terjadi penurunan IL-6 secara bermakna. Salah satu penyebabnya, subjek pada kelompok ini merupakan penyandang DM dengan kadar glukosa darah belum terkontrol (nilai rerata 286) rerata HbA1C 11,34. Kontrol glukosa darah pada kelompok tersebut masih tinggi sehingga perbaikan inflamasi belum terjadi pada hari ke-3, membutuhkan waktu lebih lama.¹⁵⁰

Pada LKD, dapat terjadi proses inflamasi kronik melalui ikatan antara sel endotel ICAM-1 dan VCAM-1 dengan neutrofil. Namun pemberian AH dapat meningkatkan ikatan reseptor endotel dengan ICAM, VCAM, sehingga dapat menghalangi ikatan dengan *neutrophil*, sehingga kebocoran vaskular dapat dicegah.¹⁵⁵ Menurut Strauss *et al.*¹³⁸, trombosit yang terjebak dalam fibrin pada PRF merangsang makrofag untuk menghasilkan *growth factor* (EGF, TGF- β , IL-1, IL-4 dan IL-8). Interleukin 6 adalah sitokin multifungsi dan dapat mengatur respons inflamasi proses penyembuhan luka; IL-6 berpengaruh pada proses migrasi sel keratinosit pada proses penutupan luka.

Bentuk gel PRF dapat mengikat leukosit. Ikatan Leukosit dalam L-PRF dapat menekan infeksi dengan cara menghambat DNA girase bakteri, merusak *Z ring* dinding sel bakteri. Sehingga dapat menginaktivasi kemampuan adhesi bakteri terhadap sel serta merusak enzim bakteri sehingga dapat mengurangi rasa nyeri.¹⁵⁶

Di bidang ortopedi, terdapat penurunan inflamasi yang bermakna pada PRP dikombinasi dengan AH untuk kasus osteoarthritis. Penambahan AH pada A-PRF memberikan efek sinergi anti-inflamasi, sehingga dapat merangsang angiogenesis dan pembentukan jaringan granulasi, serta mempercepat penutupan luka. Asam hialuronat pada A-PRF memperkuat pergeseran polarisasi makrofag dari M1 menjadi fenotipe M2.¹⁵⁵

Polarisasi M1 menjadi M2 selain diperankan oleh AH juga diperankan oleh PRF. Penelitian sebelumnya melaporkan PRF berfungsi sebagai *reservoir* molekul bioaktif untuk mendukung penyembuhan luka dan regenerasi tulang melalui jalur polarisasi makrofag dari proinflamasi fenotip M1 menuju fenotip M2 yang bersifat anti-inflamasi. Sebagai penanda inflamasi dari M1 antara lain dapat diwakili oleh IL1 β dan IL6 sedangkan penanda anti inflamasi M2 dapat digunakan arginase-1 dan *chitinase-like 3* (Chil3 atau YM1)¹⁵⁶

Selain bersifat anti-inflamasi, kombinasi A-PRF + AH juga bersifat immunosupresif dan antioksidan. Fungsi antioksidan dengan menghambat jalur siklooksigenase dan lipooksigenase serta menurunkan kadar ROS dan mengurangi nyeri. Hal tersebut menyebabkan APRF+AH memiliki sifat antioksidan dan antibakteri.¹⁵⁷

Selain itu kombinasi AH dengan PRF dapat menekan sitokin dan kemokin pro-inflamasi melalui penghambat jalur transduksi sinyal dari reseptor yang berada pada permukaan sel tertentu. Peran lainnya kombinasi AH dan PRF adalah melakukan promosi sintesis mediator anti-inflamasi yang dapat mempersingkat fase inflamasi untuk segera masuk ke fase proliferasi dan granulasi.¹⁵⁸ Penelitian lain oleh Afat *et al.*⁸⁶ pada aplikasi PRF+AH di soket gigi *Mollar 3* menunjukkan adanya penurunan yang bermakna gejala trismus, skor nyeri dan edema setelah ekstraksi gigi dibandingkan penggunaan PRF saja. Terjadinya penurunan IL-6, perbaikan imunitas dan peningkatan granulasi disebabkan oleh adanya fibroblas yang mengalami proliferasi dan migrasi.

Hasil penelitian-penelitian tersebut di atas membuktikan adanya peran PRF+AH dalam proses penyembuhan LKD, antara lain melalui berbagai macam faktor pertumbuhan, proliferasi dan migrasi sel, penurunan permeabilitas vaskular akibat vasokonstriksi, dan peningkatan fungsi endotel vaskular.¹⁵⁹

5.5 Mekanisme A-PRF + AH pada Penyembuhan LKD

Pada penelitian ini dipilih kondisi luka dengan grade Wagner 2 yang menunjukkan kedalaman luka terbatas sampai fascia dan tidak mengenai tulang serta tidak dalam keadaan infeksi. Penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks dan sulit diukur secara objektif setelah diberikan terapi topikal. Metode yang selama ini digunakan untuk mengevaluasi penyembuhan LKD adalah pengukuran volume

(*Volume Area* atau VA) dengan mengisi rongga luka dengan gel, pengukuran luas (*Wound Area* atau WA), dengan menelusuri batas luka atau pengukuran keliling, dengan menelusuri batas luka yang digariskan pada kertas film transparan dengan pena pengukur digital dan pengukuran kedalaman menggunakan probe milimeter.¹⁶⁰

Secara klinis untuk mengevaluasi perbaikan luka, penggunaan metode pengukuran berdasarkan volume luka dan luas area luka tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, oleh karena itu pengukuran luas luka direkomendasikan sebagai alat ukur paling relevan untuk menilai penyembuhan luka.¹⁶¹

Hasil penelitian ini mendapatkan luas luka awal pada ketiga kelompok tidak mempunyai perbedaan yang bermakna dengan luas rerata masing-masing pada kelompok A-PRF + AH 7,0 (1,9–31,9) cm², kelompok A-PRF 4,6 (2,3–19,8) cm² dan kontrol NaCl yaitu 5,3 (2,0–20,6) cm². Berdasarkan perhitungan luas luka, kelompok A-PRF + AH mengalami penurunan, luas luka dibandingkan kelompok lainnya pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 setelah intervensi, namun penurunan tersebut tidak bermakna (Tabel 4.11.).

Selain mengukur luas luka, penelitian ini juga melakukan penilaian terhadap pertumbuhan jaringan granulasi yang mewakili proses angiogenesis pada penyembuhan LKD. Metode pengukuran pertumbuhan jaringan granulasi dengan menggunakan indeks granulasi dengan menggunakan software ImageJ. Software ini dapat digunakan sebagai alat untuk menghitung luas jaringan granulasi dengan teknik digital berdasarkan perbedaan warna foto.¹⁶¹

5.5.1 Pengaruh A-PRF + AH pada Penyembuhan Luka melalui Peningkatan Angiogenesis

Pada penelitian ini penambahan A-PRF + AH menunjukkan peningkatan VEGF dan penurunan IL-6, yang sejalan dengan penambahan angiogenesis dan pembentukan jaringan granulasi. Hal ini sejalan dengan peningkatan indeks granulasi hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14 pada kelompok A-PRF + AH yang menunjukkan peningkatan yang bermakna dibandingkan dengan A-PRF saja dan kontrol. Didapatkan peningkatan nilai absolut IG pada hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14 untuk kelompok A-PRF + AH masing-masing sebesar 62,3% (33,6–81,3), 78,9% (65,8–95,8) dan 97,7% (89,4–99,6). Pada kelompok A-PRF

kenaikan nilai absolut IG masing masing sebesar 47,6% (20,5–73,0), 64,6% (37,2–89,9) dan 91,2% (46,0–98,9). Untuk kelompok kontrol perubahan nilai absolut IG masing masing sebesar 51,3 % (30,4–64,2), 66,0% (43,6–98,4), dan 78,7% (72,2–96,4), Tabel 4.10

Jika diukur dengan memperhitungan besarnya perubahan indeks granulasi (Δ IG) hari ke-0–3, hari ke-0–7 dan hari ke-0–14 , kelompok A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol (Tabel 4.11.). Pada penelitian ini penggunaan A-PRF + AH pada ke-0, hari ke-3 dan ke-7 menunjukkan peningkatan VEGF yang sejalan dengan peningkatan pertumbuhan jaringan granulasi pada hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14. Pembentukan jaringan granulasi pada hari ke-3 berhubungan dengan efek AH dan PRF yang bersinergi dalam meningkatkan angiogenesis.

Angiogenesis adalah istilah yang menggambarkan pembentukan pembuluh darah baru. Untuk pembentukan pembuluh darah baru diperlukan proses *sprouting* dan pembentukan *tube* pembuluh darah. Terbentuknya pembuluh darah yang sempurna (*mature vessel*) diperlukan kerangka (*scaffolding*), ECM yang dibentuk oleh fibroblas, dan proteoglikan untuk mendukung pembentukan pembuluh darah .¹⁶²

Neovaskularisasi merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru berupa tunas (*sprout*) baru yang terbentuk dari pembuluh darah dan akan berkembang menjadi percabangan baru pada jaringan luka. Neovaskularisasi akan saling beranastomosis dan membentuk suatu jaringan sirkulasi darah yang padat pada jaringan luka. Pembuluh darah memiliki peran penting dalam perbaikan jaringan untuk memberikan asupan nutrisi bagi jaringan yang sedang beregenerasi. Empat hal penting dalam regenerasi pada penyembuhan luka adalah kecukupan sel, pembuluh darah, faktor pertumbuhan dan *scaffold*.¹⁶³

Pada penelitian ini, peneliti mencari peran AH dalam proses angiogenesis. Asam Hialuronat berupa glikosaminoglikan nonsulfasi dari matriks ekstraselular terlibat dalam sejumlah besar fungsi biologis, seperti proliferasi dan migrasi sel, peradangan, angiogenesis, dan morfogenesis, penyembuhan luka. Di samping itu AH yang merangsang sekresi sitokin dan proliferasi sel endotel, pembentukan

pembuluh darah baru, dan modulator permeabilitas vaskular. Modulasi sel endotel dipengaruhi ikatan AH pada sel endotel melalui reseptor CD44. Penelitian lain pemberian AH pada kasus OA, dilaporkan AH dapat meningkatkan pelepasan Nitriks Okside dari kondrosit artikular dengan cara menghambat PKC- α dan mengaktivasi reseptor CD44.¹⁶⁴

Pada penelitian endothelial glycocalyx dikatakan sel endotel dilapisi oleh glikoprotein, asam sialat terminal (AS), glikosaminoglikan, heparan sulfat (HS), kondroitin sulfat (CS), dan asam hialuronat (HA). Menipisnya HS, HA, dan SA, akan menghalangi produksi NO akibat *shear stress* pada aliran darah. Jadi AH diperlukan pada perlindungan sel endotel pembuluh darah sehingga dapat meningkatkan produksi NO dan Prostaglandin I-2 (PGI-2) yang mengakibatkan dilatasi pembuluh darah.¹⁶⁵

VEGF berperan sebagai penanda angiogenesis terutama pada pembentukan *sprout* (tunas) pembuluh darah. *Sprouting* angiogenesis juga dipicu oleh kurangnya oksigen pada jaringan yang hipoksia seperti pada LKD.⁸³

Penelitian invitro oleh Kocherova *et al.*¹⁶⁶, dengan *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) mengatakan bahwa jalur pensinyalan VEGF terlibat dalam angiogenesis dan berperan penting dalam perkembangan neovaskular intraokular. Proliferasi, migrasi sel-sel endotel serta induksi pembentukan tabung distimulasi oleh pensinyalan VEGF. Di samping itu, VEGF juga meningkatkan respons fungsi mitokondria sehingga produksi ROS menurun. Peningkatan respon mitokondria oleh VEGF juga akan meningkatkan ekspresi gen sistem pertahanan ROS (katalase dan glutathion peroksidase/GPX1 sehingga dapat mempromosikan angiogenesis melalui peningkatan fungsi mitokondria yang masuk ke dalam sel endotel yang berfungsi dalam pensinyalan selular serta menghasilkan respirasi oksidatif mitokondria dan meningkatkan ATP intraselular.¹⁶⁷ Angiogenesis terutama dimulai oleh sel endotel, VEGF-A dan VEGFR-2 yang berperan pada mekanisme yang mengaktifkan dan mengatur angiogenesis.¹⁶⁸

Pada penelitian ini digunakan kombinasi A-PRF + AH karena dari penelitian sebelumnya dikatakan PRF adalah sumber alami *growth factor*, sedangkan AH menghasilkan lingkungan mikro yang merangsang *growth factor*, proliferasi dan

migrasi fibroblas, sel endotel, keratinosit dan angiogenesis.¹⁶⁹ Penyembuhan luka terjadi melalui proses selular terintegrasi melalui proses peradangan, migrasi sel dan proliferasi. Diharapkan kombinasi ini dapat saling memiliki efek sinergi dalam penyembuhan LKD antara asam hialuronat dan PRF.

Selain itu peningkatan kadar VEGF pada usap LKD dapat juga dipengaruhi oleh peningkatan VEGF endogen yang distimulasi sel makrofag M2. Polarisasi makrofag M2 akan mengaktifkan sel keratinosit, monosit, makrofag dan fibroblas yang berada di sel luka. Semua sel tersebut merangsang pembentukan VEGF endogen yang berpengaruh pada pembentukan jaringan granulasi.⁶⁰

Kelebihan penambahan AH pada gel A-PRF yaitu dapat meningkatkan kandungan VEGF karena sifat gel A-PRF + AH yang dapat menahan (*retain*) VEGF dan akan dilepaskan secara perlahan sehingga terjadi peningkatan VEGF pada permukaan LKD.¹⁴⁰ Mekanisme kerja kombinasi A-PRF dengan AH pada proses percepatan penyembuhan LKD melalui mekanisme angiogenesis adalah sebagai berikut:

1. Hambatan agregasi trombosit, distribusi growth factor yang berada di dalam granula α dalam trombosit di PRF dalam pembentukan tube struktur mikro-vessel.¹³⁷
2. Pengaruh mikropartikel CD41, yang berfungsi sebagai sistem transportasi dan pengiriman bioaktif molekul yang berpartisipasi dalam hemostasis dan trombosis, peradangan, angiogenesis, dan imunitas.²²
3. Peningkatan ekspresi P-selektin setelah PRF berinteraksi dengan AH. Pada trombosit yang tidak diaktifkan P-selektin disimpan dalam butiran- α . Fungsi P-selektin sebagai *Cell Adhesion Molecule* (CAM) pada permukaan sel endotel yang melapisi permukaan bagian dalam pembuluh darah. Di samping itu P-selektin juga sangat penting dalam perekrutan dan agregasi trombosit di area cedera vaskular.¹³³

5.5.2 Pengaruh A-PRF + AH pada Penyembuhan Luka melalui Peningkatan Fibrogenesis

Selain dapat meningkatkan angiogenesis dan menurunkan inflamasi, terapi topikal A-PRF + AH juga dapat meningkatkan pembentukan jaringan granulasi pada proses fibrogenesis yang ditandai dengan peningkatan PDGF. Adapun fungsi PDGF pada

penyembuhan luka sebagai fibrogenesis. Namun kadar PDGF pada diabetes baik fungsinya dan reseptornya mengalami penurunan sehingga pemberian PDGF eksogen tidak memberikan memberikan efek bermakna pada penyembuhan luka.¹⁷⁰

Beberapa studi melaporkan penggunaan PRF + AH dapat meningkatkan fibrogenesis. Penggunaan topikal A-PRF + AH akan menyebabkan terjadinya interaksi dengan reseptor CD44 dan RHAMM untuk migrasi sel dalam proses penyembuhan luka yang dimediasi ERK (fosforilasi kinase yang diatur sinyal ekstraselular). yang akan mempromosikan migrasi fibroblas (fibrogenesis), keratinosit, sel endotel pada penyembuhan luka dan epitelisasi berperan paling penting pada penyembuhan luka.^{171,172} Topikal A-PRF+HA juga mempercepat pembentukan miofibroblas melalui invasi proliferasi fibroblas yang akan meningkatkan deposit jaringan granulasi¹²⁶

Penelitian lain secara invitro (biakan fibroblas) oleh Beer *et al.*¹⁸⁰ melaporkan fibroblas tua akan mengalami penurunan kemampuan berproliferasi dan menyintesis kolagen karena tidak berespons terhadap rangsangan TGF- β 1. *Platelet derived growth factor* (PDGF) yang berasal dari lisat PRF dapat meningkatkan ekspresi reseptor TGF- β 1. Di samping itu Asam Hialuronat juga dapat meningkatkan ECM dalam *signaling* TGF- β 1. Akibat penambahan asam hialuronat ke dalam lisat PRF dapat meningkatkan *signaling* TGF- β 1 dan memperbaiki aktivitas selular sel fibroblas, indeks proliferasi dan deposisi kolagen dibandingkan lisat PRF dan asam hialuronat tanpa kombinasi.¹⁷⁴

Penelitian oleh Greco *et al.*⁸⁵ pada marmot melihat pengaruh penggunaan asam hialuronat (topikal) terhadap jumlah sel fibroblas pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi marmot. Disimpulkan bahwa pemberian asam hialuronat akan memengaruhi pembentukan kolagen dikaitkan dengan peningkatan ekspresi transkrip untuk reseptor hyaluronan CD44 dan RHAMM sebagai kolagen III dan I¹⁷⁵ Dari laporan penelitian pada marmot tersebut dilaporkan kombinasi AH dengan PRF dapat meningkatkan ekspresi *signaling* TGF- β 1 yang berakibat meningkatkan aktivitas sel fibroblas, proliferasi dan deposit kolagen. Namun puncak aktivitas fibroblas yang ditandai dengan peningkatan PDGF baru terlihat pada hari ke-14.¹⁷⁶

Hasil penelitian ini menunjukkan dalam pengamatan pada kelompok A-PRF + AH belum menunjukkan perubahan yang bermakna terhadap luas luka, namun jika menggunakan perhitungan indeks granulasi terdapat peningkatan yang bermakna baik hari ke-3, ke-7 maupun hari ke-14 dibandingkan kelompok lainnya. Pengecilan area luka/epitelialisasi sangat didukung oleh adanya fibrogenesis. Jadi pada penelitian ini peningkatan PDGF belum bermakna pada hari ke-7, karena peningkatan PDGF/fibrogenesis menurut laporan sebelumnya baru menunjukkan peningkatan bermakna setelah hari ke-14 saat proses epitelialisasi yang didukung oleh proses fibrogenesis terjadi secara maksimal.

Penyembuhan LKD tidak semata dari perubahan ukuran luas luka, yang umumnya baru menutup dalam waktu yang lama sampai lebih dari minggu ke-4. Pada penelitian ini pengecilan rerata luas luka dalam 14 hari untuk kelompok A-PRF + AH, A-PRF dan kontrol NaCl masing-masing sebesar 3,40 mm², 2,87 mm² dan 2,25 mm². Hasil penelitian ini sesuai dengan Ramos *et al.*¹⁷⁷, yang menunjukkan pengecilan luas area luka rata rata sebesar 2,75 mm² per hari pada pengamatan selama 4 minggu.

Pada penelitian ini, kombinasi A-PRF + AH pada LKD, pada hari ke-14 masih terjadi peningkatan IG yang bermakna dibandingkan A-PRF saja dan kontrol ($p < 0,001$). Peningkatan VEGF mempunyai peran yang lebih dominan pada proses pembentukan jaringan granulasi terutama pada hari ke-3 dan ke-7, sedangkan penurunan IL-6 baru terjadi pada hari ke-7. Jaringan granulasi merupakan bagian yang cukup penting pada penyembuhan luka, karena jaringan inilah yang akan menjadi stroma baru jaringan yang mengalami luka. Jaringan granulasi terdiri dari fibroblas, fibronectin, asam hialuronat, dan kapiler-kapiler darah. Sebagai bagian dari proses angiogenesis yang dipengaruhi oleh rendahnya kadar oksigen pada luka serta terbentuknya HIF 1 (*Hipoxia induce factor 1 α*) memengaruhi pembentukan fibroblas.¹⁷⁸

Bentukan gel yang padat pada A-PRF + AH memberikan keuntungan karena berfungsi sebagai *scaffold*, berupa jaringan padat yang mengisi defek LKD yang berfungsi membentuk kerangka tempat tumbuhnya jaringan granulasi.¹⁹⁴

Karakteristik A-PRF + AH yang berbentuk seperti gel mampu mengisi defek LKD dan *scaffold* tersebut membantu memfasilitasi pembentukan miotubules yang akan

menjembatani dan pada akhirnya mengisi daerah cedera sehingga terbentuk jaringan baru

Penelitian lain oleh Xie *et al.*¹⁷⁰, penggunaan PRP + AH pada *skin readjuvant* di wajah menunjukkan adanya efek *hydrated environment* sehingga mampu meningkatkan *growth factor*. Selain PRP +AH akan meningkatkan degradasi ECM, sedangkan PRP mampu meningkatkan proliferasi fibroblas.

Asam hialuronat adalah komponen penting matriks ekstraselular yang berkontribusi pada proliferasi dan migrasi sel endotel, fibroblas serta keratinosit pada pembentukan jaringan granulasi. Pada tahap awal pertumbuhan jaringan granulasi didominasi oleh matriks ekstraselular, dibantu oleh AH akan yang berperan pada migrasi sel endotel, fibroblas serta keratinosit ke dalam matriks luka.⁸⁶ Penelitian oleh Tolg *et al.*¹⁷¹ mengatakan pada LKD terjadi hilangnya arsitektur jaringan, polaritas sel dan diferensiasi sel serta gangguan remodeling matriks ekstraselular (ECM). Asam hialuronat melalui reseptornya (RHAMM) memediasi CD44 dan PKC δ untuk motilitas sel RHAMM membentuk tabung sel endotel. Di samping itu AH melalui reseptor RHAMM terlibat dalam perbaikan ECM pada penyembuhan luka.¹⁷⁹

Pada permukaan sel luka terdapat tiga reseptor utama untuk AH yang terdiri dari CD44, RHAMM, dan ICAM-1. Reseptor RHAMM pada awalnya ditemukan sebagai protein larut yang memengaruhi migrasi sel yang membentuk ikatan AH-RHAMM untuk dapat bekerja sama dengan CD44 dalam mempromosikan fibrogenesis serta migrasi sel endotel.¹³⁶ Di samping berpengaruh pada beberapa reseptor di daerah luka, AH juga berperan sebagai pembawa kompleks *vitronectin- growth factor* (VN: GF) yang berperan pada penyembuhan luka. Kompleks VN: GF meningkat secara bermakna pada re-epiteliasasi luka bakar pada model hewan coba babi. Asam hialuronat berfungsi sebagai reservoir bagi *growth factor* dan bioaktif lainnya dan mampu memfasilitasi pengiriman VN: GF ke luka. Kompleks VN: GF dan AH menstimulasi proliferasi fibroblas¹⁸⁰.

Platelet dalam PRP mengandung molekul adhesi seperti fibronektin, fibrin dan vitronektin. Molekul adhesi sel ini berperan dalam proses migrasi sel dan menambah aktivitas biologis potensial PRP. Fibronektin yang terikat trombosit

dapat bertindak sebagai protein bioaktif yang dapat memengaruhi secara langsung renovasi matriks ekstraselular selama perbaikan luka. Efek ini melalui ekspresi metaloproteinase matriks, sehingga membantu regenerasi luka kronik.^{180,181}

Penelitian invitro oleh Chen *et al.*¹³⁵, PRF yang diambil dari donor sehat non DM, menunjukkan adanya pelepasan *Growth Factor* dari PRF yaitu PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF, and EGF. Penelitian lain oleh Ding *et al.*¹³⁰ pada tikus DM, menunjukkan adanya peningkatan kadar TGF- β 1, PDGF-BB, VEGF dengan puncak pada hari ke-7 kemudian akan menurun sampai hari ke-14.

Pendapat lain mengatakan PRF mengandung jaringan fibrin yang dibentuk oleh konversi fibrinogen. Diameter fibrin yang berbeda, rasio massa/panjang, kepadatan, porositas, dan permeabilitas jaringan fibrin dapat mengubah sel adhesi dan migrasi trombosit yang terjebak dalam fibrin. Penambahan AH pada PRF dan derajat keterikatan AH dan PRF memicu pelepasan *growth factor* dari butiran trombosit yang didukung oleh kemampuan AH untuk menyerap kadar air dari PRF. Trombosit yang terjebak dalam fibrin dari PRF+AH hampir 1,5 kali lipat dibandingkan PRF saja, yang mengandung cairan lebih banyak.¹⁴⁸

Penelitian invitro pada AH dicampur dengan PRP yang berasal dari pasien non DM, menunjukkan adanya peningkatan bermakna pelepasan TGF- β 1 dan PDGF-AA pada hari ke-5, dibandingkan PRP saja. Penambahan AH pada PRP akan meningkatkan konsentrasi GF pada hari ke-5, sedangkan hari ke-0 dan hari ke-3 belum terjadi peningkatan yang bermakna.²² Pada penelitian PRF non DM, dari bahan tersebut didapatkan peningkatan TGF- β 1, PDGF-AB, FGF-2, dan VEGF terdeteksi pada hari ke-7, setelah itu menurun sampai hari ke-14, kecuali PDGF-BB tetap meningkat bahkan sampai hari ke-14.¹⁴⁸

5.5.3 Pengaruh A-PRF + AH pada Penyembuhan Luka melalui Penurunan Inflamasi

Inflamasi dan angiogenesis mempunyai hubungan erat dengan penyembuhan luka. Selama peradangan akut terjadi hiperpermeabilitas vaskular yang memungkinkan mediator inflamasi dan sel respons imun, termasuk leukosit dan monosit/makrofag, untuk migrasi ke lokasi kerusakan jaringan.¹²⁸ Menurut Eming *et al.*¹⁷² fase

inflamasi diperlukan pada penyembuhan luka awal yang ditunjukkan oleh monosit untuk penyembuhan luka yang normal.

Pada penelitian ini pemberian A-PRF + AH juga dapat mempercepat penurunan proses inflamasi pada hari ke-7 dengan penurunan kadar IL-6 yang bermakna dari 106,4 ke 88,7 pg/mg protein dibandingkan kelompok A-PRF (dari 91,9 ke 48,8 pg/mg protein) dan kontrol (dari 125,3 ke 167,9 pg/mg protein) dengan $p = 0,041$. Penurunan inflamasi ini sejalan dengan peningkatan jaringan granulasi dan pengurangan skore nyeri secara klinis.

Selain sebagai anti-inflamasi yang memengaruhi percepatan pembentukan granulasi, efek anti-inflamasi A-PRF + AH pada penelitian ini juga mengurangi nyeri yang bermakna pada hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14 dibandingkan kelompok lainnya. Ilio *et al.*²² melaporkan HA+PRP pada injeksi *knee osteoarthritis* juga memiliki sifat analgesik dengan aktivitas spesifik pada reseptor opioid. Pada penelitian Agrawal *et al.*¹⁸⁴ pada operasi bedah mulut pada gigi molar III, pemberian PRF+HA akan mengurangi rasa nyeri, edema dan trismus dibandingkan pemberian PRF saja. Aplikasi topikal A-PRF + AH meningkatkan permeabilitas vaskular pada edema karena A-PRF-AH mengandung anion bermuatan negatif yang akan mengurangi edema. Di samping itu sifat AH dapat menghidrasi jaringan dan mengatur keseimbangan osmotik.

Dari penelitian Russo *et al.*¹⁸³ pada penelitian kombinasi HA dan PRP injeksi pada *knee osteoarthritis*, kombinasi PRP+AH memberikan efek perlindungan dengan berkurangnya pelepasan sitokin (IL-1 β , IL-6, dan TNF- α) saat inflamasi awal sehingga memungkinkan percepatan fase inflamasi yang sebelumnya mengalami perpanjangan peradangan akibat osteoarthritis. Pada evaluasi terhadap tingkat konsentrasi plasma interleukin (IL-1 β), TNF- α , NF κ -B menunjukkan kombinasi PRP dan HA menghambat peradangan pada pasien dengan osteoarthritis lutut.¹⁷⁹

Pada penelitian ini, dengan dilakukan analisis subkelompok, terdapat penurunan inflamasi kelompok A-PRF + AH dibandingkan A-PRF saja pada hari ke-3 ($p = 0,041$) dan hari ke-7 ($p = 0,023$). Penambahan AH memperkuat penurunan inflamasi pada PRF secara bermakna. Penggunaan kombinasi A-PRF dengan AH dapat menurunkan proses inflamasi yang ditandai dengan penurunan IL-6. Sifat

anti-inflamasi A-PRF juga dapat meningkatkan kadar VEGF yang mempunyai peran penting pada proses pembentukan jaringan granulasi.

Platelet rich fibrin sendiri mengandung makrofag yang diperlukan dalam penyembuhan luka. Asam hialuronat mempunyai sifat mengatur inflamasi pada penyembuhan luka. Chen *et al.*¹⁷⁹ dalam studi *in vitro*, terlihat sinergisme efek anabolik AH dan PRP pada regenerasi tulang rawan pada OA. Dalam laporan tersebut, kombinasi HA dan PRP mengurangi sitokin proinflamasi dan peningkatan proliferasi kondrosit artikular melalui Jalur Erk 1 / 2 pada AH dan Jalur Smad2 /3 pada PRP.

Penelitian lain Ghanaati *et al.*¹⁸⁵, pada pengobatan estetika, dikatakan PRF+AH aman dan paling sering digunakan untuk perawatan estetika dan pembesaran pori kulit. serta dapat menghilangkan bekas sayatan dan bekas luka melalui peningkatan sistem bioaktif yang mendorong regenerasi kulit .

Peningkatan molekul adesi (ICAM-1 VICAM-I dan selektin-L) dan sitokin pro-inflamasi (TNF- dan IL-1) berperan dalam menimbulkan inflamasi aktif dalam sendi. Pada LKD, reseptor sel endotel ICAM-1 dan VCAM-1 akan berikatan dengan neutrofil sehingga terjadi inflamasi yang berkepanjangan. Ikatan antara AH dengan reseptor ICAM dan VCAM, dapat menurunkan suasana inflamasi dengan menekan reseptor ICAM, VCAM dan menghalangi ikatan leukosit dengan ICAM dan VCAM. Hal tersebut akan mempersingkat waktu fase inflamasi , sehingga fase penyembuhan luka dapat segera dilanjutkan fase proliferasi dan granulasi.¹⁷⁷

PRF sendiri memiliki sifat anti inflamasi dengan menginduksi proliferasi, migrasi, adhesi dan diferensiasi sel yang mendukung proses penyembuhan luka.¹³⁷ Jadi kombinasi A-PRF + AH pada LKD akan bersinergi melalui ikatan dengan reseptor sel endotel ICAM-1 dan VCAM-1 sehingga akan menghambat respons berkepanjangan leukosit (limfosit dan monosit).¹³⁷

Jalur lain pada penurunan inflamasi dari PRF atau AH adalah melalui jalur perubahan polarisasi makrofag. Terapi topikal PRF sendiri juga dapat menurunkan inflamasi dengan mempercepat polarisasi dari M1, yang bersifat pro-inflamasi kuat menjadi M2, yang bersifat anti-inflamasi. Aktivasi M1 dikaitkan dengan

peradangan, resistensi tumor, dan rejeksi *graft*. Sebaliknya aktivasi sel M2 mengakibatkan terjadinya regulasi sistem imun, deposisi matriks selular dan remodeling jaringan, serta mengurangi risiko penolakan graft kulit.

Jadi mekanisme A-PRF + AH dapat menurunkan inflamasi adalah melalui:

1. Hambatan TNF- α sehingga dapat menghambat peningkatan IL-6 dan IL-8.¹⁵³
2. Hambatan ekspresi IL-1 β , MMP-1 dan MMP-3 sehingga menghambat inflamasi kronis.
3. Menurunkan IL-8, iNOS, dan TNF α melalui pensinyalan TLR / MyD88 / MAPK / NF- κ B. Hambatan jalur pensinyalan MAPK dapat menurunkan aktivasi NF- κ B dan AP-1 yang menyebabkan peningkatan sintesis dan menghambat degradasi ECM.¹⁵⁴
4. Mekanisme lain untuk menurunkan inflamasi dengan cara menurunkan permeabilitas interstisial.
5. AH dapat meningkatkan reseptor endotel ICAM dan VCAM, sehingga dapat menghalangi ikatan dengan *neutrophil*, sehingga kebocoran vaskular dapat dicegah.
6. Asam hialuronat pada A-PRF juga memperkuat pergeseran polarisasi makrofag dari M1 menjadi fenotipe M2.¹⁵⁵ Jalur polarisasi makrofag dari proinflamasi fenotip M1 menuju fenotip M2 yang bersifat anti-inflamasi.
7. Selain bersifat anti-inflamasi, kombinasi A-PRF + AH juga bersifat immunosupresif dan antioksidan. Fungsi antioksidan dengan menghambat jalur siklooksigenase dan lipooksigenase serta menurunkan kadar ROS dan akhirnya akan menurunkan inflamasi.¹⁵⁷

5.6 Kelebihan dan Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini adalah uji klinis pertama yang secara khusus menilai pengaruh kombinasi A-PRF + AH terhadap peningkatan *growth factor* dan penurunan inflamasi pada pasien LKD. Adapun peningkatan *growth factor* untuk menggambarkan proses angiogenesis dan fibrogenesis pada penyembuhan LKD. Angiogenesis pada proses pembentukan tunas pembuluh darah baru (*sprouting*) dan berperan penting pada pembentukan jaringan granulasi serta penyembuhan LKD. Fibrogenesis adalah pembentukan jaringan kolagen yang diperlukan untuk

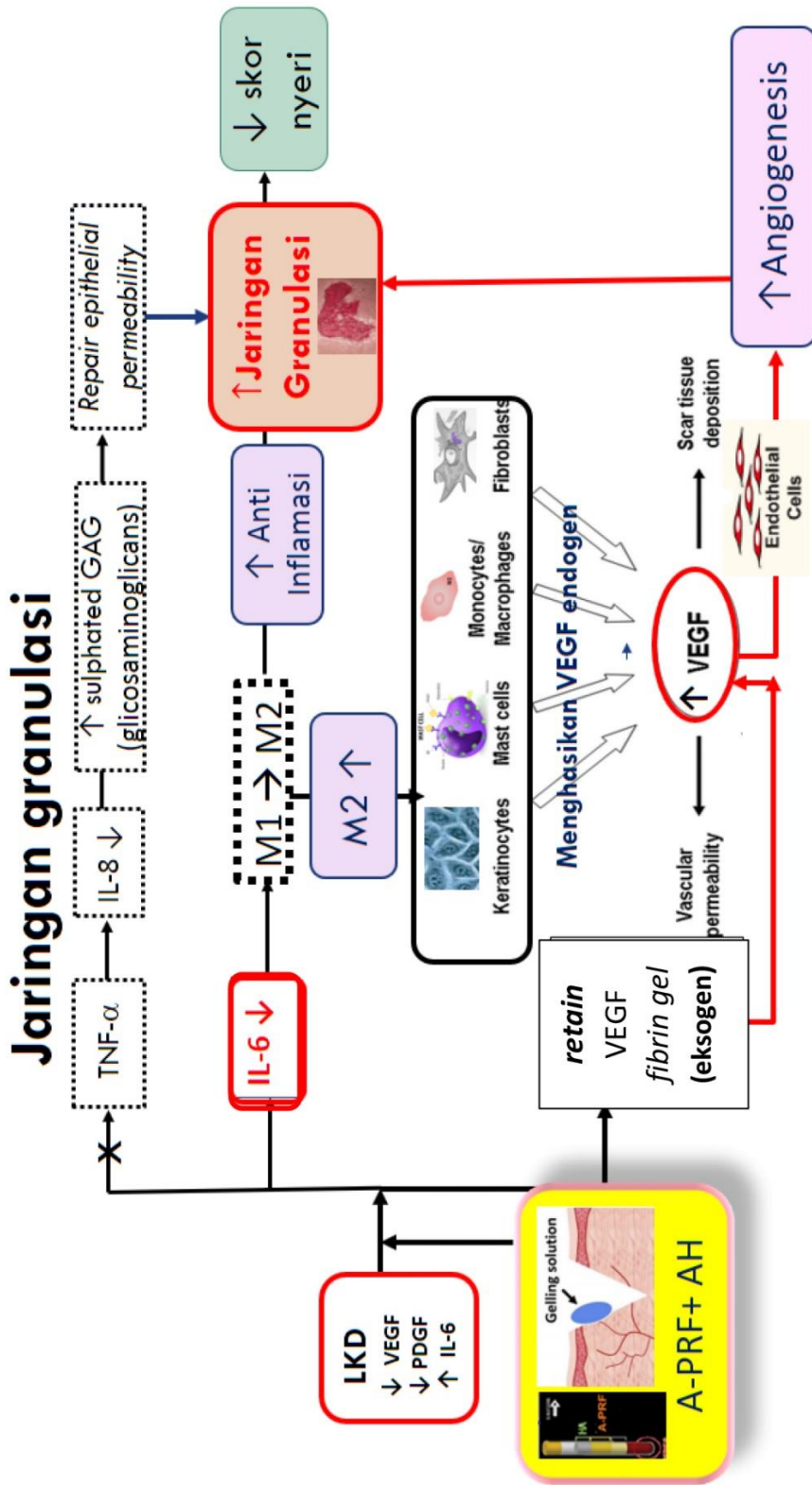
epitelialisasi pada proses penyembuhan LKD. Penelitian yang pernah dipublikasikan sebelumnya adalah kombinasi PRP +AH yang digunakan pada bidang dermatologi dan ortopedi, dan dilakukan pada subjek non DM tanpa mengetahui apakah melalui proses peningkatan angiogenesis maupun fibrogenesis.

Kelebihan yang lain adalah disain penelitian ini yang merupakan uji klinis acak terbuka. Pemilihan subjek dilakukan random untuk menjelaskan bagaimana suatu perlakuan tertentu termasuk bahan tertentu dapat menimbulkan suatu efek terapi tertentu.

Pada penelitian ini juga dilakukan kontrol terhadap berbagai faktor perancu yang berpotensi memengaruhi hasil, dengan mengeluarkan subjek yang masuk dalam kriteria eklusi. Berbagai kondisi maupun terapi bahan yang berpotensi mengganggu hasil pemeriksaan penanda pembentukan jaringan granulasi telah dikontrol, sehingga diharapkan luaran yang didapat adalah benar-benar penganruh kombinasi A-PRF + AH dan bukan pengaruh dari berbagai factor perancu tersebut.

Ada beberapa keterbatasan dalam penelitian ini. Pertama, peneliti hanya memeriksa dua dari banyak *growth factor* potensial lainnya, seperti faktor EGF, FGF, IGF serta TGF- β 1. Peneliti menggunakan VEGF, PDGF dan IL-6 untuk melihat mekanisme angiogenesis, fibrogenesis dan inflamasi. dan ketiga biomarker tersebut yang paling banyak dipelajari serta memainkan peran sentral dalam regenerasi jaringan. Namun, efeknya AH pada pelepasan *growth factor* pada LKD mungkin dapat melalui jalur lain untuk meningkatkan angiogenesis dan fibrogenesis. Kedua, hanya 10% subjek berusia < 45 tahun dalam penelitian ini. Perbedaan usia sangat memengaruhi hasil terutama fungsi platelet yang memengaruhi konsentrasi PDGF yang dihasilkan oleh A-PRF + AH. Ketiga, semua subjek yang ikut dalam penelitian ini didapatkan kendali glukosa darah belum terkontrol dengan baik terutama pada kelompok A-PRF + AH, sehingga kendali glukosa darah yang tidak terkontrol akan memengaruhi fase inflamasi. Berikut *proposed mechanism* A-PRF + AH dalam peningkatan jaringan granulasi (Gambar 5.1.)

Propose Mechanism A-PRF+AH meningkatkan Jaringan granulasi



Gambar 5.1. Proposed Mechanism A-PRF+AH dalam Peningkatan Jaringan Granulasi

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

1. Terapi kombinasi topikal A-PRF+AH meningkatkan marker angiogenesis VEGF secara bermakna baik pada hari ke-3 dan ke-7 dibandingkan A-PRF dan kontrol NaCl.
2. Terapi kombinasi topikal A-PRF+AH meningkatkan marker fibrogenesis PDGF namun tidak bermakna baik pada hari ke-3 dan hari ke-7 dibandingkan A-PRF dan kontrol NaCl.
3. Terapi kombinasi topikal A-PRF+AH tidak menurunkan marker inflamasi IL-6 usap LKD secara bermakna pada hari ke-3, namun bermakna pada hari ke-7 dibandingkan A-PRF dan kontrol NaCl
4. Terapi kombinasi topikal A-PRF+AH meningkatkan indeks granulasi secara bermakna pada hari ke-3, hari ke-7, dan hari ke-14, dibandingkan A-PRF dan kontrol NaCl

6.2 Saran

Pelayanan Masyarakat

Pemberian terapi kombinasi A-PRF + AH dapat direkomendasikan pada LKD dengan karakteristik sama sebagai terapi topikal yang aman dan efektif mempercepat pembedakan jaringan granulasi

Akademis

Gambar 14. dapat melengkapi buku ajar tentang peran kombinasi A-PRF + AH dalam mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan mengurangi nyeri pada proses penyembuhan LKD

Penelitian

Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan dosis AH yang lebih tinggi (1%, 2% dan 3%) untuk mengetahui dosis optimal A-PRF+AH dan waktu pengamatan yang lebih panjang pada proses penyembuhan LKD. Diperlukan juga penelitian lanjutan penggunaan A-PRF+AH untuk terapi LKD dengan luas luka yang lebih besar dan jumlah subjek penelitian yang lebih besar. *ImageJ* dapat dipertimbangkan alat pengukur evaluasi jaringan granulasi penyembuhan LKD.

RINGKASAN

LATAR BELAKANG

Penyakit metabolik Diabetes Melitus terjadi karena tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi sel beta pankreas dengan baik sehingga terjadi peningkatan kadar glukosa dalam darah melebihi batas normal (hiperglikemia). Hiperglikemia yang berlangsung lama dapat menyebabkan kerusakan serius di berbagai organ, terutama saraf dan pembuluh darah.¹

Diabetes melitus banyak memberikan komplikasi kronik dan yang terbanyak adalah nefropati diabetik (42,6%), diikuti retinopati diabetik (37,6%), penyakit jantung koroner (33%), pembuluh darah perifer (30%), neuropati diabetik (23,4%) dan pembuluh darah otak (19%). Komplikasi kronik DM umumnya akibat gangguan pembuluh darah (angiopati) dan neuropati. Komplikasi kronik makroangiopati adalah 66,5% dan mikroangiopati adalah 81,7%.⁴ Manifestasi mikroangiopati dan neuropati adalah LKD yang merupakan masalah penting di masyarakat yang merupakan penyebab utama amputasi atau kematian akibat DM.^{5,6}

Faktor yang menghambat penyembuhan LKD antara lain durasi dan tingkat keparahan, hiperglikemia, inflamasi kronik dan kadar fibrinogen serum. Pada DM penyembuhan luka terhambat karena kadar glukosa yang tinggi. Kadar glukosa darah > 200 mg/dL akan menghambat penyembuhan luka. Dengan pemantauan kadar glukosa darah dan terapi insulin intensif risiko hiperglikemia dapat menurun.

Hiperglikemia juga meningkatkan *irreversible Advanced glycosylation end products* (AGE). Akumulasi AGE di dinding pembuluh darah mengakibatkan aterosklerosis yang menjadi dasar komplikasi kronik diabetik.¹⁰ Disfungsi selular yang disebabkan peningkatan AGE terjadi akibat mekanisme pro-oksidatif sedangkan AGE dan ROS mengganggu vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah, deposisi protein subendotelial, dan inaktivasi oksida nitrat.¹¹ Hiperglikemia menurunkan kemampuan leukosit untuk melawan infeksi karena gangguan aktivitas fagositosis neutrofil.¹²

Pada inflamasi kronik seperti LKD, IL-6 akan tinggi dan memengaruhi pembentukan enzim protease.¹³ Salah satu enzim protease yaitu matriks

metalloprotease (MMP) akan mendegradasi *extracellular matrix* (ECM) yang bekerja pada fase awal penyembuhan luka dengan menghilangkan protein yang rusak dan terjadi degradasi membran basal kapiler.

Pengelolaan dengan mengontrol mikrosirkulasi dan *growth factor* digunakan untuk menginduksi neovaskularisasi. Beberapa *growth factor* yang terlibat dalam proses angiogenesis, antara lain *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endotel growth factor* (VEGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *basic fibroblas growth factor* (b-FGF), dan eritropoietin. Biomarker VEGF dan PDGF adalah penanda kuat angiogenesis yang merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka serta berperan penting memasok makanan ke jaringan yang baru terbentuk.¹⁵ Proses angiogenesis diatur secara spesifik oleh angiomodulator melalui keseimbangan faktor stimulator dan inhibitor angiogenesis.

Beberapa dekade ini mulai dikembangkan perawatan luka menggunakan trombosit yang dikonsentrasikan dalam plasma *platelet rich plasma* yang memiliki kelebihan tingginya kandungan *growth factor* sehingga mampu merangsang penyembuhan tulang dan jaringan lunak serta meningkatkan jaringan kolagen yang berperan dalam proses regenerasi sel. *Growth factor* dalam PRP adalah protein *alpha-granules* yaitu *platelet-derived growth factor* (PDGF), VEGF, EGF, *insulin-like growth factor* (IGF) dan fibronektin.¹⁷ *Platelet-rich fibrin* (PRF) atau *leucocyte-platelet-rich fibrin* (L-PRF) adalah PRP generasi ke-2 yang memanfaatkan trombosit dan leukosit autologus dalam matriks kompleks fibrin untuk mendapatkan *growth factor* yang akan menginduksi proliferasi sel endotel dan pembentukan tabung kapiler untuk angiogenesis, arteriogenesis, serta vaskulogenesis pada LKD.¹⁹ Untuk menambah *growth factor* dalam PRF dapat diatur kecepatan dan lama pemutaran sentrifus. *Advanced-PRF* (A-PRF) dengan *low speed and low time* dapat meningkatkan jumlah *growth factor*.

Asam hialuronat merupakan glikosaminoglikan dan komponen struktural alami kulit di jaringan ikat yang berperan pada peningkatan angiogenesis, penyembuhan luka, dan LKD. Meskipun demikian, belum diketahui apakah kombinasi AH dan A-PRF mempercepat perbaikan jaringan LKD.²²

Wang *et al.*²³ meneliti salep khusus mengandung campuran fragmen AH dari 2 hingga 10 unit disakarida dan dilihat efeknya pada penyembuhan luka mencit DM. Hasil penelitian *in vitro* menunjukkan AH secara bermakna meningkatkan proliferasi, migrasi, dan pembentukan *endothel cell tube* pada kondisi glukosa darah tinggi. Pemberian AH topikal meningkatkan angiogenesis di area luka kulit; mekanisme yang mendasarinya adalah AH meningkatkan fosforilasi *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) dan ekspresi TGF- β 1.

Salah satu kriteria perbaikan luka adalah terbentuknya jaringan granulasi yang terbentuk lebih lambat pada DM. Secara makroskopis jaringan granulasi dapat dihitung luasnya menggunakan *software Image-J*. Jaringan granulasi biasanya tumbuh dari dasar luka dan mengisi luka. Gambaran tersebut dapat direkam dengan kamera digital kemudian dianalisis dengan *Image-J* untuk mengetahui volume, area permukaan, perimeter, diameter, serta indeks granulasi (IG) seluruh lapang pandang. Penyembuhan LKD ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi baru yang terlihat pada *Image-J*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah uji klinis acak terbuka pada penyandang LKD untuk mengetahui pengaruh terapi kombinasi topikal AH dan A-PRF dibandingkan A-PRF saja atau kontrol NaCl ditinjau dari perubahan angiogenesis (Δ VEGF), fibrogenesis (Δ PDGF), inflamasi (Δ IL-6), dan Δ indeks granulasi (*Image-J*). Penelitian dilakukan di RSUD Kojas dan RSPAD Gatot Subroto dan data diambil pada bulan Juli 2019–Maret 2020. Populasi target adalah penyandang LKD Wagner 2 dan luas luka $< 40 \text{ cm}^2$. Kriteria penerimaan adalah penyandang dewasa (≥ 18 tahun) laki-laki dan perempuan dengan luka LKD, klasifikasi Wagner grade 2, luka di bawah lutut > 4 minggu (kronik), luas area luka $< 40 \text{ cm}^2$, ABI $\geq 0,8$.

Peserta penelitian bersedia mengikuti seluruh rangkaian kegiatan pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14. Kriteria penolakan adalah hemoglobin $< 8,0 \text{ g/L}$, HbA1c $> 12,0\%$ (108 mmol/mol), trombosit *concentration* $< 100 \times 10^9/\text{L}$, hemodialisis rutin. Besar sampel ditentukan dengan *rules of thumb* untuk > 2 kelompok, yaitu minimal 7 subjek per kelompok kemudian dihitung berdasarkan rumus uji beda *mean rule of thumb*, yaitu 21 subjek. Untuk mengantisipasi *drop out* dan meningkatkan

ketajamam analisis statistik, besar sampel ditambah 10% menjadi 30 subjek dan besar sampel setiap kelompok 10 subjek.

Pengukuran VEGF, IL-6, PDGF dari usap LKD dilakukan pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7, dengan teknik ELISA (kit) dan diperoleh data numerik dengan satuan pg/mL. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Terpadu FKUI. Reagen ELISA yang dipakai adalah Human VEGF/ IL-6/ PDGF AB /ELISA Kit dengan Kit Insert dari LifesSpan BioSciences, Inch.Cat:LS-F4604. Luas jaringan granulasi diukur dengan kamera digital (Oppo Reno ®, dual camera 48 mega pixel, China) dengan akurasi 0,1% pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14. Hasil foto luka diolah dengan program *Image-J* (software program Java).²⁹

Sejumlah darah yang diambil sesuai luas luka diolah menjadi A-PRF. Untuk kelompok A-PRF + AH, asam hialuronat ditambahkan pada PRF dengan perbandingan A-PRF : AH adalah 1 : 0,6 dengan *vortex* selama 20 detik. Selanjutnya dilakukan randomisasi dan subjek dibagi tiga yaitu kelompok 1 (kombinasi A-PRF + AH), kelompok 2 (A-PRF) dan kelompok 3 (kontrol, NaCl 0,9%). Semua kelompok dilakukan usap LKD pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7 untuk diperiksa VEGF, PDGF, IL-6 dengan metode ELISA. Perlakuan terhadap LKD sesuai kelompoknya (A-PRF + AH atau A-PRF), sedangkan kelompok kontrol hanya dilakukan kompres NaCl. Untuk menilai penyembuhan secara klinis, luka difoto pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14 pada saat luka dibuka pertama kali. Semua foto LKD diolah dengan program *Image-J*. Data dicatat di formulir penelitian kemudian dilakukan tabulasi, verifikasi, *editing*, diberikan kode dan dianalisis dengan program SPSS versi 20. Homogenitas ditentukan dengan uji

Saphiro-Wilk; data sebaran normal dilaporkan dalam rerata dan simpang baku, sedangkan sebaran data tidak normal dilaporkan dalam median dengan nilai minimum dan maksimum. Untuk menjawab pertanyaan penelitian nomor 1,2 dan 3 dilakukan *one way Anova* bila sebaran data normal atau uji Kruskal Wallis bila sebaran data tidak normal. Penelitian ini telah lolos kaji etik dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan Nomor: ND-828/UN2F1/ETIK/PPM.00.02/2019.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dari 30 subjek yang memenuhi kriteria penelitian, usia rerata adalah $62,6 \pm 14,1$ tahun (rentang usia 28–81 tahun). Subjek perempuan (18 orang) lebih banyak dari laki-laki (12 orang) dan rerata IMT 28,2 (SB 2,47). Pada kelompok A-PRF + AH, nilai leukosit, glukosa darah dan HbA1C lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, namun tidak bermakna. Data karakteristik subjek homogen dan tidak berbeda bermakna pada ketiga kelompok perlakuan.

Lokasi luka terbanyak adalah di ujung jari (43,3%). Dari ketiga kelompok perlakuan, luas LKD awal adalah 8,3 (SB 7,1) cm² dan tidak ada perbedaan bermakna luas LKD. Peneliti di Australia melaporkan lokasi LKD terbanyak di *forefoot* (36,4%), diikuti *hallux* (21%), *digiti* (14,9%), *midfoot* (8,2%), dan *heel* (19,5%). Hal ini disebabkan karena faktor komorbid penelitian tersebut adalah *overweight* (35,5%), *obese* (29,8%) dan *morbidly obese* (12,4%) sehingga memengaruhi lokasi LKD karena beban tumpu tubuh dan *weight bearing gait*.⁹⁶

Faktor komorbid penyandang LKD pada penelitian ini sebagian besar adalah hipertensi (43,3%) diikuti obesitas dengan IMT > 28,3 kg/ cm² (26,6%) dan merokok (16,7%). Pada IMT > 30 kg/m² akan terjadi peningkatan resistensi insulin dengan menghambat enzim *adenosine monophosphate-activated kinase* (AMPK) di hati. Pada pasien diabetes dengan obesitas akan meningkat risiko terjadinya *pes planus* dan peningkatan terjadinya LKD (42x) dibandingkan DM non-obesitas.⁹³

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran skor *Numeric Pain Scale* pada pemeriksaan awal ketiga kelompok adalah 7–8 (nyeri berat). Setelah intervensi skor nyeri menurun pada ketiga kelompok namun pada kelompok A-PRF + AH terjadi penurunan bermakna pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 dibandingkan kedua kelompok lainnya. Peran penambahan AH pada PRF pada kasus ekstraksi Molar 3, aplikasi PRF+AH di soket gigi akan menurunkan trismus, skor nyeri dan edema. Asam hialuronat bersifat analgesik dan bersifat menginduksi aktivasi *opioid peptide receptors* (OPr) yang akan menstimulasi κ receptor (KOP).⁸⁹

Pada penelitian ini, data awal kadar VEGF pada ketiga kelompok tidak berbeda bermakna. Pada kelompok A-PRF + AH, kadar VEGF meningkat bermakna hari ke-3 ($p = 0,011$) dan ke-7 ($p < 0,001$) dibandingkan A-PRF dan kontrol. Pada

analisis subkelompok A-PRF + AH, kadar VEGF meningkat bermakna dibandingkan A-PRF hari ke-3 ($p = 0,014$) dan ke-7 ($p = 0,002$). Dibandingkan dengan kelompok kontrol, kadar VEGF pada kelompok A-PRF+ AH juga meningkat di hari ke 3 ($p = 0,005$) dan ke-7 ($p < 0,001$). Pada kelompok A-PRF saja, kadar VEGF meningkat tidak bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 ($p = 0,612$) dan ke-7 ($p = 0,186$).

Hal ini sejalan dengan penelitian laboratorium pada PRP dengan pengamatan RT-PCR terdapat peningkatan mRNA VEGF pada hari 3–7. Pada penelitian lain pada luka pada tikus yang diabetes, didapatkan pelepasan VEGF dari hari 1–14 dengan puncak tertinggi pada hari ke-7.²⁰ Penelitian invitro lainnya menyebutkan PRF akan mengaktifkan ERK *pathway* sehingga terjadi peningkatan ekspresi VEGF hari ke-1 dan ke-7. Peningkatan VEGF ini akan menginduksi proliferasi sel endotel dan terjadi peningkatan aliran darah.¹³⁷

Penambahan AH pada *amnion freeze-dried* pada aplikasi luka in vitro tikus putih (*Rattus strain Wistar*) menyebabkan peningkatan ekspresi VEGF dan pembuluh darah pada hari ke -3 dan menurun pada hari ke-7.¹⁸⁰ Nanopartikel AH/chitosan (500 nm) menyebabkan ekspresi VEGF di permukaan nanopartikel terjadi lebih awal dalam 24 jam, 82% dilepas dalam 24 jam.

Bentukan HA/CS *nanoparticles entrap pro-angiogenic factors*: VEGF (94%) dan PDGF (54%).¹³⁰

Bentukan fibrin membantu pengikatan platelet, dimana VEGF terjebak 1,5 x di fibrin dibandingkan darah lengkap ($p < 0,01$). Pada ikatan fibrin, VEGF meningkat pada hari ke-0 dan ke-14, puncak hari ke-7, PDGF-BB meningkat hari ke-14.¹⁸⁴

Untuk menggambarkan jalur penyembuhan LKD melalui fibrogenesis dapat dilihat melalui analisis biomarker PDGF sebelum dan sesudah perlakuan ketiga kelompok. Pada kelompok A-PRF + AH, kadar PDGF meningkat tidak bermakna dibandingkan kelompok A-PRF dan kontrol pada hari ke-3 dan hari ke-7 dengan uji Kruskal Wallis. Untuk mempertajam analisis dilakukan uji beda rerata dua kelompok, kadar PDGF kelompok A-PRF + AH meningkat tidak bermakna dibandingkan kontrol hari ke-3 ($p = 0,940$) dan ke-7 ($p = 0,218$) sedangkan pada

kelompok A-PRF meningkat tidak bermakna pada hari ke-3 ($p = 0,705$) dan ke-7 ($p = 0,674$) dibandingkan kontrol dengan uji Mann Whitney. Kadar PDGF kelompok A-PRF + AH tidak berbeda bermakna dibandingkan A-PRF hari ke-3 ($p = 0,645$) dan hari ke-7 ($p = 0,059$) dengan uji Mann Whitney.

Tingkat kepadatan PRF + AH memengaruhi pelepasan GF dari granula alfa platelet. Penambahan AH 3% merupakan konsentrasi optimal pada penyerapan air dari PRF sehingga meningkatkan kualitas gel yang akan melepaskan *growth factor* lebih banyak.¹³⁰ Pada penelitian dengan media HCM (Hipoxia Condition Medium) didapatkan AH 3% merupakan dosis optimal untuk meningkatkan PDGF dibandingkan AH 4% dan 10%. Semakin besar konsentrasi dan berat molekul AH, semakin banyak peningkatan *protein binding* dalam HCM yang menyebabkan sulit dilepaskannya GF sehingga terjadi penurunan PDGF.¹⁸⁶

Untuk melihat jalur penyembuhan LKD melalui inflamasi dilakukan analisis biomarker inflamasi yaitu IL-6. Pada kelompok A-PRF + AH, kadar IL-6 menurun bermakna dibandingkan A-PRF dan kontrol pada hari ke-7 ($p = 0,041$) dengan uji Kruskal Wallis. Untuk mempertajam analisis dilakukan uji beda rerata dua kelompok didapatkan kadar IL-6 kelompok A-PRF + AH menurun bermakna dibandingkan kontrol pada hari ke-3 (uji Mann Whitney, $p = 0,041$) dan ke-7 (uji Mann Whitney, $p = 0,008$) sedangkan dibandingkan kelompok A-PRF didapatkan penurunan bermakna di hari ke-7 (uji Mann Whitney, $p=0,049$). Kadar A-PRF menurun tidak bermakna dibandingkan NaCl baik hari ke-3 dan ke-7.

Pada penelitian regenerasi periodontal *canine* Autologous *Open flap debridement* (OFD) dibandingkan OFD+PRF, didapatkan PRF menyebabkan penurunan ekspresi sitokin inflamasi (TNFA dan IL1B).¹²⁹

Asam hialuronat juga mempunyai sifat anti-inflamasi yang ditandai dengan penurunan CRP. Dari penelitian Wu et al.¹⁸², pada penelitian kombinasi HA dan PRP pada *injeksi knee osteoarthritis*, kombinasi PRP+AH memberikan efek perlindungan dengan berkurangnya pelepasan sitokin (IL-1 β , IL-6, dan TNF- α) saat inflamasi awal sehingga memungkinkan percepatan fase inflamasi yang sebelumnya mengalami perpanjangan peradangan akibat osteoarthritis. Tingkat konsentrasi

plasma interleukin (IL-1 β), TNF- α , NF κ -B menunjukkan kombinasi PRP dan AH menghambat peradangan pada pasien dengan osteoarthritis lutut.¹⁸²

Menurut Ulusal *et al.*¹⁹⁴, penggunaan PRP + AH pada *skin readjuvant* di wajah menunjukkan adanya efek *hydrated environment* sehingga mampu meningkatkan *growth factor*. Selain PRP +AH akan meningkatkan degradasi ECM, sedangkan PRP mampu meningkatkan proliferasi fibroblas.

Chen *et al.*¹⁷⁹ dalam studi *in vitro*, terlihat efek sinergis efek anabolik AH dan PRP pada regenerasi tulang rawan pada OA. Dalam laporan tersebut, kombinasi HA dan PRP mengurangi sitokin proinflamasi dan peningkatan proliferasi kondrosit artikular melalui Jalur Erk 1 / 2 pada AH dan Jalur *Smad 2 / 3* pada PRP.

Pada penelitian ini didapatkan rerata penurunan luas LKD dari hari ke-0, hari ke-3, hari ke-7 dan hari ke-14 yang menunjukkan tidak adanya perubahan yang bermakna pada ketiga kelompok perlakuan. Dari pengukuran IG didapatkan A-PRF + AH meningkat bermakna dibandingkan kelompok lainnya (A-PRF dan NaCl) pada hari ke-3 ($p = 0,048$), ke-7 ($p = 0,012$) dan ke-14 ($p < 0,001$).

Hal ini sejalan dengan peningkatan kadar VEGF (angiogenesis) hari ke-3 dan hari ke-7, serta penurunan kadar IL-6 (inflamasi) pada hari ke-7 saja. Di samping peningkatan VEGF, penurunan inflamasi juga memengaruhi aktivasi faktor angiogenik dan meningkatkan angiogenesis atau pembentukan tabung dan pemulihan dinding pembuluh normal. Kombinasi A-PRF + AH juga bersinergi dalam polarisasi M1 menjadi M2. Didapatkan penurunan ekspresi IL1 β dan IL6 akibat PRF menekan translokasi p65 dari sitoplasma dan meningkatkan ekspresi arginase-1 pada makrofag primer. Interaksi AH dengan makrofag akan memengaruhi reseptor CD44 yang merupakan reseptor motilitas TLR2, TLR4, dan STAB2 yang akan menyebabkan polarisasi M1 menjadi M2.¹⁸⁷

Dari penelitian *in vivo* (kelinci non-DM, PRP autologus) didapatkan kombinasi PRP+AH akan meningkatkan epitelialisasi dibandingkan PRP, atau AH atau kontrol pada hari ke-3 ($p = 0,001$), ke-7 ($p = 0,001$) dan ke-14 ($p = 0,025$). Penelitian tersebut juga menyebutkan PRP+AH akan meningkatkan VEGF dan menyebabkan

peningkatan angiogenesis, kemotaksis endotel, mitogenesis epitel dan mesenkim, serta sintesis kolagen.¹⁷³

PRP menekan pelepasan sitokin dan inflamasi sehingga terjadi peningkatan pembentukan kapiler dan jaringan granulasi. Asam Hialuronat dengan rec CD 44 akan meningkatkan ECM, keratinosit dan meningkatkan sintesis jaringan kolagen.¹⁸³

Pada penelitian ini kombinasi A-PRF + AH akan meningkatkan angiogenesis dibandingkan kelompok lainnya. Peningkatan angiogenesis tersebut ditandai dengan peningkatan VEGF dan penurunan IL-6 secara bermakna. Biomarker PDGF juga berperan pada peningkatan angiogenesis, walaupun pada penelitian ini peningkatan PDGF belum bermakna, yang disebabkan konsentrasi AH yang kurang optimal dan kondisi diabetes menyebabkan pelepasan AH membutuhkan waktu lebih dari 7 hari. Di samping itu subjek pada penelitian ini 90% berusia > 45 tahun, sedangkan faktor usia berpengaruh terhadap kualitas PDGF.¹⁸⁸

SIMPULAN DAN SARAN

Terapi kombinasi topikal A-PRF + AH meningkatkan angiogenesis pada penyembuhan LKD yang digambarkan dengan peningkatan bermakna VEGF usap LKD pada hari ke-3 dan ke-7 dibandingkan topikal A-PRF saja atau kontrol NaCl. Kombinasi topikal A-PRF + AH menurunkan inflamasi LKD yang digambarkan dengan penurunan IL-6 usap LKD yang berbeda bermakna pada hari ke-7 dibandingkan topikal A-PRF saja dan kontrol NaCl

Terapi kombinasi topikal A-PRF + AH meningkatkan indeks granulasi secara bermakna baik pada hari ke-3, hari ke-7 maupun hari ke-14 dibandingkan topikal A-PRF saja atau kontrol NaCl. Saran pada LKD dengan karakteristik sama bisa dipertimbangkan penggunaan kombinasi A-PRF + AH karena efektif mempercepat pembentukan jaringan granulasi. Dari *proposed mechanism* ini bisa menjelaskan peran kombinasi A-PRF + AH dalam mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan mengurangi nyeri pada proses penyembuhan LKD namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimal dari AH jika dikombinasi dengan A-PRF

SUMMARY

INTRODUCTION

Diabetes Mellitus occurs because the body cannot properly use the insulin produced by pancreatic beta cells so that there is an increase in glucose levels in the blood beyond normal limits (hyperglycemia). Hyperglycemia that lasts a long time can cause serious damage to various organs, especially nerves and blood vessels.¹

Diabetes mellitus gave many chronic complications such as diabetic nephropathy (42.6%), followed by diabetic retinopathy (37.6%), coronary heart disease (33%), peripheral blood vessels (30%), diabetic neuropathy (23.4%) and cerebral blood vessels (19%). Most chronic complications of DM are caused by blood vessel disorders (angiopathy) and neuropathy. The chronic complications of macroangiopathy were 66.5% and microangiopathy was 81.7%.⁴ The manifestations of microangiopathy and neuropathy are DFS which are important problems in society which are the main cause of amputation or death due to DM.^{5,6}

Factors that inhibit the healing of DFU include duration and severity, hyperglycemia, chronic inflammation and serum fibrinogen levels. In DM wound healing is hampered due to high glucose levels. Blood glucose levels > 200 mg / dL will inhibit wound healing. By monitoring blood glucose levels and intensive insulin therapy the risk of hyperglycemia can be monitored. Hyperglycemia also increases irreversible Advanced glycosylation end products (AGE). The accumulation of AGE in blood vessel walls results in atherosclerosis which is the basis for chronic complications of diabetes.⁹ Cellular dysfunction caused by increased AGE occurs due to pro-oxidative mechanisms, whereas AGE and ROS interfere with vasodilation and vascular permeability, subendothelial protein deposition, and nitric oxide inactivation.^{10,11} Hyperglycemia reduce the ability of leukocytes to fight infection due to impaired neutrophil phagocytosis activity.¹²

In chronic inflammation such as DFU, IL-6 will be high and affect the formation of the protease enzyme.¹³ One of the protease enzymes, matrix metalloprotease (MMP), will degrade the extracellular matrix (ECM), which works in the initial phase of wound healing by removing damaged proteins and degradation of the capillary basement membrane.¹⁴ Management by controlling microcirculation and

growth factors are used to induce neovascularization. Several growth factors are involved in the angiogenesis process, including epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β), basic fibroblast growth factor (b-FGF), and erythropoietin. VEGF and PDGF biomarkers are strong markers of angiogenesis, which is the process of forming new blood vessels in wound healing and plays an important role in supplying food to newly formed tissue. The process of angiogenesis is specifically regulated by angiomodulators through a balance of angiogenesis stimulator and inhibitor factors.¹⁵

In recent decades, wound care has been developed using platelets that are concentrated in platelet rich plasma which has an excess of high growth factor content so that it can stimulate bone and soft tissue healing and increase collagen tissue which plays a role in the cell regeneration process.¹⁶ Growth factors in PRP are alpha-granules protein, namely platelet-derived growth factor (PDGF), VEGF, EGF, insulin-like growth factor (IGF) and fibronectin.¹⁷ Platelet-rich fibrin (PRF) or leucocyte-platelet-rich fibrin (L-PRF) is the 2nd generation PRP that utilizes autologous platelets and leukocytes in the fibrin complex matrix to obtain growth factors that will induce endothelial cell proliferation and the formation of capillary tubes for angiogenesis, arteriogenesis, and vasculogenesis in DFU.^{18,19} To increase growth factors in PRF can be set the speed and duration of the centrifuge. Advanced-PRF (A-PRF) with low speed and low time can increase the amount of growth factor.^{20,21}

Hyaluronic acid is a glycosaminoglycan and a natural structural component of skin in connective tissue that plays a role in increased angiogenesis, wound healing, and DFS.²² However, it is not yet known whether the HA and A-PRF combination accelerates the improvement of the DFU network. Wang *et al.*²³ studied a special ointment containing a mixture of AH fragments from 2 to 10 disaccharide units and observed its effect on wound healing of DM mice. The results of the *in vitro* study showed that AH significantly increased the proliferation, migration, and formation of endothelial cell tubes in conditions of high blood glucose. Topical AH administration increases angiogenesis in the wound area of the skin; The underlying

mechanism is that AH increases extracellular-signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation and TGF- β 1 expression.²⁴

One of the criteria for wound repair is the formation of granulation tissue that is formed more slowly in DM. Macroscopically, the granulation tissue area can be calculated using Image-J software. Granulation tissue usually grows from the wound bed and fills in the wound. This image can be recorded with a digital camera and then analyzed with Image-J to determine the volume, surface area, perimeter, diameter, and granulation index (GI) of the entire field of view. Healing of DFU was characterized by the formation of new granulation tissue as seen on Image-J.²⁵

RESEARCH METHODS

This study is an open randomized clinical trial in people with DFS to determine the effect of topical combination therapy AH and A-PRF compared to A-PRF alone or NaCl control in terms of changes in angiogenesis (Δ VEGF), fibrogenesis (Δ PDGF), inflammation (Δ IL-6), and Δ granulation tissue (Image-J).

The research was conducted at Koja Hospital and Gatot Subroto Army Hospital and data were collected in July 2019–March 2020. The target population was people with LKD Wagner 2 and wound area $< 40 \text{ cm}^2$. Admission criteria were adults (> 18 years) male and female with DFS injuries, Wagner classification grade 2, injuries below the knee > 4 weeks (chronic), wound area $< 40 \text{ cm}^2$, ABI > 0.8 .

Research participants are willing to take part in a whole series of activities on the 0th, 3rd, 7th and 14th day. Meanwhile, the criteria for rejection were hemoglobin $< 8.0 \text{ g/L}$, HbA1c $> 12.0\%$ (108 mmol/mol), platelet concentration $< 100 \times 10^3 \text{ g/L}$, routine hemodialysis. The sample size was determined by the rules of thumb for > 2 groups, namely a minimum of 7 subjects per group and then calculated based on the mean rule of thumb difference test formula, namely 21 subjects. To anticipate drop out and increase the sharpness of statistical analysis, the sample size was increased by 10% to 30 subjects and the sample size for each group was 10 subjects. VEGF, IL-6, PDGF measurements from DFU swabs were carried out on day 0, 3 and 7, using the ELISA technique (kit).

The examination was carried out at the FKUI Integrated Laboratory. The ELISA reagent used was Human VEGF / IL-6 / PDGF AB / ELISA Kit with Insert Kit from LifesSpan BioSciences, Inch.Cat:LS-F4604. The granulation network area was measured by a digital camera (Oppo Reno ®, dual camera 48 mega pixel, China) with an accuracy of 0.1% on the 0th, 3rd, 7th and 14th days. The wound photos were processed using Image-J (Java software program).²⁵

The amount of blood drawn according to the area of the wound based on the grid method is 20–40 mL. From 10 mL of peripheral venous blood can be processed into 4–5 mL A-PRF and from 1 mL A-PRF can be used in DFU with an area of 10 cm².

DFU swabs were taken from all groups to be examined for VEGF, PDGF, IL-6 and total protein. Furthermore, randomization was carried out and the subjects were divided into three groups, namely group 1 (combination A-PRF + AH), group 2 (A-PRF) and group 3 (control, NaCl 0.9%). In the A-PRF: AH group, hyaluronic acid was added to the PRF with the A-PRF: AH ratio of 1: 0.6 with a vortex for 20 seconds, then VEGF, PDGF and IL-6 were examined using the ELISA method. In the A-PRF group, topical A-PRF was applied, while in the control group NaCl compresses were applied.

To assess clinical healing, wounds were photographed on days 0, 3, 7 and 14 when the wound was first opened. All DFU photos were processed using the Image-J program. The data were recorded on the research form and then tabulated, verified, edited, coded and analyzed using the SPSS version 20 program. Homogeneity was determined by the Saphiro-Wilk test; normal distribution data is reported in means and standard deviations, while abnormal data distribution is reported in medians with minimum and maximum values. normal.

This study has passed the ethical review from the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia with Number: ND-828 / UN2F1 / ETIK / PPM.00.02 / 2019.

RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

Of the 30 subjects who met the study criteria, the mean age was 62.6 ± 14.1 years (age range 28-81 years). Female subjects (18 people) were more than men (12 people) and the average BMI was 28.2 (SB 2.47). In the A-PRF + AH group, the leucocyte, blood sugar and HbA1C values were higher than the other groups, but not significantly different. Subject characteristic data were homogeneous and not significantly different in the three treatment groups. Most of the wound sites were at the toetips (43.3%). All wounds were according to Wagner 2's criteria with subdermic (90%), fascial (6.6%) and dermal (3.3%) wound bases. Most of the secretions produced by DFU were moderate (63%). Of the three treatment groups, the baseline DFU area was 8.3 (SB 7.1) cm² and there was no significant difference in the extent of DFU.

Researchers in Australia reported the most DFU locations in the forefoot (36.4%), followed by hallux (21%), digital (14.9%), midfoot (8.2%), and heel (19.5%). This was due to comorbid factors overweight (35.5%), obese (29.8%) and morbidly obese (12.4%).²⁶ This is because the comorbid factors in the study were overweight (35.5%), obesity (29.8%) and morbid obesity (12.4%) so that it affected the location of DFU due to body load and weight-bearing gait.

The comorbid factors of people with DFU in this study were mostly hypertension (43.3%) followed by obesity with BMI $> 28.3 \text{ kg} / \text{cm}^2$ (26.6%) and smoking (16.7%). At BMI $> 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ there will be an increase in insulin resistance by inhibiting the enzyme adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) in the liver. In obese diabetic patients, there is an increased risk of pes planus foot and an increase in the occurrence of DFU (42x) compared to non-obese DM.²⁷

In this study, the initial data on VEGF levels in the three groups were not significantly different. On group A-PRF + AH, VEGF levels significantly increased on the 3rd ($p = 0.022$) and 7th day ($p = 0.001$) compared to A-PRF and controls. In the A-PRF + AH subgroup analysis, VEGF levels increased significantly compared to A-PRF day 3 ($p = 0.014$) and 7 ($p = 0.002$). Compared with the control group, A-PRF + AH also increased at day 3 ($p = 0.003$) and 7 ($p < 0.001$). In the A-PRF group alone, VEGF levels increased not significantly compared to controls on day-

3 ($p = 0.612$) and day-7 ($p = 0.186$). This is in line with laboratory studies on PRP with RT-PCR observations there was an increase in VEGF mRNA on day 3 until day-7. In a study of wounds in diabetic rats, VEGF release was obtained from day 1–14 with the highest peak on day 7. Another invitro study states that PRFM will activate the ERK pathway resulting in an increase in VEGF expression on days 1 and 7. This increase in VEGF will induce endothelial cell proliferation and increase blood flow.²⁹

The addition of AH to freeze-dried amnion in in vitro wound applications of mice white (Rattus strain Wistar) caused an increase in VEGF and vascular expression on day 3 and decreased on day 7.¹⁸⁰ HA / chitosan nanoparticles (500 nm) caused VEGF expression on the surface of the nanoparticles to occur earlier in 24 hours, 82% were released within 24 hours. The formation of HA / CS nanoparticles entrap pro-angiogenic factors: VEGF (94%) and PDGF (54%).³⁰

Fibrin formation helps platelet binding, where VEGF is trapped 1.5 times in fibrin compared to complete blood ($p < 0.01$). In fibrin binding, VEGF increased at day-0 and day-14, peak at day-7, PDGF-BB increased on day 14.³¹

To describe the pathway for DFU healing through fibrogenesis, it can be seen through PDGF biomarker analysis before and after treatment of the three groups. In the A-PRF + AH group, PDGF levels increased not significantly compared to A-PRF and control groups on day 3 and day 7 with the Kruskal Wallis test. To sharpen the analysis, the mean difference test was carried out for the two groups, the levels of PDGF in the A-PRF + AH group did not increase significantly compared to the control on day 3 ($p = 0.940$) and 7 ($p = 0.218$) while in group A-PRF did not increase significantly. on day 3 ($p = 0.705$) and 7 ($p = 0.674$) compared to control with the Mann Whitney test. PDGF levels in the A-PRF + AH group were not significantly different compared to A-PRF on day 3 ($p = 0.645$) and day 7 ($p = 0.059$) with the Mann Whitney test. This study used combine A-PRF with AH at a dose of 0.075% (0.12 mg / 1.6 mL A-PRF + AH (based on non-DM OA cases).

Research on chronic bone graft flap surgery periodontitis, found a tendency for healing and an increase in PGDF-BW levels in the PRF group compared to the control group (without PRF) but the increase was not significantly³²

In the study of osteoblast proliferation and differentiation of non-diabetic rats, it was found that PRF released the highest TGF-beta1 on day 14 while PDGF-AB experienced a peak on day 7. PRF releases GF gradually and expresses a stronger and longer lasting effect.³³

In the study of osteoarthritis and tendinopathy, the combination of PRF and hyaluronic acid (ARTZ-Dispo HA BM 50e120 kDa) obtained AH 0.6 mL + PRP 1 mL (6%) will release GF (PDGF ↑) on day 5 compared to AH 0, 4 mL + PRP 1 mL (4%) and PRP 1 mL. This is due to the synergistic effect of the AH-dependent pathway, namely the Erk 1 / 2 pathway and the PRP-dependent Smad 2 / 3 pathway.^{23,78}

In vitro studies the addition of various concentrations of HA to PRF non-DM, it was found that AH 3% would increase the optimal PDGF compared to HA 4% and HA 10%. The level of PRF + HA density affects the release of GF from alpha platelet granules.²⁴ The addition of HA 3% is the optimal concentration for water absorption from PRF so that it improves the quality of the gel which will release more growth factor. In research with HCM media (Hypoxia Condition Medium), the optimal dose of 3% HA 3% to increase PDGF compared to HA 4% and 10%. The greater the concentration and molecular weight of AH, the greater the increase in protein binding in HCM which causes it to be difficult to release GF so that PDGF decreases.²⁵

To see the pathway of healing DFU through inflammation, an analysis of inflammatory biomarkers was carried out, namely IL-6. In the A-PRF + HA group, IL-6 levels decreased significantly compared to A-PRF and controls on day-7 ($p = 0.041$) with the Kruskal Wallis test. To sharpen the analysis, the mean difference test of the two groups was carried out, it was found that IL-6 levels in the A-PRF + HA group decreased significantly compared to the control on day 3 ($p = 0.049$) and day-7 ($p = 0.041$) while in the A-PRF group decreased significantly on day-3 and day-7 compared to controls with the Mann Whitney test. IL-6 levels in the A-PRF + AH group decreased significantly compared to A-PRF on day 7 ($p = 0.023$) using the Mann Whitney test. In research on periodontal regeneration of canine autologous Open flap debridement (OFD). Compared to OFD + PRF, PRF showed a decrease in the expression of inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1B).²⁶

In this study, it was found that the average reduction in DFU area from day 0, 3, 7 and 14 showed no significant changes in the three treatment groups. In the A-PRF + AH group, there was a significant increase in granulation area on day 3 ($p = 0.002$), 7 ($p = 0.004$) and 14 ($p = 0.010$) compared to other groups. From the measurement of IG, it was found that A-PRF + AH significantly increased compared to the other groups (A-PRF and NaCl) on days 3, 7 and 14 ($p < 0.001$).

In vivo research studies (non-DM rabbits, autologous PRP) a combination was obtained PRP + AH will increase epithelialization compared to PRP, HA or control on day 3 ($p = 0.001$), 7 ($p = 0.001$) and 14 ($p = 0.025$). Research that also mention PRP + AH will increase VEGF and cause increase angiogenesis, endothelial chemotaxis, epithelial and mesenchymal mitogenesis, and collagen synthesis. PRP suppresses the release of cytokines and inflammation resulting in increased formation capillaries.^{27,62}

In this study, the combination A-PRF + HA will increase angiogenesis in comparison to the other groups. The increase in angiogenesis is characterized by an increase in VEGF and decreased IL-6 significantly. Hyaluronic acid with rec CD 44 will increase ECM, and keratinocytes increase collagen tissue synthesis.²⁸

PDGF biomarkers also played a role in the increase angiogenesis, although in this study the increase in PDGF was not significant, that is due to the suboptimal concentration of AH and the condition of diabetes causing release AH takes more than 7 days.⁶⁵

Several PRF studies in non-DM cases reported that there was an accelerated reduction in pressure ulcer area (UP) in the PRF group +HA compared to other groups. The effect of PRF increases fibroblasts differentiation and miofibroblast which cause wound healing, tissue hydration and osmotic balance.^{35,67}

Hyaluronate acid has lubricating, hydroscopic, and homeostatic properties. Besides an increase in VEGF, a decrease in inflammation also affects the activation of angiogenic factors and increase angiogenesis or tube formation and vessel wall restoration normal.⁶⁸

Combination A-PRF + HA also synergizes in polarization of M1 to M2. There was a decrease in IL1 β and IL6 expression due to PRF suppressing p65 translocation from the cytoplasm and increased arginase-1 expression in primary macrophages. The interaction of AH with macrophages will affect the CD44 receptor which is the motility receptor of TLR2, TLR4, and STAB2 which will cause polarization of M1 to M2.^{31,78,110}

In this study, the measurement of the Numeric Pain Scale score was done at the initial examination of the three groups which was 7–8 (severe pain). After the intervention, the pain score decreased in all three groups but in the A-PRF + AH group there was a significant decrease on the 3rd, 7th and 14th day compared to the other two groups. In the A-PRF + AH group the pain score decreased significantly compared to A- PRF alone on day 3 ($p < 0.001$) and 7 ($p = 0.029$) but decreased not significantly on day 14 ($p = 0.957$). In the A-PRF group compared to control, the pain score did not decrease significantly on day 3 ($p = 0.063$), but decreased significantly on day 7 ($p = 0.035$) and 14 ($p = 0.007$). In the A-PRF + AH group compared to control, the pain score decreased significantly on day 3 ($p < 0.001$), day 7 ($p = 0.007$) and 14 ($p = 0.002$). In the case of osteoarthritis, studies with PRP + AH injection will reduce the WOMAC pain score ($p < 0.05$) compared to PRP and AH alone. The role of adding AH to PRF in cases of 3rd Molar extraction, PRF + AH application in the tooth socket will reduce trismus, pain scores and edema. Hyaluronic acid is analgesic and induces activation of opioid peptide receptors (OPr) which will stimulate κ receptors (KOP).^{22,112}

CONCLUSION

Topical combination therapy A-PRF + AH increases angiogenesis in the cure of DFU as reflected by increased significantly of VEGF on days-3 and day-7 compared to topical A-PRF alone or control. Topical combination therapy A-PRF + HA reduced DFU inflammation as reflected by decreased IL-6 not significant on day 3, otherwise significant on day-7 compared to topical A-PRF alone and control. Meanwhile topical combination therapy A-PRF +HA did not increase fibrogenesis which was not increase significantly in A-PRF + HA compared to A-PRF alone or control on either day 3 or day 7. In final result, combination therapy A-PRF + HA

will increase the granulation index directly on day-3, day-7 or day-14 compared to topical A-PRF alone or NaCl control.

RECOMMENDATION

Based on this study, combination therapy A-PRF + HA can be accepted in DFU in the same way as topical therapy that is safe and effective in accelerating the formation of granulation tissue. The role of A-PRF + HA combination in serving orders, granulation tissue and reducing pain in the healing process of DFU. Further research is needed on the optimal dose addition of AH on A-PRF to be able to increase fibrogenesis also closely, so as to provide more optimal DFS healing results.

DAFTAR PUSTAKA

1. PERKENI. Konsensus Pengendalian Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Di Indonesia ; 2015. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S. IDF Diabetes Atlas : Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138(1):271–81. doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023
3. Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar. Badan Penelitian dan Pengembangan Kemenkes RI Jakarta. 2013.
4. Heydari I, Radi V, Razmjou S, Amiri A. International Journal of Diabetes Mellitus Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. *Int J Diabetes Mellit.* 2010;2(1):61–3. doi:10.1016/j.ijdm.2009.081
5. Mulholland HB, Owen JA, Brookins Taylor J. Complications of Diabetes Mellitus. *J Dis Mon.* 2006;6(6):1–30. doi:10.1016/S0011-5029(60)80006-5
6. Purwanti LE, Maghfirah S. Faktor Risiko Komplikasi Kronis (Kaki Diabetik) Dalam Diabetes Mellitus Tipe 2. *J Indones Health Sci.* 2016;7(1):26–39.
7. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis†. *Ann Med.* 2017;49(2):106–16. doi:10.1080/07853890.2016.1231932
8. Pemayun TGD, Naibaho RM. Clinical profile and outcome of diabetic foot ulcer, a view from tertiary care hospital in Semarang, Indonesia. *Diabet Foot Ankle.* 2017;8(1):131–7. doi:10.1080/2000625X.2017.1312974
9. Everett E, Mathioudakis N. Update on management of diabetic foot ulcers. *Ann N Y Acad Sci.* 2018; 11(1):153–65. doi:10.1111/nyas.13569
10. Rasyid N, Yusuf S, Tahir T. Study Literatur : Pengkajian Luka Kaki Diabetes. 2018;4(9):123–37.
11. Cade WT. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Phys Ther.* 2008;88(11):1322–35. doi:10.2522/ptj.20080008
12. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2019;26(3):259–65. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x
13. Sallam AW, El-Sharaway A. Role of Interleukin-6 (IL-6) and Indicators of Inflammation in the Pathogenesis of. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 2012;6(6):430–5.
14. Liu RAN, Ladwig GP, Robson MC, Kuhn MANN. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers.. *Wound Repair Regen* 2002;1(2):26–37. doi 10.1046/j.1524-475x.2002.1090
15. Schramm JC, Dinh T, Veves A. Microvascular changes in the diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds.* 2006;5(3):149–59.

16. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corad , Ribati D, Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions, *Bimed Res Int*. 2014;1(1): 1–10. doi 10.1155/2014/756078
17. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. 2014;7(4):189–95. doi:10.4103/0974-2077.150734
18. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(5):1635–43. doi:10.1007/s11999-015-4192–9
19. Khanna S, Gnyawali U, Bergdall VK, Sen CK. NIH Public Access. *Wound Repair Regen*. 2011;19(6):753–66. doi:10.1111/j.1524 475X.2011.00740.x
20. Fathi WK. The Effect of Hyaluronic Acid and Platelet - Rich Plasma on Soft Tissue Wound Healing : An Experimental Study on Rabbits. *Al-Rafidain Dent J*. 2012;12(3):115–25.
21. Lana JFSD, Weglein A, Sampson SE. Randomized controlled trial comparing hyaluronic acid, platelet-rich plasma and the combination of both in the treatment of mild and moderate osteoarthritis of the knee. *J Stem Cells Regen Med*. 2016;12(2):69–78. doi:10.1109/ASE.2008.69
22. Iio K, Furukawa KI, Tsuda E, Hyaluronic acid induces the release of growth factors from platelet-rich plasma. *Asia-Pacific J Sport Med Arthrosc Rehabil Technol*. 2016;4(3):17–32 doi:10.1016/j.asmart.2016.01.001
23. Wang Y, Han G, Guo B, Huang J. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. *Pharmacol Reports*. 2016;68(6):1126–32. doi:10.1016/j.pharep.2016.07.001
24. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Editorial Complications of Diabetes 2017;1(18):10–8. doi:10.1155/2018/3086167
25. Harris M. Challenges in diabetes management. *Aust Fam Physician*. 2008;37(9):716–20. doi:10.1186/1744-8603-9-63
26. Tellechea A, Leal E, Veves A, Carvalho E. Inflammatory and Angiogenic Abnormalities in Diabetic Wound Healing: Role of Neuropeptides and Therapeutic Perspectives, *Open Circ Vasc J*. 2010;3(2):43–55. doi:10.2174/1877382601003020043
27. Kumar A, Goel MK, Jain RB, Khanna P, Chaudhary V. India towards diabetes control: Key issues. *Australas Med J*. 2013;6(10):524–31. doi:10.4066/AMJ.2013.1791
28. Ding J, Tredget EE. The Role of Chemokines in Fibrotic Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2015;4(11):673–86. doi:10.1089/wound.2014.0550
29. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, Instrumentation C. NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis. *Nat.Methods* ; 2017;9(7):671–5.
30. Parisi M, Wittmann D, Pavin E, Machadi H, Nery M, Jeffcoate W. Comparison of three systems of classification in predicting the outcome of

- diabetic foot ulcers in a Brazilian population. *Eur J Endocrinol*; 159 (1):417–22
31. Tiaka EK, Papanas N, Manolakis AC, Maltezos E. The Role of Hyperbaric Oxygen in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Cell Stress Chap*. 2013; 63(4):302–14. doi:10.1177/0003319711416804
 32. Clayton W, Elasy TA. A Review of the Pathophysiology, Classification, and Treatment of Foot Ulcers in Diabetic Patients. *Clinical Diabetes Med*. 2009;27(2):52–8.
 33. WT Cade. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy. *Phys Ther*. 2008;88(11): 1322–35
 34. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Wound healing: The role of growth factors. *Drugs Today*. 2003;39(10): 787–800. doi:10.1358/dot2003.39
 35. Doulton AJM, Armstrong avid G, Kirsner RS, Diagnosis and management of diabetic foot complications. *Current Diabetes Update*.. 2018;(2): 1–20. doi:10.2337/DB20182-1
 36. Garraud O, Hozzein WN, Badr G. Wound healing: Time to look for intelligent, “natural” immunological approaches? *BMC Immunol*. 2017;18(23): 39–47. doi:10.1186/s12865-017-0207-y
 37. Valenzuela-Silva CM, Tuero-Iglesias AD, Garcia-Iglesias E, Granulation response and partial wound closure predict healing in clinical trials on advanced diabetes foot ulcers treated with recombinant human epidermal growth factor. *Diabetes Care*. 2013;36(2):210–15. doi:10.2337/dc12-1323
 38. Bir SC, Esaki J, Marui A, Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: Characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. *J Vasc Surg*. 2009;50(4):870–79. doi:10.1016/j.jvs.2009.06.016
 39. Vokurka J, Gopfert E, Blahutkova M, Buchalova E, Faldyna M. Concentrations of growth factors in platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in a rabbit model. *Vet Med (Praha)*. 2016;61(10):567–70. doi:10.17221/24/2016-VETMED
 40. Tecilazich F, Kafanas A, Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes J*. 2012;61(11):2937–47. doi:10.2337/db12-0227
 41. Rosyid FN, Dharmana E, Suwondo A, Heri K, Hario N. Review Article VEGF : structure , biological activities , regulations and roles in the healing of diabetic ulcers. *Int J of Reseach Med*. 2018;6(7):2184–92.
 42. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585–601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
 43. Rangaswamy P, Rubby SA, Prasanth K. Prospective study of platelet derived growth factor in wound healing of diabetic foot ulcers in Indian population. *Int Surg J*. 2017;4(1):194–9.

44. Fang RC, Galiano RD. A review of becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Biologic J* .2008;2(1):1–12.
45. Abdullah E, Idris A, Saparon A. Papr reduction using scs-slm technique in stfbc mimo-ofdm. *ARNP J Eng Appl Sci*. 2017;12(10):3218–21. doi:10.1111/ijlh.12426
46. McLellan, Jonathan, Plevin, Sarah. Temporal release of growth factors from platelet-rich Fibrin (PRF) and Platelet-rich Plasma (PRP) in the horse: A comparative in vitro analysis. *Intern J Appl Res Vet Med* . 2014;12(1): 48–57
47. Milena Deptuła, Przemysław Karpowicz, Anna Wardowska, Piotr Sass, Paweł Sosnowski, Alina Mieczkowska, Development of a Peptide Derived from Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-BB) into a Potential Drug Candidate for the Treatment of Wounds, [Adv in W Care. 2020; 9\(12\):1–18](#)
48. Lacy MQ, Mccurdy AR. Platelets in Tissue Repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Front. Immun.*2013;122(14):2305–09. doi:10.1182/blood-2013-05
49. Gardiner E. A Systems Biology Approach to Blood. *Exp Hematol*.2014;12(844):201–25 doi:10.1007/978-1-4939-2095-2
50. Elizabeth A Longsdon, Stacey D Finley, Alesander S Popel, Feilin Mac Gabhann, A System Biology View in Blood Vessel Growth and Remodelling. *J.Cell.Mol Med*.2013;8(8): 1–8
51. Bodnar RJ. Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2015;4(11):641–50. doi:10.1089/wound.2014.0594
52. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler P. Molecular Mediators of Angiogenesis. *J Burn Care Res*.2011;31(1):1–8. doi:10.1097/BCR.0b013e32
53. William Li by W, Li VW, William Li FW, Tsakayannis D, Li WW. Angiogenesis: a control point for normal and delayed wound healing. *Contemp Surg*. 2003;1(2):5–11.
54. Yeboah K, Agyekum JA, Baafour EK, Circulating Angiogenic Growth Factors in Diabetes Patients with Peripheral Arterial Disease and Exertional Leg Pain in Ghana. *Int J Vasc Med*.2017;1(2):1–8. doi:10.1155/2017/239017
55. Eschler A, Gradl G, Wussow A, Mittlmeier T. Prediction of complications in a high-risk cohort of patients undergoing corrective arthrodesis of late stage Charcot deformity based on the PEDIS score. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;2(3):1–11. doi:10.1186/s12891-015-0809-6
56. Silvestre JS, Lévy BI, Tedgui A. Mechanisms of angiogenesis and remodelling of the microvasculature. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):201–22. doi:10.1093/cvr/cvn070
57. Zhou K, Ma Y, Brogan MS. Chronic and non-healing wounds : The story of vascular endothelial growth factor. *Med Hypotheses*.2015:399–404. doi:10.1016/j.mehy.2015.06.017

58. Aiello LP, Wong J-S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int.* 2000;58(2): 113–19. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.07718.x
59. Bao P, Kodra A, Tomic-canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res.* 2010;153(2):347–58. doi:10.1016/j.jss.2008.04.023.The
60. Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS. VEGF-A / VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal.* 2016:347–54. doi:10.1007/s12079-016-0352-8
61. Dinh T, Veves A. Microcirculation of the Diabetic Foot. *Curr Pharm Des.* 2005;11(18):2301-9. doi: 10.2174/1381612054367328.
62. Bembde AS. A study of plasma fibrinogen level in type-2 diabetes mellitus and its relation to glycemic control. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2012;28(2):105–8. doi:10.1007/s12288-011-0116-9
63. Pradhan, C Nabzdyk, D Andersen, W Lo Gerfo, A Veves, Inflammation and Neuropeptides: The Connection in Diabetic Wound Healing. *Expert Rev Mol Med.* ; 2013; 11(2): 1–24 doi:10.1017/S1462399409000945.
64. Cory E DeClue, L. Shornick , The cytokine milieu of diabetic wounds. *Diabetes Manag.* 2015; 5(6): 525–37
65. Suarez, F Torres, C Clavijo, Pablo Arbela´ez, Juan C. Cruz, An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays, *Plos One*, 2020;15(7):1–14, doi. org/10.1371/journal.0232565
66. Jeffcoate WJ, Musgrove AJ, Lincoln NB. Using image J to document healing in ulcers of the foot in diabetes. *Int.Wound J.* 2017;2(3):1–13. doi:10.1111/iwj.12769
67. Rina R, Setyawan H, Nugroho H, Hadisaputro S, Pemayun , Faktor-Faktor Risiko Kejadian Kaki Diabetik pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 (Studi Kasus Kontrol di RSUP dr. M. Djamil Padang). *JEKK.* 2016;1(2): 48–60. doi: <https://doi.org/10.14710/j.e.k.k.v1i2.3943>
68. Lim JK, Saliba L, Smith MJ, McTavish J, Raine C, Curtin P. Normal saline wound dressing - Is it really normal? *Br J Plast Surg.* 2000;53(1):42–5. doi:10.1054/
69. E Carolina, D João, D Masi. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2016;5(82):512–21 doi:10.1016/j.bjorl.2015.09.011
70. Kanishk Gupta, Platelet Rich Fibrin -A Second Regeneration Platelet Concentrate and Advances in PRF. *Indian J Dent Adv.* 2016; 7(4): 53–7 doi:10.5866/2015.7.10251
71. Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. 2014: *Arthritis Research & Therapy* 2014;16(1):204–15.

72. Marks P, Theodoropoulos J, Sc M. The Ef fi cacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Symptomatic Knee Osteoarthritis : A Systematic Review With Quantitative Synthesis. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg*. 2013;29(12):2037–48. doi:10.1016/j.arthro.2013.09.006
73. Cielo A, Bonanome L. Comparison between PRP , PRGF and PRF, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* . 2015;19(6):927–30.
74. Saluja H, Dehane V, Mahindra U, Article R. Platelet-Rich fibrin : A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons, *Ann Maxillofac Surg*. 2011;1(1):53–7. doi: 10.4103/2231-0746.83158
75. Widyawati SD. Pengaruh pemberian platelet rich fibrin dan deproteinized Porous Bovine Bone terhadap Aktifitas Transforming Growth Factor- β 1 dan konsentrasi osteokalsin (Penelitian In vitro) 2014, Thesis, Fakultas Kedokteran Gigi dan Mulut, Program Studi Ilmu Bedah Mulut dan Maksilofacial , Universitas Indonesia
76. Ezhilarasu H, Vishalli D, Dheen ST, Bay BH, Srinivasan DK, Nanoparticle-Based Therapeutic Approach for Diabetic Wound Healing. *J Nanomater*. 2020 ; 10(6): 1234–39
77. Manish Mishra, Hemant Kumar, Kamalakar Tripathi ,Diabetic delayed wound healing and the role of silver nanoparticles *Dig J Nanomater Bio*, 2008;3(2), 49–54
78. Ding Y, Cui L, Zhao Q, Zhang W, Sun H, Zheng L. Platelet-Rich Fibrin Accelerates Skin Wound Healing in Diabetic Mice. *Ann Plast Surg*. 2017;79(3):15–19. doi:10.1097/SAP.0000000000001091
79. Agrawal M, Agrawal V. Platelet Rich Fibrin and its Applications in Dentistry- A Review Article. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(5): 7922–9
80. Lundquist R, Dziegiel MH, Ågren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen*.2008;16(3):356–63. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00344.x
81. Gill SE, Parks WC Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing, 2009;40(206):1334–47. doi:10.1016/j.biocel.2007.10.024
82. Mussano F, Genova T, Munaron L, Cytokine , chemokine , and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets* 2016;27(5):467–71.
83. Weindl G, Korting HC. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects *Skin Pharmacol Physiol*. 2004;17(5):207–13. doi: 10.1159/000080213
84. Onesti MG, Fioramonti P, Carella S, Fino P, Sorvillo V, Scuderi N. A new association between hyaluronic acid and collagenase in wound repair: An open study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(2):210–6. doi:10.1016/j.vascn.2009.03.004
85. Greco RM, Iocono JA, Ehrlich HP. Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *J Cell Physiol*. 1998;177(3):465–73. doi:10.1002/(SICI)1097-4652

86. Afat IM, Akdogan ET, Gonul O. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin alone and combined with hyaluronic acid on pain, edema, and trismus after surgical extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(5):926–32 doi: 10.1016/j.joms.2017.12.005.
87. Pardue EL, Ibrahim S, Ramamurthi A. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis.* 2008;4(4):203–14. doi:10.4161/org.4.4.6926
88. Choi JH, Jun JH, Kim JH, Sung HJ, Lee JH. Synergistic effect of interleukin-6 and hyaluronic acid on cell migration and ERK activation in human keratinocytes. *J Korean Med Sci.* 2014;29(2):210–16 doi:10.3346/jkms.2014.29.S3.S210
89. Allan R. Brasier, The nuclear factor-kB–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation, *Cardiovasc Res.J* 2010; 86(2):211–18 doi:10.1093/cvr/cvq076
90. Kanter R, Caballero B. Global gender disparities in obesity: A review. *Adv Nutr.* 2012;3(4):491–8. doi:10.3945/an.112.002063
91. Bray GA, Macdiarmid J. The epidemic of obesity. *West J Med.* 2000;172(2):78–85. doi:10.1136/ewjm.172.2.78
92. Abdisa F, Pence BD, Woods JA. Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies. *Adv Wound Care.* 2014;3(1):71–9. doi:10.1089/wound.2012.0377
93. Pierpont YN, Dinh TP, Salas RE, Obesity and Surgical Wound Healing: A Current Review. *ISRN Obes.* 2014(4)5:1–13.doi:10.1155/2014/638936
94. Heilbronn LK, Campbell L V., Xu A, Samocha-Bonet D. Metabolically Protective Cytokines Adiponectin and Fibroblast Growth Factor-21 Are Increased by Acute Overfeeding in Healthy Humans. *PLoS One.* 2013;8(10):1–9.
95. Karvonen-Gutierrez CA, Park SK, Kim C. Diabetes and Menopause. *Curr Diab Rep.* 2016;16(4):1–8. doi:10.1007/s11892-016-0714-x
96. Zeine, Pippitt K, Li M, Gurgle HE. Diabetes mellitus: Screening and diagnosis in Sydney Australia. *Am Fam Physician.* 2016;93(2):103–9.
97. Dinh T, Elder S, Veves A. Delayed wound healing in diabetes: considering future treatments. *Diabetes Manag.* 2011;1(5):509–19 doi:10.2217/dmt.11.44
98. Xiang J, Wang S, He Y, Xu L, Zhang S, Tang Z. Reasonable Glycemic Control Would Help Wound Healing During the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Ther.* 2019;10(1):95–105. doi:10.1007/s13300-018-0536-8
99. Almaramhy H, Mahabbat NA, Fallatah KY, Al-Ahmadi BA, Al-Alawi HH, Guraya SY. The correlation of fasting blood glucose levels with the severity of diabetic foot ulcers and the outcome of treatment strategies. *Biomed Res.* 2018;29(9):1961–7. doi:10.4066/biomedicalresearch.29-18-502

100. Yohana Sitompul, Budiman , Suharko Soebardi, Murdani Abdullah,, Profil Pasien Kaki Diabetes yang Menjalani Reamputasi di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo Tahun 2008 -2012, JPDI.2015;2(1):1–9
101. Ayuk SM, Abrahamse H, Hourel NN. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J Diabetes Res.* 2016;2(3):1–9. doi:10.1155./2016/2897656
102. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics.* 2014;8(5):1–19. doi:10.1063/1.4895755
103. Wu H, Li R, Wei ZH, Diabetes-Induced Oxidative Stress in Endothelial Progenitor Cells May Be Sustained by a Positive Feedback Loop Involving High Mobility. *Oxidative Med and Cell J.*2016(5)4:1–12. doi:10.1155 /2016/1943918
104. Westerweel PE, Teraa M, Rafii S, Jaspers J, White AW, Hooper AT et al, Impaired endothelial progenitor cell mobilization and dysfunctional bone marrow stroma in diabetes mellitus. *PLoS One.* 2013;8(3):1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0060357
105. Lin C-W, Hung S-Y, Huang C-H, Yeh J-T, Huang Y-Y. Diabetic Foot Infection Presenting Systemic Inflammatory Response Syndrome: A Unique Disorder of Systemic Reaction from Infection of the Most Distal Body. *J Clin Med.* 2019;8(10):1538–42 doi:10.3390/jcm8101538
106. Shashanka R, Palachandra A. Hemoglobin A1c in Diabetic Foot Patients : A Predictor of Healing Rate. *JID,* 2016;2(3):34–7. doi:10.17354/SUR/2016/25
107. Al-Goblan, A., Alrasheedi, I., Haider, K., & Basheir, O. Prediction of diabetic foot ulcer healing in type 2 diabetic subjects using routine clinical and laboratory parameters. *Research Endo Dis J,* 2016;2(16) :11–6.
108. Manjunath HR, Kumar VM. Role of Hemoglobin A1c as Predictor of Foot Ulcer Healing in Diabetes. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(10): 2121–7 Published online 2011 Jun 23. doi: 10.1038/jid.2011.176
109. Dave M, Gupta AK, Patel P, Heernath H. Correlation between Fasting Blood Sugar Level, HbA1C Level and Serum Lipid Levels in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Int J Contemp Med Res [IJCMR].* 2019;6(7):12–21. doi:10.21276/ijcmr.2019.6.7.13
110. Pavlou S, Lindsay J, Ingram R, Xu H, Chen M. Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity. *BMC Immunol.* 2018;19(1):1–13. doi:10.1186/s12865-018-0261-0
111. Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A, Diabetic Foot Syndrome as a Possible Cardiovascular Marker in Diabetic Patients, *J Diabetes Res ,* 2015 (4) 3:1–19
112. Dutra LMA, Melo MC, Moura MC, Prognosis of the outcome of severe diabetic foot ulcers with multidisciplinary care. *J Multidiscip Healthc.* 2019;12(3) :349–59. doi:10.2147/JMDH.S194969.

113. Kahn B, Flier JS, Obesity and Insulin Resistance, *J Clin Invest.*2000;106(4): 473–81
114. Eschler, Anica, Gradl, Wussow, Annekatrin, Mittlmeier et al, Prediction of complications in a high-risk cohort of patients undergoing corrective arthrodesis of late stage Charcot deformity based on the PEDIS score *BMC Musculoskelet Disord.* 2015; 16(1): 349–55.
115. Mariam TG, Alemayehu A, Tesfaye E, 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 *J Diabetes Res.* 2017(4)2:1–11 doi: 10.1155/2017/28
116. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105(2):141–50. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006
117. Hidayatillah, Shofia Aji, Nugroho Heri and MSA. “Hubungan Status Merokok dengan Kejadian Ulkus Diabetikum pada Laki-Laki Penderita Diabetes Melitus.” *J Epidemiol Kesehat Komunitas.* 2020;5(1):32–7.
118. Christman AL, Selvin E, Margolis DJ, Lazarus GS, Garza L a. Hemoglobin A1c is a predictor of healing in diabetic wounds. *J Invest Dermatol.* 2011;131(10):2121–7. doi:10.1038–44/jid.2011.176
119. Liu M, Zhang W, Yan Z, Yuan X. Smoking increases the risk of diabetic foot amputation: A meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2018;15(2):1680–5. doi:10.3892/etm.2017.5538
120. Caley MP, Martin V, O'Toole EA, Metalloproeinases and Wound Healing , *Advances in Wound Care.*2015;4(4)1–12 doi.org/10.1089/wound.2014.058
121. Xia N, Morteza A, Yang F, Cao H, Wang A. Review of the role of cigarette smoking in diabetic foot. *J Diabetes Investig.* 2019;10(2):202–15. doi:10.1111/jdi.12952
122. Xue-Lei Fu, Hui Ding, Association Between Cigarette Smoking and Diabetic Foot Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Lower Extremity Wounds Journal*, 2018; 5(3): 1–10
123. Ghulam Mohammad¹, H.P.Pandey, Kamlakar Tripathi, Diabetic Wound Healing and Its Angiogenesis with Special Reference to Nanoparticles *Digest J Nanomat and B* , 2008;3(3), 203–8
124. Liu, Min Zhang, Wei Yan, Zhaoli, Yuan, Xiangzhen Fajriyah NN, Smoking increases the risk of diabetic foot amputation: A meta-analysis, 2018;15(2) 1680–5 doi:10.1017/CBO9781107415324.004
125. Nan Xia, Afsaneh Morteza, Fengyu Yang, A Review of the Role of Cigarette Smoking in the Diabetic Foot, *J Diabetes Investig.* 2019; 10(2):202–15. doi: 10.1111/jdi.12952
126. Pit hova, Gul A, Basit A, Ali SM, Ahmadani MY, Miyan Z. Role of wound classification in predicting the outcome of Diabetic Foot Ulcer. *J Pak Med Assoc*, 2006;56(10):444–7

127. Yang P, Pei Q, Yu T. Compromised wound healing in ischemic type 2 diabetic rats. *PLoS One*. 2016;11(3):1–19 doi:10.1371/journal.pone.0152068
128. Michael GL, Emanuela DD, Dhanardhono T. Difference of DNA Quantity Extracted from Buccal Swab with Different Amount of Swab. *J Kedokt Diponegoro*. 2017;6(2):443–50.
129. Jayadi T, Krismi A. Perbedaan indikator-indikator penyembuhan luka tikus wistar diabetik diinduksi curcumin. *Berk Ilm Kedokt Duta Wacana*. 2015;01(01):21–8.
130. Ding Y, Cui L, Zhao Q, Zhang W, Sun H, Zheng L. Platelet-Rich Fibrin Accelerates Skin Wound Healing in Diabetic Mice. *Ann Plast Surg*. 2017;79(3) 15–19. doi:10.1097/SAP.0000000000001091
131. Parajó Y, D'Angelo I, Welle A, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Hyaluronic acid/Chitosan nanoparticles as delivery vehicles for VEGF and PDGF-BB. *Drug Deliv*. 2010;17(8):596–604. doi:10.3109/10717544.2010.509357
132. Ariyati N, Handono K, Nurdiana N, Wy W. What is the Best Degree of Hyaluronic Acid Crosslinking in Increasing Growth Factors Level of Platelet-Rich Fibrin Lysate? Comparative transcriptomic analysis of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp and adipose tissues. *J Stem Cells Regen Med*, 2019;15(1):3–7.
133. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care*. 2014;3(10):647–61. doi:10.1089/wound.2013.0517
134. Utomo DN, Purwati, Tinduh D, Wibowo NH. The effect of Platelet rich plasma (PRP) in anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction surgery. *J Biomimetics, Biomater Biomed Eng*. 2017;30:97–102 . doi:10.4028/www.scientific.net/JBBBE.30.97
135. Chen J, Yang L, Guo L, Duan X. Sodium hyaluronate as a drug-release system for VEGF 165 improves graft revascularization in anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Exp Ther Med*. 2012;4(3):430–4. doi:10.3892/etm.2012.629
136. Djawa FM, Susilo I. Pengaruh Pemberian Topikal Low Molecular Weight Hyaluronate pada Ekspresi VEGF Luka Superfisial yang Dirawat Dengan Membran Amnion Freeze-Dried. *Maj Patol Indones*. 2013;22(1):37–42.
137. Wu F, He Z, Ding R, Danhong Promotes Angiogenesis in Diabetic Mice after Critical Limb Ischemia by Activation of CSE-H-VEGF Axis. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2015;(3) 4: 1–5 doi:10.1155/2015/276263
138. Strauss FJ, Nasirzade J, Kargarpoor Z, Stähli A, Gruber R. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies. *Clin Oral Investig*. 2020;24(2):569–84. doi:10.1007/s00784-019-03156-9

139. Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014; 2(12):12–8. doi:10.1155/2014/747584
140. Taniguchi Y, Yoshioka T, Sugaya H, Growth factor levels in leukocyte-poor platelet-rich plasma and correlations with donor age, gender, and platelets in the Japanese population. *J Exp Orthop.* 2019;6(1):4–11. doi:10.1186/s40634-019-0175-7
141. Jones, Serafini G, Lopreiato M, Lollobrigida M, Lamazza L, Mazzucchi G, Fortunato L et al, Platelet Rich Fibrin (PRF) and Its Related Products: Biomolecular Characterization of the Liquid Fibrinogen, *J Clin Med.* 2020 12;9(4):109–19 doi: 10.3390/jcm9041099
142. Park D, Kim Y, Kim H, Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . *Mol Cells.* 2012;33(6):563–74. doi:10.1007/s10059-012-2294-1
143. Ariyati N, Kusworini K, Nurdiana N, Wirohadidjojo W. Low degree hyaluronic acid crosslinking inducing the release of TGF-B1 in conditioned medium of wharton’s jelly-derived stem cells. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(10):1572–5. doi:10.3889/oamjms.2019.307
144. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK. Stimulation of Granulation Tissue Formation by Platelet-derived Growth Factor in Normal and Diabetic Rats. *J Clin Invest.* 2014;76(6):2323–29. doi:10.1172/JCI112243
145. Avriyanti Hanafiah O, Poravi R, Angga D, The Role of TGF Beta 1 and PDGF BB in Wound Healing of the Palate. *Adv Health Sci Res,* 2018;8:219–25. doi:10.2991/idcsu-17.2018.57
146. Politis C, Schoenaers J, Jacobs R, Agbaje JO. Wound healing problems in the mouth. *Front Physiol.* 2016;7:1–13. doi:10.3389/fphys.2016.00507
147. Liu C, Li J, Xiang X., PDGF receptor- α promotes TGF- β signaling in hepatic stellate cells via transcriptional and posttranscriptional regulation of TGF- β receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 2014; 307(7): 749–59. doi: 10.1152/ajpgi.00138.2014.
148. Slaninka I, Fibir A, Kasha M, Paral J, Use of autologous platelet-rich plasma in healing skin graft donor sites, *J Wound Care* (29), 1 , 1–8,doi.10.12968/jowc.2020.29.1.36
149. Heldin C, Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor, *Euro PMC, Cell Regulation,* 2018;79(4):1283–1316.
150. Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res.* 1997;46(1):4–18. doi:10.1007/PL00000158
151. Qu D, Liu J, Lau CW, Huang Y, IL-6 in diabetes and cardiovascular complications, *Br J Pharmacol.*2014;171(15):3595–603

152. Tan EML, Qin H, Kennedy SH, Rouda S, Fox IV JW, Moore JH. Platelet-derived growth factors-AA and -BB regulate collagen and collagenase gene expression differentially in human fibroblasts. *Biochem J.* 1995;310(2):585–8. doi:10.1042/bj3100585
153. Blum A, Socea D, Ben-Shushan RS, A decrease in VEGF and inflammatory markers is associated with diabetic proliferative retinopathy. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(4):158–62. doi:10.1684/ecn.2012.0321
154. Lee EG, Luckett-Chastain LR, Calhoun KN, Frempah B, Bastian A, Gallucci RM. Interleukin 6 function in the skin and isolated keratinocytes is modulated by hyperglycemia. *J Immunol Res.* 2019; 3(9),1–10, doi:10.1155/2019/508784
155. Yuniarti E, Syamsurizal S, Ahda Y, Sonata PD. Correlation of Fasting Blood Glucose With IL-6 Levels in Type-2 Diabetes Mellitus Ethnic Minangkabau. *Bioscience.* 2018;2(1):11–7. doi:10.24036/02018219858-0-00
156. Zubair M, Ahmad J, Malik A. Plasma adiponectin, IL-6, hsCRP, and TNF- α levels in subject with diabetic foot and their correlation with clinical variables in a North Indian tertiary care hospital. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(5):769–75. doi:10.4103/2230-8210.100672
157. Lin Z-Q, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2003;73(6):713–21. doi:10.1189/jlb.0802397
158. Rooney P, Srivastava A, Watson L, Quinlan LR, Pandit A. Hyaluronic acid decreases IL-6 and IL-8 secretion and permeability in an inflammatory model of interstitial cystitis. *Acta Biomater.* 2015;19:66–75. doi:10.1016/j.actbio.2015.02.030
159. Lee EG, Luckett C, Calhoun KN, Frempah B, Bastian A, Gallucci, Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing, 2012;(2)3: 1–11
160. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. 2014,(40)2: 1–12. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00138
161. Sanchez JA, Marrero YQ, Hernandez CA, Herero M, Image J: A Free, Easy, and Reliable Method to Measure Leg Ulcers Using Digital Picture, *Int J Low Extrem Wound*, 2017; 16(4) : 269–73. doi: 10.1177/1534734617744951
162. Semadi NI. The Role of VEGF and TNF-Alpha on Epithelialization of Diabetic Foot Ulcers after Hyperbaric Oxygen Therapy. *Maced J Med Sci.* 2019; 1(1):1–7.
163. Jørgensen LB, Sørensen JA, Jemec GBE, Yderstræde KB. Methods to assess area and volume of wounds – a systematic review. *Int Wound J.* 2016;13(4):540–53. doi:10.1111/iwj.12472
164. Dealey C. The Care of Wounds: A Guide for Nurses, Third Edition. *Care Wounds A Guid Nurses*, Third Ed.2008;2(3):1–240 doi:10.1002/978047077

165. Pahakis M, Kocky J, Dull R, Tarbell J, The Role of Endothelial Glycocalyx Components in Mechanotransduction of Fluid Shear Stress, *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 355(1): 228–233. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01
166. Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J Clin Med.* 2019;8(10):16–22. doi:10.3390/jcm8101602
167. Guo D, Wang Q, Li C, Wang Y, Chen X. VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions. *Oncotarget.* 2017;8(44): 20–7. doi:10.18632/oncotarget.20331
168. Pauty J, Usuba R, Cheng IG, A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs. *EBioMedicine.* 2018;27(2):225–36. doi:10.1016/j.ebiom.2017.12.014
169. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.* 2004;164(6):1935–47. doi:10.1016/S0002-9440(10)63754-6
170. Xie Y, Upton Z, Richards S, Rizzi SC, Leavesley DI. Hyaluronic acid: Evaluation as a potential delivery vehicle for vitronectin: growth factor complexes in wound healing applications. *J Control Release.* 2011;153(3):225–32. doi:10.1016/j.jconrel.2011.03.021
171. Tolg C, McCarthy JB, Yazdani A, Turley EA. Hyaluronan and RHAMM in Wound Repair and the “cancerization” of Stromal Tissues. *Biomed Res Int.* 2014;3 (4), 2–13 doi:10.1155/2014/103923
172. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):514–25. doi:10.1038/sj.jid.5700701
173. Serafini G, Lopreiato M, Lollobrigida M, Lamazza L. Platelet Rich Fibrin (PRF) and Its Related Products : Biomolecular Characterization of the Liquid Fibrinogen. *J Clin Med.* 2020 12;9(4):1099–111
174. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2009;108(1):56–61. doi:10.1016/j.tripleo.2009.02.004
175. Verheye S, Markou CP, Salame MY, Reduced thrombus formation by hyaluronic acid coating of endovascular devices. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):1168–72. doi:10.1161/01.ATV.20.4.1168
176. Ehrenfest DMD, Peppo GMDE, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun ’ s platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 2013;27(1):63–9. doi:10.1080/08977190802636713

177. Ramos-torrecillas J, García-martínez O, Luna-bertos E De, Ocaña-peinado FM, Luna-bertos E De, Ocan FM. Effectiveness of Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid for the Treatment and Care of Pressure Ulcers. *Biol Res Nurs.*2014;17(2):152–8. doi:10.1177/1099800414535840 2014.
178. Yu W, Xu P, Huang G, Liu LIN. Clinical therapy of hyaluronic acid combined with platelet - rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2018;(3)2:2119–25. doi: 10.3892/etm.2018.6412
179. Chen WH, Lo WC, Hsu WC, Synergistic anabolic actions of hyaluronic acid and platelet-rich plasma on cartilage regeneration in osteoarthritis therapy. *Biomaterials.*2014;35(36):9599–607. doi:10.1016/j.biomat.2014.07.
180. Beer HD, Longaker MT, Werner S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;109(2):132–38. doi:10.1111/1523–47.ep12319188
181. Nasirzade J, Kargarpour Z, Hasannia S, Strauss FJ, Gruber R. Platelet-Rich Fibrin Elicits an Anti-Inflammatory Response in Macrophages In Vitro. *J Periodontol.* 2020;91(2):244–52. doi: 10.1002/JPER.19-0216.
182. Wu X, Yang L, Zheng Z, Li Z , Shi J, Li Y, et al .. Src promotes cutaneous wound healing by regulating MMP-2 through the ERK pathway. *International J of Molecular Med* 2016;(37)3: 639–48. doi:10.3892/ijmm.2016.2472
183. Russo F, D’Este M, Vadalà G. Platelet rich plasma and hyaluronic acid blend for the treatment of osteoarthritis: Rheological and biological evaluation. *PLoS One.* 2016;11(6):1–12. doi:10.1371/journal.pone.0157048
184. Agrawal AA. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World J Clin Cases.* 2017;5(5):159–63. doi:10.12998/wjcc.v5.i5.159
185. Ghanaati Shahram, Sukaesih, Repository ZO. Angiogenesis and vascularity for tissue engineering Angiogenesis and Vascularity for Tissue Engineering Applications. *Regen Med Tissue Eng - Cells Biomater.* 2011;2(3):433–48.
186. Vogler M, Vogel S, Krull S, Hypoxia Modulates Fibroblastic Architecture, Adhesion and Migration: A Role for HIF-1 α in Cofilin Regulation and Cytoplasmic Actin Distribution. *PLoS One.* 2013;8(7).1–11, doi:10.1371/jo4
187. Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood.* 2000;96(12):3772– 8. doi:10.1182/blood.v96.12.3772.h8003772_3772–8
188. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.*2007;355(1):228–33. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.137
189. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin acute wound healing: A comprehensive review. *Int J Inflamm.* 2019;(4):3,1–9. doi:10.1155/2019/3706
190. Zou J, Shankar N, Bayry J. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF-KB signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine

- expression in response to *E. faecalis* infection. *PLoS One*. 2015;10(8):1–16. doi:10.1371/journal.pone.0136947
191. Karlsson C, Paulsson Y. Age related induction of platelet-derived growth factor A-chain mRNA in normal human fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1994;158(2):256–62. doi:10.1002/jcp.1041580207
 192. Rios JM, Rosa D, Tirella A, Gennari A, Stratford IJ, Tirelli N. The CD44-Mediated Uptake of Hyaluronic Acid-Based Carriers in Macrophages. 2017;2(1):1–11. doi:10.1002/adhm.201601012
 193. Park J, Hwang S, Yoon I-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules*. 2017;22(8):1259–69. doi:10.3390/molecules22081259
 194. Ulusal BG, Platelet-rich plasma and hyaluronic acid - an efficient biostimulation method for face rejuvenation, *J Cosmet Dermatol*, 2017;16(1):112–19. doi: 10.1111/jocd.12271

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik

	UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN	Gedung Fakultas Kedokteran UI Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430 PO.Box 1358 T. 62.21.3812477, 31930371, 31930373, 3502977, 3807360, 3153236 F. 62.21.3912477, 31930372, 3157266 E. humas@fku.ac.id , office@fku.ac.id fku.ac.id
	Nomor : KET-000 /UN2.F1/ETIK/PPM00.02/2019	
KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK		
ETHICAL APPROVAL		
Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berikut informasi yang diberikan kepada calon subjek yang berjudul:		
<i>The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol including the information given to the potential subjects entitled:</i>		
"Peran Kombinasi Hyaluronic Acid dan Advance Platelet Rich Fibrin pada Angiogenesis Luka Kaki Diabetes Kajian II-6, VEGF, PDGF". No. protokol: 19-05-0641		
Peneliti Utama <i>Principal Investigator</i>	: dr. Ronald Winardi Kartika, Sp.BTKV, FIHA	
Nama Institusi <i>Name of the Institution</i>	: Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	
dan telah menyetujui protokol berikut informasi yang diberikan kepada calon subjek. <i>and approves the above mentioned protocol including the information given to the potential subjects.</i>		
		17 JUN 2019 Ketua Chair  Prof. Dr. Jetta Sita Sitorus, PhD, SpM(K)
* Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan. ** Peneliti berkewajiban:		
1. Menjaga keselamatan identitas subyek penelitian 2. Memberitahukan status penelitian apabila:		
a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini ethical approval harus diperpanjang b. Penelitian berhenti di tengah jalan 3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diantisipasi (serious adverse event) 4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh informed consent dari subyek penelitian. 5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai 6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KIRK FKUI-RSKM.		
Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP. All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedures.		

Lampiran 2. Letter of Acceptance


**The Indonesian
Biomedical Journal**
Print ISSN: 2085-3297, Online ISSN: 2355-9197
Secretariat of The Indonesian Biomedical Journal
Prodia Tower 9th Floor, Jl. Kramat Raya No.150, Jakarta, 10430, Indonesia
Phone: +62-21-3144182, email: secretariat@inabj.org
Website: <https://inabj.org>

CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT
No : 036 / C . 01 / I B J / 2021

The board of Indonesian Biomedical Journal awarding this certificate to:

**Ronald Winardi Kartika, Idrus Alwi, Franciscus D. Suyatna, Em Yunir,
Sarwono Waspadji, Suzzana Immanuel, Todung Silalahi, Saleha Sungkar,
Jusuf Rachmat, Saptawati Bardosono, Mirta Hedyati Reksodiputro**

as recognition of an ACCEPTED paper entitled

**“Advance-Platelet Rich Fibrin and Hyaluronic Acid Combination Improves
Interleukin-6 and Granulation Index in Diabetic Foot Ulcer Patients”**

that will be published in The Indonesian Biomedical Journal.

Jakarta, March 24, 2021
Managing Editor



Dr. Anna Meliana

Lampiran 3. Status Penelitian

Status Penelitian

Peran Kombinasi Asam Hialuronat dengan *Advanced Platelet Rich Fibrin* pada Angiogenesis pada Penyembuhan Luka LKD

Tanggal: ID

Penyandang

Identitas Penyandang

Nama penyandang:

Tempat/Tanggal Lahir : Usia:

Pekerjaan:

Pendidikan:

Alamat:

Telepon:

Kontak yang dihubungi sabat keadaan emergensi: Hubungan:

Riwayat Penyakit:

Lama Menderita DM :

Laboratorium:Tanggal:

- Darah rutin (Hb/Hmt/Leukosit/Trombosit) :
- Glukosa Darah Sewaktu
- Glukosa Darah 2 jam PP
- HbA1C

Terapi yang digunakan dua minggu terakhir:

Terapi Intervensi :

- Kombinasi Topikal A-PRF+ AH
- Topikal A-PRF
- Kompres NaCl selama 7 hari

Status Lokalis:

Sebelum Terapi

Lokasi Luka:

- Dorsum pedis
 Plantar Pedis
 Lateral
 Medial

Luas Luka

- < 10 cm²
 10 cm² -20 cm²
 > 20 cm²

Setelah Terapi

0 Hari

3 Hari

7 Hari

14 Hari

Keadaan Luka

- Kering
- Lembap
- Exudatif
(basha)

Presentasi Ukuran Luka

$(\text{Luas Luka Awal} - \text{Luas luka}) \times 100\%$

Luas Luka Awal

Evaluasi Biomarker

ELISA

0 Hari

3Hari

7 Hari

14 Hari

VEGF

PDGF

IL-6

Lampiran 4. Formulir Persetujuan Mengikuti Penelitian

FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN (FORMULIR <i>INFORMED CONSENT</i>)			
Peneliti Utama		Dr .Ronald Winardi Kartika, Sp.BTKV(K)-VE	
Peneliti Anggota		Asisten Peneliti	
Pemberi Informasi			
Penerima Informasi			
Nama subjek			
Tanggal Lhair (Umur)			
Jenis Kelamin			
Alamat			
Telepon/HP			
No	JENIS INFORMASI	ISI INFORMASI	TANDAII
1	Judul Penelitian	Peran Kombinasi Asam Hialuronat dengan <i>Advanced Platelet Rich Fibrin</i> untuk Meningkatkan <i>Growth factor</i> dan Angiogenesis pada penyembuhan LKD	
2	Tujuan Penelitian	Mengetahui Peran AH terhadap A-PRF dalam percepatan penyembuhan LKD	
3	Metode Penelitian	Acak terbuka	
4	Manfaat penelitian	Mencari alternatif topikal LKD yang murah tetapi efektifitasnya cukup baik	
5	Prosedur Penelitian	<ol style="list-style-type: none"> 1. Penyandang yang datang ke poli IPD Endokrinologi sesuai Dengan kriteria inklusi 2. Seluruh subjek diambil Sample darah 3. Secara acak dibagi menjadi 3 kelompok Kelompok topikal A-PRF + AH Kelompok topikal A- PRF Kelompok NaCl 4. Kelompok A-PRF+ AH dan A-PRF+ diambil darah untuk pembuatan PRF 5. Pada hari ke-3,ke-7 dilakukan penggantian balutan dan penambahan A-PRF sesuai kelompoknya 	

		<p>6. Pada hari ke-0, ke-3 dan ke-7 dilakukan pengambilan 15 cc darah vena (10 cc untuk pembuatan PRF, 5 mL untuk analisis ELISA VEGF dan PDGF, IL-6, Lab Terpadu FKUI</p> <p>7. Pada hari ke-0, ke-3, ke-7 dan ke-14 Dilakukan pengambilan gambar dengan kamera digital → dimasukkan ke program <i>Image-J</i> untuk melihat proporsi jaringan <u>granulasi</u></p>	
6	Ketidak nyamanan subjek penelitian (<i>potensial discomfort</i>)	Rasa nyeri pada saat diambil darah vena untuk bahan pembuatan A-PRF	
7	Alternatif Penelitian	Tidak ada	
8	Penjagaan Kerahasiaan Data	Data yang telah diambil oleh peneliti langsung disimpan di satu folder.hanya peneliti yang dapat mengakses data tersebut	
9	Kompensasi bila terjadi efek samping	Apabila terdapat efek samping yang tidak diHArapkan obat akan dihentikan	
10	Nama dan Alamat Peneliti serta nomor telepon yang bias dihubungi	Dr Ronald Winardi Kartika, Sp.BTKV Departmen Bedah FKIK UKRIDA 081219876869	
11	Jumlah Subjek	10 orang untuk masing – masing kelompok	

Lampiran 5. *Initial Study*

Initial Study

Perbandingan *Cotton Swab dan Kertas Whatman Schleicher & Schuell*

Waktu: 19 -2- 2019

Patient perempuan , 54 tahun , Ulkus DM type 2 Wagner 2

Metode	Protein Total	IL-6	TIMP	VEGF
Cotton Swab	9,469 mg/mL	813,094 pg/mL	8,845 ng/mL	597,755 pg/mL
WHAtsman	23,243 mg/mL	796,384 pg/mL	11,023 ng/mL	1835,406 pg/mL

Cotton swab + ependorf 1,5 mL + PBS 1 mL + sample = 2,400 gr

Cotton swab + ependorf 1,5 mL + PBS 1 mL = 2,164 gr

Berat sampel = 0,236 gr

= 236 mg

Whatman + ependorf 1,5 mL + PBS 1 mL + sample = 2,468 gr

Whatman + ependorf 1,5 mL + PBS 1 mL = 2,161 gr

Berat sampel = 0,307 gr

= 307 mg

Berat tabung ependorf 1,5 mL kosong = 1,023 gram

= 1023 mg

Lampiran 6. Lembar *Informed Concern* Penelitian

LEMBAR PENJELASAN

Peran Kombinasi Asam Hialuronat dengan *Advanced Platelet Rich Fibrin* Pada Angiogenesis pada Penyembuhan LKD (Kajian IL-6, VEGF, PDGF)

Platelet Rich Fibrin adalah suatu modalitas terapi untuk terapi LKD yang saat ini sedang banyak diteliti karena memberikan Hasil yang cukup memuaskan. Asam Hialuronat juga sering digunakan dalam perawatan luka yang diduga memiliki efek anti inflamasi yang kuat. Pada luka kronik seperti LKD terjadi inflamasi yang berkepanjangan yang memberikan efek penghancuran faktor pertumbuhan dan extra celllar matrix yang diperlukan dalam pembentukan jaringan granulasi. Efektivitas penggunaan kombinasi Asam Hialuronat dengan A-PRF belum banyak diketahui pada percepatan perbaikan LKD.

Kami tim peneliti dari Program Doktorat FKUI bermaksud untuk melihat manfaat pemberian kombinasi Asam Hialuronat (HA) dengan *Advanced PRF* (A-PRF) untuk meningkatkan *growth factor* dan angiogenesis pada penyembuhan luka LKD. Anda bebas memilih keikutsertaan dalam penelitian ini tanpa ada paksaan. Bila anda sudah memutuskan untuk ikut, anda juga bebas untuk mengundurkan diri/berubah pikiran setiap saat tanpa dikenakan denda atau sanksi apapun.

Pada penelitian ini kami membagi menjadi 3 kelompok

Kelompok 1 : Terapi Kombinasi A-PRF dengan AH

Kelompok 2 : Terapi A-PRF

Kelompok 3 : Terapi NaCl

Apabila anda bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini, anda diminta menandatangani lembar persetujuan ini rangkap dua, satu untuk anda simpan, dan satu untuk peneliti. Prosedur selanjutnya adalah anda diambil darah vena sebanyak 15 mL setiap kali anda kontrol (hari ke-3 dan hari ke-7), dimana 10 mL darah kami olah menjadi A-PRF dan 5 mL untuk pemeriksaan laboratorium (IL-6, VEGF, PDGF). Efek samping yang mungkin timbul pada tindakan pengambilan darah antara lain pusing, bengkak, infeksi atau lebam ditempat pengambilan darah.

Semua luka kami bersihkan dulu dengan *Water For Injection* sebelum dibagi kelompoknya. Pada kelompok 1 : A-PRF +AH yang telah terbentuk dari darah anda, akan kami aplikasikan ke luka LKD. Pada kelompok 2: A-PRF diaplikasikan di luka LKD. Pada kelompok 3: Kompres NaCl diaplikasikan ke luka LKD.

Kami sangat berharap anda turun berpartisipasi dalam penelitian ini sehingga diharapkan Hasilnya dapat memberi informasi efektivitas penggunaan kombinasi Asam Hialuronat dengan *Advanced* PRF belum banyak diketahui pada percepatan perbaikan luka LKD. Hasil dari penelitian ini mungkin dapat dijadikan acuan dalam tatalaksana perawatan LKD sehingga bias bermanfaat bagi masyarakat lain.

Semua data akan diambil tanpa memberitakan identitas anda. Kerahasiaan data dan identitas anda dilindungi oleh hukum dan peraturan yang berlaku dan tidak akan diberitakan secara umum. Anda berhak untuk mendapatkan segala informasi yang berhubungan dengan keikutsertaan anda dalam penelitian ini. Anda juga dapat menanyakan tentang penelitian kepada Komite Etik Penelitian FKUI atau email ke ronald.winardi71@ui.ac.id

Informed Concern (Lanjutan)

Setelah mendengarkan penjelasan pada Halaman 1 dan 2 mengenai penelitian yang akan dilakukan oleh dr Ronald Winardi Kartika,Sp.BTKV(K)-VE dengan judul Peran Kombinasi Asam Hialuronat dengan *Advanced* PRF pada Angiogenesis pada penyembuhan LKD, informasi tersebut telah saya pahami dengan baik

Dengan menandatangani formulir ini, saya menyetujui untuk diikutsertakan dalam penelitian di atas dengan suka rela tanpa paksaan dari pihak manapun. Apabila suatu waktu saya merasa dirugikan dalam bentuk apapun, Saya berhak membatalkan persetujuan ini

Tanda Tangan Subjek atau cap jempol

Tanggal

Nama Subjek

Ket.Tanda tangan saksi/wali diperlukan bila subjek tidak bisa baca tulis, penurunan kesadaran, mengalami gangguan jiwa dan berusia dibawah 18 tahun.

Saya telah menjelaskan kepada subjek secara benar dan jujur mengenai maksud penelitian, manfaat penelitian, prosedur penelitian, serta risiko dan ketidaknyaman potensial yang mungkin timbul (penjelasan terperinci sesuai dengan Hal yang saya tandai di atas). Saya juga telah menjawab pertanyaan – pertanyaan terkait penelitian dengan sebaik-baiknya

Tanda Tangan Peneliti

Tanggal

Nama Peneliti

Promotor Co-Promotor1 CoPromotor2

Lampiran 7. Contoh Alokasi Subjek Penelitian

Kemungkinan Kombinasi blok :

AABBCC	AACCBB	CCAABB	CCBBAA
AABCBC	AACBCB	BCAABC	BCBCAA
ABABCC	ABCCAB	CCABAB	CCABAB
ACBBAC	ACACBB	ACACBB	ACBBAC

Subjek	Kelompok
1	A
2	A
3	B
4	B
5	C
6	C
7	A
8	A
9	C
10	B
11	C
12	B
13	A
14	B
15	A
16	B
17	C
18	C
19	A
20	C
21	B
22	B
23	C
24	C
25	A
26	B
27	A
28	C
29	A
30	B

Keterangan :

A = Kelompok A-PRF + AH

B= Kelompok A-PRF

C= Kelompok NaCl (Kontrol)

Lampiran 8. Manuskrip Publikasi**Advance-Platelet Rich Fibrin and Hyaluronic Acid
Combination Improves Interleukin-6 and Granulation Index
in Diabetic Foot Ulcer Patients**

Ronald Winardi Kartika¹, Idrus Alwi², Franciscus D. Suyatna³, Em Yunir², Sarwono Waspadji², Suzzana Immanuel⁴, Todung Silalahi⁵, Saleha Sungkar⁶, Jusuf Rachmat⁷, Saptawati Bardosono⁸, *Mirta Hedyati Reksodiputro*^{9*}

¹Doctoral Program in Medical Science Faculty of Medicine Universitas Indonesia

²Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine Universitas Indonesia – Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta, Indonesia

³Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

⁴Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia – Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta, Indonesia.

⁵Department of Internal Medicine, Krida Wacana Christian University, Jakarta, Indonesia.

⁶Department of Clinical Parasitology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

⁷Department of Thoracic Cardiac and Vascular Surgery, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

⁸Department of Nutrition, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

⁹*Facial Plastic Reconstructive Division, Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta, Indonesia*

*corresponding author

Email: citamirta@yahoo.com

Abstract

BACKGROUND: Diabetic foot ulcer (DFU) is the most common and threatening complication of Diabetes Mellitus (DM). Ideal wound dressing for DFU management should relieve symptoms, provide wound protection, and encourage healing. Advanced-Platelet Rich Fibrin (A-PRF) and Hyaluronic Acid (HA) have been proven to improve wound healing process. This study was aimed to demonstrate the ability of combination of A-PRF and HA in reducing inflammation and improving DFU tissue healing.

METHODS: Twenty DFU subjects were involved in this study, and divided into two groups based on the topical fibrin gel treatment: A-PRF + HA group and A-PRF only group. A-PRF was obtained by peripheral blood centrifugation. A-PRF + HA was prepared by homogenizing A-PRF and AH with a ratio of 1:0.6. Interleukin-6 (IL-6) level, granulation index (GI), numeric pain score (NPS), and inflammation clinical symptoms (ICS) were assessed on day-0, 3, 7, and 14.

RESULT: Wound swabs' IL-6 level on day-7 was found to be significantly lower in A-PRF + HA compared to A-PRF alone ($p=0.041$). The IL-6 level reduction also found to be significant higher either in wound swabs (day 0-7, $p=0.015$) or fibrin gel (day 0-3, $p=0.049$; day 0-7, $p=0.034$). A-PRF + HA treatment significantly increased the GI even since day-3 ($p=0.043$), with lower NPS ($p < 0.001$), and ICS score.

CONCLUSION: The combination of A-PRF and HA increases the GI in DFU healing by reducing the inflammation state which will induce the angiogenesis process, as well as reducing pain in DFU subjects better than A-PRF alone.

Keyword: inflammation; interleukin-6; wound healing; angiogenesis; proliferation

BACKGROUND

Diabetic foot ulcer (DFU) is the most common and devastating complications of diabetes mellitus (DM), associated with neuropathy and/or peripheral arterial disease of the lower limb in DM patients. This serious condition not only affect the patient's health by increasing the mortality risk up to 2.5 folds (1), and requires intensive care, but also have a socioeconomic impact (2). Diabetic population has a prevalence of 19–34% for diabetic foot ulceration, means that 9.1–26.1 millions of DM patients will develop DFU each year (3).

Wound dressings is one of the important management of DFU. The dressings ideally should relieve symptoms, provide wound protection, and encourage healing (4). The use of a moist bandage is an option to prevent tissue dehydration and cell death, accelerated angiogenesis, and allows interaction between growth factors and target cells. Recently, a wide variety of dressings are

available from standard treatment to adjuvant therapy. In addition, DFU management requires wound loading, vascular assessment, treatment of infection and glycemic control (5).

In addition to DFU standard management, a wide variety of agents are available and developed as adjuvant therapies, including oxygen therapy, negative pressure wound therapy, acellular bioproducts, growth factors, biologically engineered skin and skin grafts, energy-based therapy, and systemic therapy (6,7). Hyaluronic acid (HA), the main component of the extracellular matrix, also known to play key roles in tissue regeneration and wound healing process by modulating inflammation, cell migration, and angiogenesis via specific HA receptors. Most of these adjuvant therapy utilize the benefit of fibroblast growth factors, epidermal growth factors, endothelial vascular growth factors, granulocyte colony stimulating factors, and platelet-derived growth factors (8). Some studies showed the benefit of platelet-derived growth factor in wound healing. However, there is limited data on on the benefits of growth factor for DFU.

Autologous platelet-rich plasma (PRP) have been widely used for wound healing. PRP collected by centrifuging patient's own blood sample to separate the highly concentrated suspensions rich in platelet growth factors. The growth factor then released from the platelet granules of PRP by adding CaCl_2 (9). Some current developing technologies not using platelet suspensions anymore, but a solid fibrin-based biomaterials called Platelet-Rich Fibrin (PRF) instead (10). Advanced-Platelet Rich Fibrin (A-PRF) was then further developed from Standard Choukrone platelet-rich fibrin (S-PRF) by modifying the centrifugation speed and time into 1500 rpm for 14 minutes. Slower rotation and shorter time of centrifugation affect the amount of growth factors and cytokines release by macrophage (11). Some studies showed that combining HA with PRP exhibits anti-inflammatory properties in subjects with knee osteoarthritis (12).

In patients with DFU, the process of wound healing is delayed due to prolonged inflammation, and inhibit growth factors to form granulation tissue in the proliferation and epithelialization phases needed for wound healing (13). Both HA and A-PRF have an anti-inflammatory property. Combining HA with A-PRF is expected to optimize their anti-inflammatory activity by decreasing interleukin-

6 (IL-6), increasing the angiogenesis and take benefit from HA's antioxidant property (14), thus improve the granulation which can be assessed macroscopically using imageJ (15). Until now there have been no studies comparing the combination of A-PRF and HA with A-PRF alone in reducing inflammation which affects the healing of DFU. This study was aimed to demonstrate the ability of combination of A-PRF and HA in reducing inflammation and improving DFU tissue regeneration through the role of the major cellular receptors involved in HA signalling.

METHODS

This study had been approved by The Institutional Board of the Faculty of Medicine Universitas, Indonesia (No. 0855/UN2.F1/ETIK/2018). This open-label randomized controlled trial was conducted at Koja District Hospital and Gatot Soebroto Hospital from July 2019 to April 2020.

Study Subjects

DFU subjects age >18 years old, with chronic (>4 weeks) wounds on lower limbs, Wagner-2, and ulcer size <40 cm² were recruited and randomly assigned for A-PRF + AH group, A-PRF group and control group. Subjects with International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF) score infection <2, platelet level <8.0 g/L, Hemoglobin A1C (HbA1c) >12.0% (108 mmol/mol), impaired kidney function, with haemophilia, sickle cell anaemia, leukemia, peripheral arterial disease, or with incomplete data were excluded. On day-0, day-3 and day-7, samples from wound swabs and fibrin gel, and photographs were taken. The examination was performed at the Integrated Laboratory, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia.

A-PRF Gel Preparation

Twenty to forty mL of autologous peripheral blood was taken without anticoagulant, then centrifuged 200 g for 8 minutes. Fibrin and buffy coat were then separated from the erythrocytes, and A-PRF gel was obtained. For A-PRF + HA gel preparation, the process was continued by making A-PRF and AH homogenate with a ratio of 1 mL: 0.6 mL with vortex for 20 seconds. About 0.5 mL of each fibrin gel was separated and stored in the refrigerator at -80°C for IL-6 measurement on day-3 and 7.

Application of A-PRF or A-PRF + HA in DFU

The wound was first cleaned and debrided. Assessment for IL-6 and granulation index (GI) were made before any fibrin gel application, recorded as day-0. After the assessment, 1 mL of fibrin gel (A-PRF + AH, or A-PRF alone) was applied topically on the wound area of 10 cm². A sterile gauze was then applied to cover the wound as a secondary dressing to maintain moisture. The treatments were applied for 3 times on day-0, 3 and 7. After day-7, only a standard NaCl therapy was given to the subjects until day-14.

Measurement of IL-6 level

IL-6 level was measured in pg/mL from wound swabs and the fibrin gel on day-0, 3, 7, and 14 using ELISA (Cat #LS-F4604, Lifespan BioSciences, Seattle, WA, United States). Swabbing was performed by the same person during the experiment to ensure equal swabbing pressure. The swab was swept once in the wound's center, and the gauze swab was transferred to a tube containing 2 ml NaCl, mixed well for 5 minutes and the lysate was separated. The lysate was kept in -80°. Fibrin gel sample was obtained by cutting about 0.5 ml frozen gel prepartate. Both swabs and fibrin gel samples were thawed in room temperature. Samples were then centrifuged for 20 minutes at 1000×g to remove particulates. The supernatant was collected. One hundred µl of Standard, Sample, or Blank were added to each well and incubate for 90 minutes at room temperature, then was aspirated and washed 3 times. One hundred µl of Biotinylated Detection Antibody was added and incubated for 1 hour at 37°C, then was aspirated and washed 3 times. One hundred µl of HRP-Streptavidin Conjugate was added and incubated for 45 minutes at 37°C, then was aspirated and washed for 5 times. One hundred µl of TMB Substrate solution and incubated for ~15-30 minutes at 37°C in the dark. One hundred µl of Stop Solution was added, then was read immediately at 450nm.

Assessment for Wounds Improvement

The wound's area improvement was recorded using a digital camera 48 mega pixel with an accuracy of 0.1% on day-0, 3, 7, and 14. The results of the wound photographs were processed using Image-J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and the GI was evaluated. GI was counted as the ratio

between granulation area to wound area, in percent. Pain response was recorded using numeric pain score (NPS), and inflammation state was assessed clinically by inflammation clinical symptoms (ICS) (16).

Statistical Analysis

IBM SPSS software v.20 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for all statistical analysis. Statistical significance was determined at the 5% level. The general data description was presented in mean \pm SD, and the median (range) value. The parameter's differences were conducted using Mann–Whitney u test and independent t-test.

RESULT

Twenty subjects with DFU were involved in this study. The subjects were randomly divided into two groups according to fibrin gel applied (A-PRF + HA, and A-PRF alone). A-PRF + HA group had five women and five men, while the A-PRF group had six women and four men. The subjects' characteristics were already presented in our previous publication (17). There were no significant differences between the two groups' characteristics.

IL-6 Level in Wound Swabs and the Fibrin Gel

In order to observe the inflammation's role in DFU healing process, IL-6 levels were measured. There were no differences of IL-6 level in both groups at day-0 (before any treatments), either in wound swabs or the fibrin gel as shown in Table 1. The significant differences of IL-6 level between A-PRF + HA and A-PRF alone were found in wound swabs sample on day-7 ($p=0.041$), while in fibrin gel, the A-PRF + HA samples have shown a higher level of IL-6 even on day-3 ($p=0.038$). The reduction of IL-6 level also found to be significant higher in A-PRF + HA samples either in wound swabs (day 0-7, $p=0.015$) or fibrin gel (day 0-3, $p=0.049$; day 0-7, $p=0.034$).

Table 1. IL-6 level (pg/mL) differences between treatments.

Treatment	Wound swabs			Fibrin Gel		
	A-PRF + HA (n = 10)	A-PRF (n = 10)	<i>p</i> -value ^b	A-PRF + HA (n = 10)	A-PRF (n = 10)	<i>p</i> -value ^a
Day-0	106.4 (83.1–407.6)	91.9 (38.6 –151.6)	0.337	0.07±0.03	0.09±0.14	0.059
Day-3	99.5 (76.3-302.2)	72.8 (27.1–148.9)	0.119	0.05±0.02	0.07±0.03	0.038*
Day-7	88.7 (44.3–217.9)	48.8 (27.7–116.2)	0.041*	0.03±0.03	0.04± 0.04	0.034*
Δ Day 0–3	-10.9 (-26.8–10.4)	-3.7(-11.5–3.5)	0.460	26.0±8.4	12.5± 6.2	0.049*
Δ Day 0–7	-18.3 (-64,9–44.6)	-7.8(-24.6–5.4)	0.015*	41.7±13.8	29.0±9.2	0.034*

^amean±SD, independent t-test^bMedian (min-max), Mann Whitney test*significant at $p < 0.05$ **DFU's GI**

GI was assessed to observe the role of angiogenesis in DFU improvement. The average GI can be found in Table 2 and Figure 1. A-PRF + HA treatment was significantly improved the wound compares to A-PRF alone even since day-3 ($p=0.043$). There were significant GI increasing from day-0 to day-3 ($p=0.006$), day-7 ($p=0.004$) and day-14 ($p=0.049$) in -PRF + HA group compare to A-PRF alone.

Table 2. GI (%) difference between treatments.

Treatment	A-PRF + HA (n = 10)	A-PRF (n = 10)	<i>p</i> -value
	Mean± SD	Mean± SD	
Day-0	38.2±14.4	36.0±15.7	0.910
Day-3	64.2±14.6	48.5±19.0	0.043*
Day-7	79.9±1.6	65.0±18.2	0.049*
Day-14	95.9±0.4	86.9±15.3	0.041*
Δ Day 0–3	26.0±8.4	12.5±6.2	0.006*
Δ Day 0–7	41.7±13.8	29.0±9.2	0.004*
Δ Day 0–14	57.7±14.1	50.9±17.6	0.049*

^amean±SD, independent t-test*significant at $p < 0.05$, Δ = GI difference from day-0 to day-N.

Figure 1 shows the GI observed at day-0, 3, 7, and 14 on different treatment groups. Here, we observed different rate of wound closure and healing, especially at day-14 compared to day-0 (before any treatment).

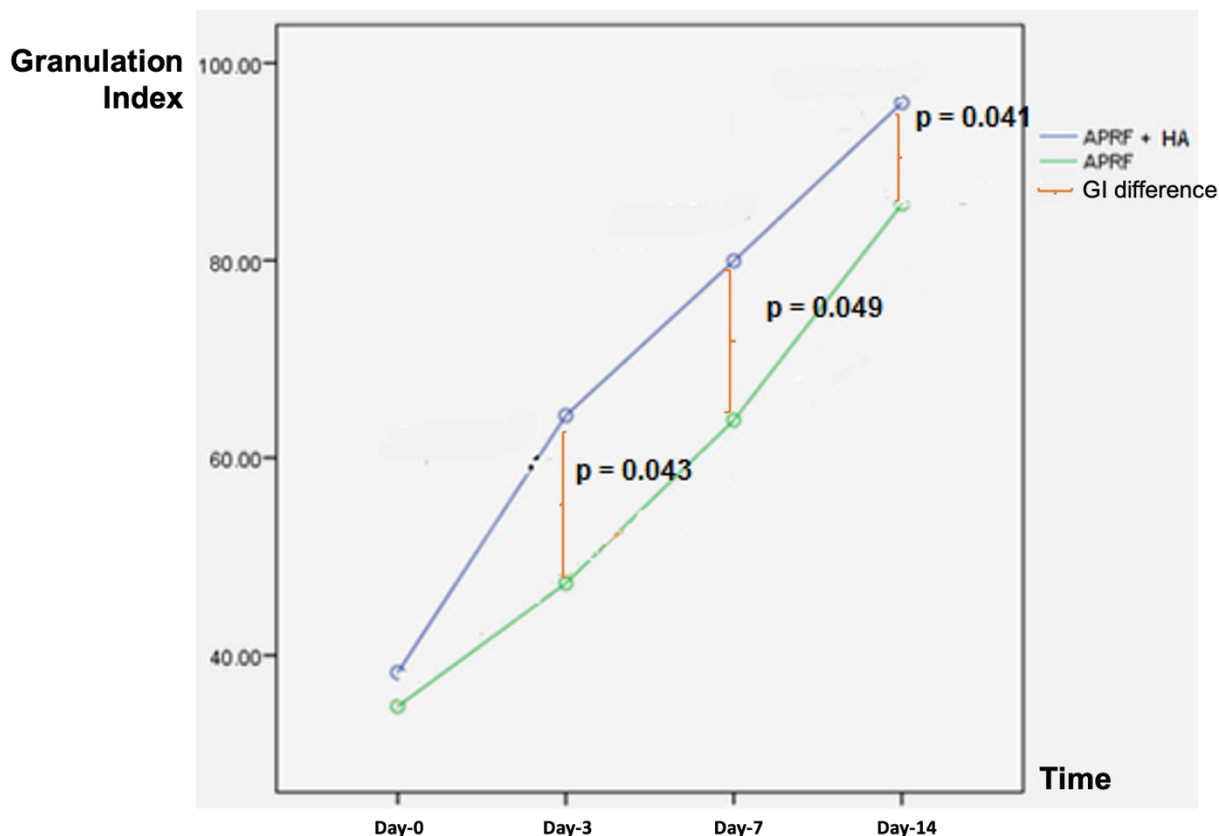


Figure 1. GI of DFU on day-0, 3, 7, and 14.

NPS and ICS Evaluation in DFU Subjects

NPS and ICS were assessed to observe the subject's clinical condition related to the DFU. In NPS evaluation, day-0 examination of both groups scored between 7–8 (severe pain). After treatments, the pain scores decreased in both groups. Furthermore, A-PRF + HA group showed a significantly lower NPS on day-3 ($p < 0.001$) compare to A-PRF alone, as showed in Table 3 and Figure 2.

Table 3. NPS median differences in DFU subjects.

Treatment	Median (Min-Max)		p-value
	A-PRF + HA (n = 10)	A-PRF (n = 10)	
Day-0	8 (8–9)	8 (7–8)	0,164
Day-3	4 (3–5)	5 (5–6)	< 0.001*
Day-7	2.5 (1–3)	3 (3–5)	0.029*
Day-14	2.1 (2–4)	2 (2–3)	0.957

0= no pain; 1–3 = mild; 4–6 = moderate; 7–9 = severe

*significant at $p < 0.05$. Mann-Whitney test

Figure 2 shows that the NPS in A-PRF + HA group was significantly lower compared to A-PRF group on day-3 ($p < 0.001$), and day-7 ($p = 0.029$), but not significantly different on day-14 ($p = 0.957$).

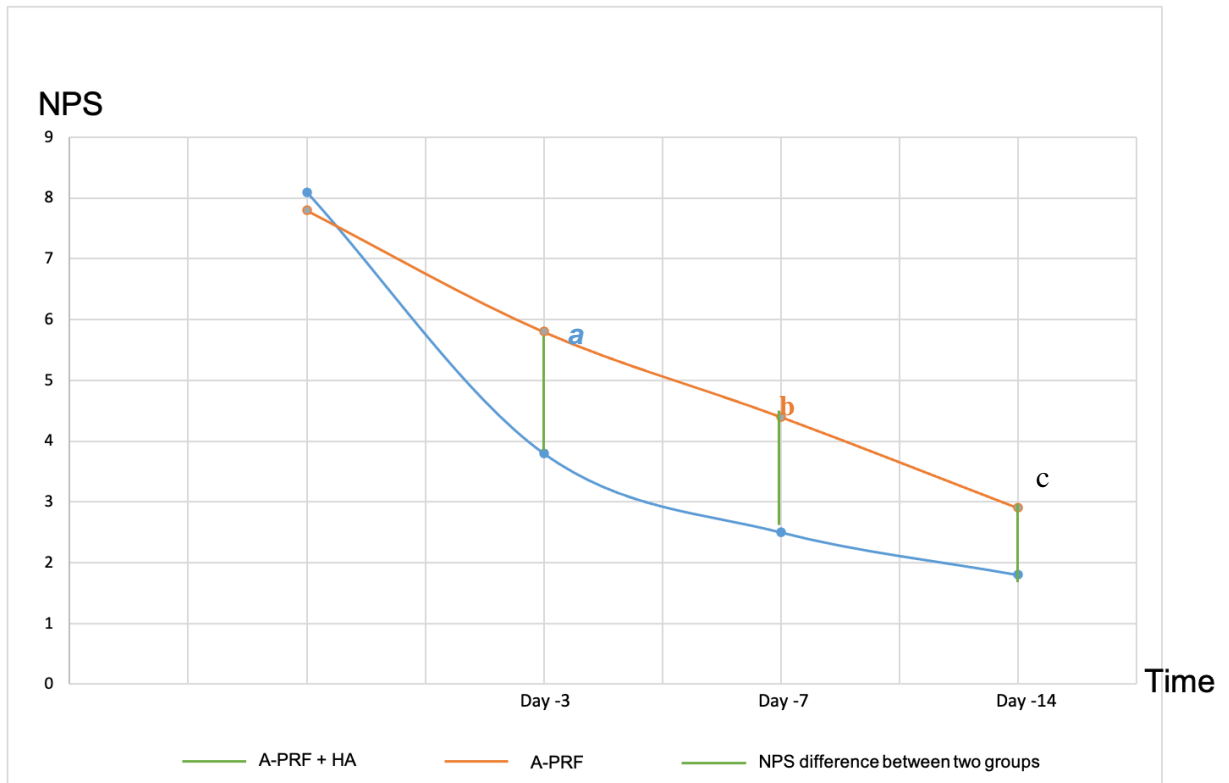


Figure 2. NPS in DFU subjects before and after treatments.

Patients' inflammatory state was assessed by ICS including redness, heat, swelling, pain, and *functio laesa* before and after treatments. A-PRF + HA group showed a significantly lower ICS score after day-7 compare to A-PRF group as showed in Table 4.

Table 4. ICS score in DFU subjects.

Sign of inflammation	Mean± SD		p-value
	A-PRF + HA (n=10)	A-PRF (n=10)	
Redness			
Day-0	2.9±0.5	2.5±1.1	0.890
Day-7	0.1±0.03	1.1±0.3	0.008*
Heat			
Day-0	2.8±0.1	2.4±0.5	0.707
Day-7	0.3±0.1	0.8±0.2	0.022*
Swelling			
Day-0	2.9±0.2	2.5±0.3	0.179
Day-7	0.1±0.05	0.8±0.1	0.001*
Pain			
Day-0	2.9±0.5	2.7±0.6	0.328
Day-7	0.2±0.4	0.9±0.2	0.002*
<i>Functio Laesa</i>			
Day-0	2.5±0.3	2.6±0.2	0.978
Day-7	0.3±0.1	0.4±0.1	0.053*

0 = none; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe.

*significant at $p < 0.05$. t-test

DISCUSSION

Type 2 Diabetes patients with blood glucose level higher than 300 mg/dL usually have problems in wound healing, due to the growth factors impairment (18). DFU treatment with growth factors supplementary such as transforming growth factor (TGF)- β 1 and β 2, insulin-like growth factor (IGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) has begun to be developed in the late decades, to improve new cell growth and wound healing (19–21). These growth factors also used in orthopaedics, maxillofacial, periodontal fields, plastic surgery, and sports medicine because of their anti-inflammatory and antimicrobial properties (22). The DFU healing after growth factor application characterized by granulation tissue formation. An increased level of IL-6 was reported in plasma in diabetic subjects with foot ulceration compared with diabetics without foot complications (22).

In this study, 20 DFU subjects with similar basic characteristics were involved. A-PRF + HA group showed a significant reduction in inflammation both in wound swabs ($p=0.015$), and fibrin gel preparation ($p=0.034$). the subjects' clinical observation also showed a significant improvement for GI, NPS and ICS.

Delays in diabetic wound healing associated with increased IL-6, IL-6R α expression, and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation, yet lower suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression in the skin (23). IL-6 and its receptor may play important roles in diabetic wound healing. IL-6 is produced in DFU with chronic inflammation. The nature of IL-6 is to change the leukocyte infiltrates, from polymorphonuclear neutrophils to monocytes / macrophages. In addition, IL-6 stimulates T and B cells, which support a chronic inflammatory response (24).

The inflammatory status of DFU can be observed both locally and systemically. In this study, a DFU swab was performed locally using a cotton swab and the inflammatory mediators IL-6 was measured. This examination is novel and has never been done before. Usually DFU assessment for biomarkers was performed through a more invasive techniques such as tissue biopsy or patch skin biopsy. Systemic inflammation can be measured from patients' serum. In this study, we measured the IL-6 from A-PRF + HA or A-PRF fibrin gel. PRF lysates incubated in a conditioned medium elicits an anti-inflammatory effect showed by IL-1 β measurements (25). PRF lysate polarizes M2 macrophages phenotype and express arginase-1 (ARG1) and YM1 gene which supports angiogenesis (26,27).

Many natural growth factors were developed from autologous platelet concentrate including PRP and PRF. PRP releases growth factor from the granules when it was activated, increases the fibroblasts proliferation rate in wound healing (28). A-PRF, a second generation of PRP also plays a role in the proliferation phase by continuously releasing growth factors such as TGF- β 1 and PDGF-AA at the wound site and inducing cells' viability, proliferation and differentiation. A-PRF was first described in 2014 as a new concept for cell-based tissue engineering by lowering the rpm when centrifuged, and reducing the time. Venous blood is drawn without adding anticoagulants to obtain A-PRF. The standard PRF (S-PRF) protocol is to use a speed of 2700 rpm or 360xg centrifuge for 12 minutes. In contrast to S-PRF, the A-PRF was obtained by a low-speed centrifuge (1500 rpm or 200xg for 8 minutes) because centrifugal force (speed and time) affects the distribution of suitable growth factor's cells for wound healing and tissue regeneration.(27)

HA recruits macrophages and modulates the inflammatory response (25). HA also has antioxidant and anti-inflammatory properties so it is widely used to treat osteoarthritis (OA). HA is able to build connective tissue and functions to stabilize the intercellular structure and form a matrix of collagen and elastic fibers (29). HA inhibits the collagenase, which is the proteolysis enzyme of collagen (27). HA also affects cell migration, cell adhesion and angiogenesis. Fibroblasts play a major role in wound healing by forming extracellular matrix components such as collagen, elastin and proteoglycans. Fibroblasts also play an important role in the migration of keratinocytes from the wound edges to achieve wound closure and matrix reconstruction resulting in maximal wound healing force of contraction (29).

At the beginning of wound healing, during the inflammatory phase, the role of IL-6 is very important. But as it moves into the proliferation and regeneration phase, the inflammatory process will decrease. If the inflammatory process is prolonged such as in DFU, the healing process of the wounds and the formation of granulation tissue will be inhibited. An anti-inflammatory agent is needed in this case to improve the wound healing process (25).

In this study, the combination of A-PRF and HA significantly increases GI, while decreases IL-6 in day-3 dan day-7. A-PRF and HA combination, via the Erk1/2 pathway and the Smad 2/3 pathway, will reduce the number of pro-inflammatory cytokines, increase the proliferation of articular chondrocytes, and chondrogenic differentiation. The clinical application of A-PRF and HA combination is more effective than PRF or HA alone; though both are therapeutic options for osteoarthritis and chronic tendinopathy.

The combination of AH with PRF stimulated growth factors such as TGF- β , significantly increasing the proliferation index and collagen deposition (30). AH also interacts with the TGF- β 1 transformation of PRF, thereby protecting growth factors from the degradation of tryptic and collagen by protease enzymes. Another study aobserved that the combination of AH with L-PRF reduced edema after the 3rd molar oral surgery through HA linking wih (Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) receptor. This link will reduce vascular leakage of neutrophil and reduce edema (31).

HA affects three main receptors in the modulation of tissue regeneration, namely migration, proliferation and activation of keratinocyte cells, such as CD44. This is done to restore the epidermis, fibroblast migration, control of inflammation and neoangiogenesis, as well as promotion of extracellular matrix (ECM) deposits such as collagen fibers that contribute to wound healing (26,32,33). The main process in the wound healing phase is the transition from the inflammatory to the proliferative phase, when the inflammatory phase is required for hemostasis and recruitment of cytokines that protect against pathogens and help eliminate dead tissue. However, if there is prolonged inflammation will result in deregulated differentiation and activation of keratinocytes, inhibiting wound healing. During the proliferation phase, it is closely related to the inflammatory response to transition to the anti-inflammatory process required in the proliferation and granulation phase of wound healing (34).

Conclusion

The combination of A-PRF and HA increases the GI in DFU healing by reducing the inflammation state which will induce the angiogenesis process. Clinically, the application of A-PRF and HA combination showed to reduce pain better than the A-PRF alone in DFU patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Medical Science Doctoral Programme, Universitas Indonesia.

AUTHORS CONTRIBUTION

RWK , IA, FDS, EY, and SB designed the study, RWK collected the study data. RWK, IA, FDS, EY, and SB did the statistical analysis. RWK, IA, FDS, EY, SI, TS, JR, SB, and MHR interpreted the data. All authors are contributing in preparing the manuscript. MHR gave writing advices and also collected the study fund.

References

1. Heydari I, Radi V, Razmjou S, Amiri A. Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. *International Journal of Diabetes Mellitus*. 2010 Apr;2(1):61–3.
2. Alexiadou K, Doupis J. Management of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Ther* [Internet]. 2012 Dec [cited 2021 Mar 12];3(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3508111/>
3. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018 Apr;138:271–81.
4. Hilton JR, Williams DT, Beuker B, Miller DR, Harding KG. Wound Dressings in Diabetic Foot Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 Aug 1;39(Supplement_2):S100–3.
5. Everett E, Mathioudakis N. Update on management of diabetic foot ulcers: Diabetic foot ulcers. *Ann NY Acad Sci*. 2018 Jan;1411(1):153–65.
6. Naves CCLM. The Diabetic Foot: A Historical Overview and Gaps in Current Treatment. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016 May 1;5(5):191–7.
7. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, et al. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)*. 2003 Oct;39(10):787–800.
8. Boulton AJM, Armstrong DG, Kirsner RS, Attinger CE, Lavery LA, Lipsky BA, et al. Diagnosis and Management of Diabetic Foot Complications. *Diabetes*. 2018 Oct;2018(2):1–20.
9. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2015 May;473(5):1635–43.
10. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Jun;13(7):1121–30.
11. Pavan K, Vikram R, Raja B, Jagadish R. Platelet Rich Fibrin -A Second Regeneration Platelet Concentrate and Advances in PRF. *IJDA* [Internet]. 2016 Mar 7 [cited 2021 Mar 10];07(04). Available from: <http://rep.nacd.in/ijda/07/04/07.04.10251.pdf>
12. Vokurka J, Gopfert E, Blahutkova M, Buchalova E, Faldyna M. Concentrations of growth factors in platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in a rabbit model. *Veterinarni Medicina*. 2016 Oct 21;61(No. 10):567–70.
13. Sargowo D, Handaya A yuda, Widodo M, Lyrawati D, Tjokroprawiro A. Aloe Gel Enhances Angiogenesis in Healing of Diabetic Wound. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2011 Dec 1;3:204.

14. Fathi W. The Effect of Hyaluronic Acid and Platelet - Rich Plasma on Soft Tissue Wound Healing: An Experimental Study on Rabbits. *Al-Rafidain Dental Journal*. 2012 Nov 1;12:115–25.
15. Sallam A, El-Sharawy A. Role of Interleukin-6 (IL-6) and Indicators of Inflammation in the Pathogenesis of Diabetic Foot Ulcers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2012;6:430–5.
16. Snijders GF, van den Ende CHM, van den Bemt BJF, van Riel PLCM, van den Hoogen FHJ, den Broeder AA, et al. Treatment outcomes of a Numeric Rating Scale (NRS)-guided pharmacological pain management strategy in symptomatic knee and hip osteoarthritis in daily clinical practice. *Clin Exp Rheumatol*. 2012 Apr;30(2):164–70.
17. Kartika RW, Alwi I, Suyatna FD, Yunir E, Waspadji S, Immanuel Suzzanna, et al. The Use of Image Processing in the Evaluation of Diabetic Foot Ulcer Granulation after Treatment with Advanced-Platelet Rich Fibrin + Hyaluronic Acid. *Sys Rev Pharm*. 2020;11(12):519-526.
18. Geerlings SE, Hoepelman AIM. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1999 Dec;26(3–4):259–65.
19. Arsianti RW, Parman DH, Lesmana H, Taufiqqurohman M. Effect of Electrical Stimulation in Lower Extremity as Physical Exercise in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2018 Apr 29;10(1):62–5.
20. Sridharan K, Sivaramakrishnan G. Growth factors for diabetic foot ulcers: mixed treatment comparison analysis of randomized clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2018 Mar;84(3):434–44.
21. Ghanaati S, Al-Maawi S, Schaffner Y, Sader R, Choukroun J, Nacopoulos C. Application of liquid platelet-rich fibrin for treating hyaluronic acid-related complications: A case report with 2 years of follow-up. *International Journal of Growth Factors and Stem Cells in Dentistry*. 2018 Jan 1;1.
22. Tuttolomondo A, La Placa S, Di Raimondo D, Bellia C, Caruso A, Lo Sasso B, et al. Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular comorbidity. *Cardiovasc Diabetol*. 2010 Sep 13;9:50.
23. Soewondo P, Ferrario A, Tahapary D. Challenges in diabetes management in Indonesia: a literature review. *Global Health*. 2013;9(1):63.
24. Agarwal M, Agarwal V. Platelet Rich Fibrin and its Applications in Dentistry- A Review Article. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922–9.
25. Mussano F, Genova T, Munaron L, Petrillo S, Erovigni F, Carossa S. Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets*. 2016 Jul;27(5):467–71.
26. Nasirzade J, Kargarpour Z, Hasannia S, Strauss FJ, Gruber R. Platelet-rich fibrin elicits an anti-inflammatory response in macrophages in vitro. *J Periodontol*. 2020 Feb;91(2):244–52.

27. Gill S, Parks W. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008 Jun;40(6-7):1334-47.
28. Tangsupati P, Murdiastuti K. The Effect of Collagen Activation on Platelet Rich Plasma for Proliferation of Periodontal Ligament Fibroblasts. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2018 Dec 28;10(3):278-83.
29. Corey SJ, Kimmel M, Leonard JN, editors. *A Systems Biology Approach to Blood* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [cited 2021 Mar 10]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 844). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2095-2>
30. Iio K, Furukawa K-I, Tsuda E, Yamamoto Y, Maeda S, Naraoka T, et al. Hyaluronic acid induces the release of growth factors from platelet-rich plasma. *Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology*. 2016 Apr;4:27-32.
31. Afat İM, Akdoğan ET, Gönül O. Effects of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Alone and Combined With Hyaluronic Acid on Pain, Edema, and Trismus After Surgical Extraction of Impacted Mandibular Third Molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018 May;76(5):926-32.
32. Park D, Kim Y, Kim H, Kim K, Lee Y-S, Choe J, et al. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . *Mol Cells*. 2012 Jun;33(6):563-74.
33. Wu X, Yang L, Zheng Z, Li Z, Shi J, Li Y, et al. Src promotes cutaneous wound healing by regulating MMP-2 through the ERK pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016 Mar;37(3):639-48.
34. Yang P, Pei Q, Yu T, Chang Q, Wang D, Gao M, et al. Compromised Wound Healing in Ischemic Type 2 Diabetic Rats. *PLOS ONE*. 2016 Mar 30;11(3):e0152068.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Identitas

Nama : Ronald Winardi Kartika
 Tempat/tanggal lahir : Banyuwangi, 28 Juni 1972
 Alamat : Jl Pelangi Biru III, A6 no 22, Kelurahan Pegangsaan Dua
 Kecamatan Kelapa Gading, Jakarta Utara
 Telp : 021-46835105
 Hand phone : 081219876869
 Email : ronaldkartika@gmail.com
 ronald.winardi71@ui.ac.id
 ronald.kartika@ukrida.ac.id

Riwayat Pnedidikan :

FKUA (1999)
 Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bedah Jantung Paru dan Pembuluh Darah
 FKUI-RSUPNCM (2007)
 Fellow in Adult and Congenital Cardiac Surgery Philippine Heart Center, City,
 Philippine (2008-2010)
 Fellow in Peripheral Vascular/ Endovascular Surgery/ Aortic Surgery
 Philippine Heart Center, Philippine, Quezon City, Philippine (2011-2012)
 Fellow in Cryotherapy – Irreversible Electroporation (Nano Knife) –Brachytherapy
 Seed Implantation, Fuda Cancer Hospital - Jinan University Guangzhou China
 (2016)
 Fellow in Endovascular Surgery- Abrazo Arizona Heart Institute Hospital, Arizona,
 USA (2017)
 Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Indonesia 2017– sekarang

Riwayat Pendidikan Tambahan dengan Minat Khusus/Workshop /Hand on

<i>Advance Traumatic Life Support</i>	RSAL Dr.Ramelan, Surabaya
<i>Advance Cardiac Life Support</i>	Philippine Heart Center (American Heart Association)
<i>Advance Pediatric Life Support</i>	Philippine Heart Center (American Heart Association)
<i>Fundamental Critical Care Support</i>	National Cardiovascular Center RS Harapan Kita, Jakarta
<i>Electrocardiography course</i>	Philippine Heart Center (American Heart Association)
<i>Ultrasonography Course</i>	PUSKI, FKUI – RSUPN Cipto Mangunkusumo, Jakarta
<i>Emergency Ultrasound Life Support</i>	Critical Care FKUI – RSUPN CM , Jakarta

<i>Pulmonology Intervention Course</i>	Internal Medicine (Division Of Pulmonologi) , JICMM - FKUI- RSUPN Cipto Mangunkusumo, Jakarta
<i>Basic Laparoscopy Course</i>	ELSA, Fakultas Kedokteran Hewan, Bogor , Indonesia
<i>Advance Laparoscopy Course</i>	ELSA, Fakultas Kedokteran Hewan, Bogor , Indonesia
<i>Cryo Surgery Course</i>	International Society of Cryosurgery 17 th , Bali , Indonesia
<i>Echocardiography Course</i>	Hopecardis, Internal Medicine (Division Of Cardiology) FKUI- RSUPN Cipto Mangunkusumo, Jakarta
<i>Endovenous Laser Ablation Course</i>	Singapura General Hospital (SGH) – Singapura
<i>EVLT vs RFA for varicose vein</i>	Jakarta Heart Center (JHC) - Jakarta
<i>Radiofrequency Ablation Course</i>	Workshop PIT HBTKVI 6 , Manado
<i>Hernia in BPJS era (Workshop)</i>	RS Gading Pluit
<i>Endovenous Laser Ablation (EVLT) work shop</i>	National Cardiovascular Center RS Harapan Kita, Jakarta
<i>Basic Video Assisted Thoracoscopy Surgery (VATS) Workshop</i>	Workshop PIT HBTKVI 8 – Palembang
<i>Advance Video Assisted Thoracoscopy Surgery (VATS) Workshop</i>	RS Persahabatan Jakarta
<i>Basic Endovascular Workshop</i>	Workshop PIT HBTKVI 8 – Palembang

Riwayat Pekerjaan

1999–2000	: Dokter Umum
2013–sekarang	: Dokter Bedah Jantung Paru dan Pembuluh Darah
2018–sekarang.	: Dosen Tetap FKIK Univesitas Kristen Krida Wacana

Riwayat Organisasi

1999–sekarang	: anggota IDI
2007–sekarang	: anggota HBTKVI
2020–sekarang	: anggota IVAA
2020–sekarang	: anggota PDHMI

Riwayat Persentasi Penelitian, Pembicara

No	Topik	Acara
1	<i>Ascending Aortic Interposition in Acute Ascending Aortic Dissecting</i>	<i>Muktamar of Indonesia Surgeon Association Jakarta – Indonesia</i>
2	<i>Corticosteroid induced vascular damage for Austin Moore Prostheses</i>	<i>Association of Orthopaedic Surgeons of Indonesia, Manado - Indonesia</i>
3	<i>Eversion of Diaphragm</i>	<i>Muktamar of Indonesia Surgeon Association Jakarta – Indonesia</i>
4	<i>Surgery in Superior Vein Cava Syndrome</i>	<i>Muktamar of Indonesia Surgeon Association Padang – Indonesia</i>
5	<i>Minimal Surgical Approach of CABG</i>	<i>Muktamar of Indonesia Surgeon Association Padang - Indonesia</i>
	<i>Evaluation of Arterial Switch Operation (ASO) in Transposition of Great Arteries in January 1997 – March 2004 at National Cardiovascular Center Harapan Kita, Jakarta</i>	<i>Muktamar of Indonesia Surgeon Association Jakarta - Indonesia</i>
7	<i>Evaluation Cardiac Mixoma in January 2001 – September 2005 at National Cardiovascular Center Harapan Kita, Jakarta</i>	<i>17th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) Manila - Philippine</i>
8	<i>Pulsatile Bidirectional Cavo Pulmonary Shunt in January–December 2004 at National Cardiovascular Center Harapan Kita, Jakarta</i>	<i>17th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) in Manila - Philippine</i>
9	<i>Repair of Total Anomalous Pulmonary Venous Connection in Infancy: Experience from a Developing Country</i>	<i>18th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) in Bali - Indonesia</i>
10	<i>Profile Thoracic Cardiovascular Surgery in Gatot Soebroto, Central Army Hospital</i>	<i>18th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) in Bali - Indonesia</i>
11	<i>Coronary artery bypass grafting in patients with poor ventricular function</i>	<i>18th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) in Bali - Indonesia</i>
12	<i>No-Touch Technique with Right Axillary Artery Cannulation for Surgical strategies of Coronary Artery Bypass Grafting Concomitant with porcelain aorta; Philippine Heart Center experience</i>	<i>PATACSI – GETZ Scientific research Forum-November 2009 Manila - Philippine</i>
13	<i>Tricuspid Valve Repair with the PHC Annuloplasty Ring – Early Clinical and Echocardiography result (Philippine Heart Center experience)</i>	<i>PATACSI – GETZ Scientific research Forum-November 2010 Manila – Philippine</i>
14	<i>Cryosurgery for Lung Cancer (Free Paper)</i>	<i>PIT HBTkVI 6 - Manado 2014</i>
15	<i>Negative Pressure Wound Therapy for diabetic foot</i>	<i>PIT HBTkVI 7 – Aceh 2015</i>

- 16 *Foam Washout Sclerotherapy as procedure in PIT HBTkVI 7 – Aceh 2015 Varicose Vein*
 - 17 *Early detection of atherosclerosis use carotid PIT HBTkVI 7 – Aceh 2015 ultrasound by Intimal Medial Thickness (IMT) measurement*
-

Seminar :

1. 17th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) in Philliphine
2. OLVG Cardiovascular Association , Netherlands in Jogjakarta, Indonesia
3. Animal Laboratorium in National Cardiovascular Center Harapan Kita Hospital
4. Animal Basic Digestif Surgery Course in UGM/ RS dr.Sardjito., Jogjakarta
5. 18th Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia (ATCSA) in Bali –Indonesia
6. PIT HBTkVI 6, Manado , Indonesia
7. ASMIHA – PERKI , FKUI , RSUPN Cipto Mangunkusumo, Jakarta
8. HOPECARDIS – Internal Medicine (Division of Cardiologym) - RSUPN Cipto Mangunkusumo, Jakarta
9. PIT HBTkVI 7, Aceh , Indonesia
10. PIT HBTkVI 8 , Palembang, Indonesia