

## The Expression Gene that Have a Role in Tissue Regeneration of Digit Tip Mice (*Mus musculus*)

Titta Novianti<sup>1</sup>, Febriana Dwi Wahyuni<sup>1</sup>, It Jamilah<sup>2</sup>, Syafruddin Ilyas<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia

\*Corresponding author: Syafruddin6@usu.ac.id

### Abstract

*The tissue regeneration of digit tip mice needs some proteins that play a role in overcoming the inflammatory state. The protein plays a role in the continuous growth of specific cells, cell migration, functional differentiation, and tissue morphogenesis. All of the cells need energy related to cell respiration. Naturally expressing mRNA of ADAM 17, Wnt-5a, Hedgehog (HH), and Cytochrome-c (Cyt-c) reliably produced the accordance with their respective roles in each specific phase of tissue regeneration until the whole tissues formed again. The ADAM 17 genes expressed in the inflammatory phase, it positively related its essential role to the inflammatory process. Cyt-c gene expression occurs throughout the tissue regeneration the gene has a role in apoptosis cell. The Wnt-5a gene in the granulation phase and the HH gene expressed after the blastema phase. Both expressed genes positively correlate with the continual growth of the digit tip mice by the specific Spearman test ( $p < 0.05$ ) because of their active role of cell proliferation, cell differentiation, extensive migration, and morphogenesis.*

**Keywords :** *digit tip mice, ADAM 17, Cyt-c, Wnt-5a, Hedgehog*

### Abstrak

Proses regenerasi jaringan jari kaki mencit memerlukan protein yang berperan dalam mengatasi keadaan inflamasi, protein yang berperan pada proses proliferasi sel, diferensiasi, migrasi sel, diferensiasi, serta morfogenesis jaringan. Keseluruhan proses tersebut memerlukan energi yang berkaitan dengan respirasi sel. Ekspresi mRNA gen ADAM 17, Wnt-5a, Hedgehog (HH), dan Cyt-c membentuk orchestra yang berkesinambungan sesuai dengan fungsinya masing-masing pada setiap fase regenerasi jaringan sehingga terbentuk jaringan dan organ yang utuh kembali. Gen ADAM 17 terekspresikan pada fase inflamasi, karena fungsinya berkaitan dengan proses inflamasi. Ekspresi gen Cyt terjadi sepanjang proses regenerasi jaringan terjadi, karena berkaitan dengan fungsinya dalam proses respirasi sel. Ekspresi mRNA gen Wnt-5a terjadi pada fase granulasi dan gen HH terjadi setelah fase blastema, kedua gen berkorelasi dengan pertumbuhan digit tip mice dengan uji Spearman ( $p < 0,05$ ) karena peranannya dalam proses proliferasi sel, diferensiasi sel, migrasi, dan morfogenesis sel.

**Kata Kunci :** *ujung jari kaki mencit, ADAM 17, Cyt-c, Wnt-5a, Hedgehog*

### Pendahuluan

Regenerasi jaringan merupakan proses alami yang akan terjadi pada saat organisma mengalami luka atau amputasi. Tidak semua organisma mengalami proses regenerasi secara sempurna,

luka yang terjadi tertutupi kembali namun tidak mampu mengembalikan organ yang hilang jika mengalami amputasi. Semakin rendah tingkatan hewan, maka semakin tinggi daya regenerasinya. Hydra, cacing pita, bintang laut, memiliki daya

regenerasi tinggi saat kehilangan bagian tubuhnya. Pada hewan vertebrata, kemampuan ini terbatas hanya pada beberapa organ tertentu dan pada hewan tertentu. Ikan memiliki daya regenerasi pada siripnya, urodela memiliki daya regenerasi pada ekornya, demikian juga cecak dan kadal memiliki kemampuan regenerasi pada ekornya setelah mengalami autotomi. Manusia, sebagai organisma dengan tingkatan taksa tertinggi memiliki daya regenerasi yang sangat terbatas. Oleh karena itu penelitian regenerasi jaringan terus dikembangkan sebagai upaya terapi pada manusia saat mengalami luka atau amputasi.

Proses regenerasi jaringan melibatkan berbagai sel, molekul, protein, dan gen. Proses ini sangat rumit dan kompleks karena dinamika jaringan dalam mengatur segala instrumen dan compartment. Dinamika ini sangat berkaitan dengan pembagian waktu dan fasa proses regenerasi jaringan. Terdapat 4 tahapan regenerasi jaringan yaitu fasa wound healing, fasa blastema, fasa regenerasi, dan fasa maturasi. Fasa wound healing terjadi sesaat setelah jaringan mengalami luka. Pada fasa ini, jaringan akan mengalami inflamasi, granulasi, dan kontraksi luka. Pada setiap fasa, ekspresi gen, protein, molekul, dan sel yang terlibat dalam proses regenerasi jaringan ini berbeda. Pada fasa inflamasi, jaringan mengalami bleeding dan jaringan didominasi oleh sel darah putih yang berperan memfagositosis sel yang rusak serta benda asing yang masuk. Pada tahap granulasi, sel-sel punca pada area luka melakukan proliferasi sel dan mensekresikan molekulnya yang berperan dalam regenerasi jaringan. Tahap selanjutnya dari penyembuhan luka adalah kontraksi luka yang ditandai migrasi sel endotel membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis) sehingga banyak membutuhkan matriks kolagen. Pada tingkat ini juga terjadi migrasi dan proliferasi sel fibroblas dan sel makrofag. Sel fibroblas akan mensekresikan faktor pertumbuhan yang akan merangsang pembentukan matriks ekstra seluler. Sel makrofag berperan membersihkan jaringan dari sisa matriks ekstraseluler, sehingga terjadi keseimbangan antara produksi matriks ekstraseluler dengan degradasi ekstraseluler, sehingga terjadi pembentukan jaringan baru dan pematangan jaringan.<sup>1,11</sup>

Selama fase inflamasi, protein pada permukaan sel akan mendominasi untuk dikeluarkan fragmen ekstraseluler. Sejumlah

leukosit meregulasi proses proteolitik yang memiliki peran penting dalam mengatasi inflamasi. Salah satu protein yang berperan dalam phase inflamasi adalah protein disintegrin and metalloproteinase-17 (ADAM17) yang akan memediasi ikatan domain pada permukaan sel. Sesungguhnya peran gen ADM 17 dalam proses inflamasi ini sebenarnya belum jelas. Hambatan ekspresi ADAM17 dapat menyebabkan sel kerusakan pada sel darah putih.

Gen Hedgehog (HH) merupakan salah satu gen yang memiliki peran dalam proses mitosis dan morfogenesis jaringan dari mulai perkembangan embrio sampai tumbuh dewasa pada seluruh organisma. Ekspresi gen tersebut masih ditemukan di beberapa populasi sel dewasa. Peranan gen HH dalam proses regenerasi masih sangat terbatas informasinya. Terdapat tiga jenis protein hedgehog, antara lain sonic (SHH), Indian (IHH), dan desert (DHH) hedgehog yang bersifat homolog satu sama lain. Protein HH akan mengalami modifikasi setelah translasi dan akan disekresikan sel menggunakan protein transporter membrane. Protein SHH adalah jenis yang paling banyak diekresikan oleh sel hewan vertebrata. Sinyaling SHH juga meregulasi ekspansi dan pembelahan sel dalam pembentukan neural tube pada masa embrio untuk membentuk pola jaringan. Pada tahap perkembangan tertentu protein SHH akan menghambat diferensiasi sel neural progenitor, hal tersebut untuk menjaga agar sel tetap sebagai sel punca progenitor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ternyata sinyaling HH protein dapat meregulasi sel punca dalam hal proliferasi dan spesifikasi. Pada hewan vertebrata dewasa yang mengalami luka pensinyalan HH dapat memicu sel punca dalam perbaikan. Peningkatan regulasi HH merupakan respons alami terhadap cedera dan cara untuk mencapai perbaikan jaringan melalui proliferasi, plastisitas, atau transdiferensiasi sel.<sup>16,17</sup>

Gen Wnt-5a adalah gen yang disekresikan dengan sinyaling sel dan berperan meregulasi pembentukan sel, membentuk sifat adhesi sel, proliferasi sel, diferensiasi serta pergerakan sel. Keseluruhan aktivitas sel ini sangat dibutuhkan dalam pembentukan organ. Beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya peran Wnt-5a dalam proliferasi sirip, kaki pada beberapa organ hewan yang sedang berproliferasi. Gen Wnt-5a juga berkontribusi dalam respon imun dengan

meregulasi diferensiasi sel T. Fungsi proinflamasi Wnt-5a tidak hanya memstimulasi proliferasi sel, tetapi juga dapat menginduksi ekspresi Interleukin 6 (IL-6) dan ekspresi IL-1b. Ekspresi WNT-5A bervariasi pada setiap jenis sel terutama pada stimulasi respon imun. Gen WNT-5A tidak hanya berperan dalam merespon saat luka tetapi juga berperan dalam menstabilkan jumlah sel imun dalam tubuh.

Gen Cytochrome c (Cyt c) adalah protein yang tidak diragukan lagi berperan besar pada proses apoptosis. Gen Cyt c yang terletak pada perifer sel dalam inner membrane mitokondria, berfungsi sebagai tempat loncatan elektron dari complex III dan complex IV pada rantai respirasi. Pada mencit, kelainan pada gen Cyt c menyebabkan embrio yang letal. Protein Cyt c disintesis pada sitosol sebagai apoprotein dan bertranslokasi menuju mitokondria yang berkaitan dengan kelompok besi. Fungsi Cyt c atau holocytochrome c, tersusun atas rantai polipeptida yang terdiri dari 104 residu asam amino yang berkaitan dengan kelompok besi. Kuatnya ikatan Cyt-c berimplikasi terhadap berbagai fungsi. Perannya dalam transport elektron akan menghambat pembentukan reactive oxygen species (ROS) dan mencegah oxidative stress.

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi gen yang diduga berperan dalam inflamasi, yang diduga berperan sebagai penyedia energi selama proses respirasi sel, gen yang berperan dalam proliferasi sel dan gen yang berperan dalam morfogenesis sel dan organ dalam proses regenerasi jaringan jari kaki mencit.

## Metode Penelitian

### Sampel

Diajukan kode etik penelitian pada Komisi Etik Penelitian Universitas Esa Unggul. Sampel penelitian adalah 30 ekor mencit betina (*Mus musculus*) var Swiss Webster, berusia 8 minggu dengan berat 20 gram. Jumlah sampel

menggunakan rumus Federer. Mencit diperoleh dari laboratorium milik penelitian dan pengembangan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, yang dipelihara dan diberi perlakuan oleh laboran dari Litbangkes Depkes RI.

Mencit dibius dengan menggunakan ketamin/zylazine dengan dosis 0,5 gr/kg BB, dan dilakukan amputasi pada ujung jari kaki. Hasil pertumbuhan jaringan digunakan sebagai sampel pada hari ke 0 (4 jam setelah amputasi), 1, 3, 5, 10, 15, dan 25 hari setelah amputasi. Sampel hasil regenerasi digunakan untuk analisis qPCR, histologi, uji IHC, dan uji Elisa. Pada tahun ke 1 dilakukan uji ekspresi gen melalui metoda qPCR dan histologi.

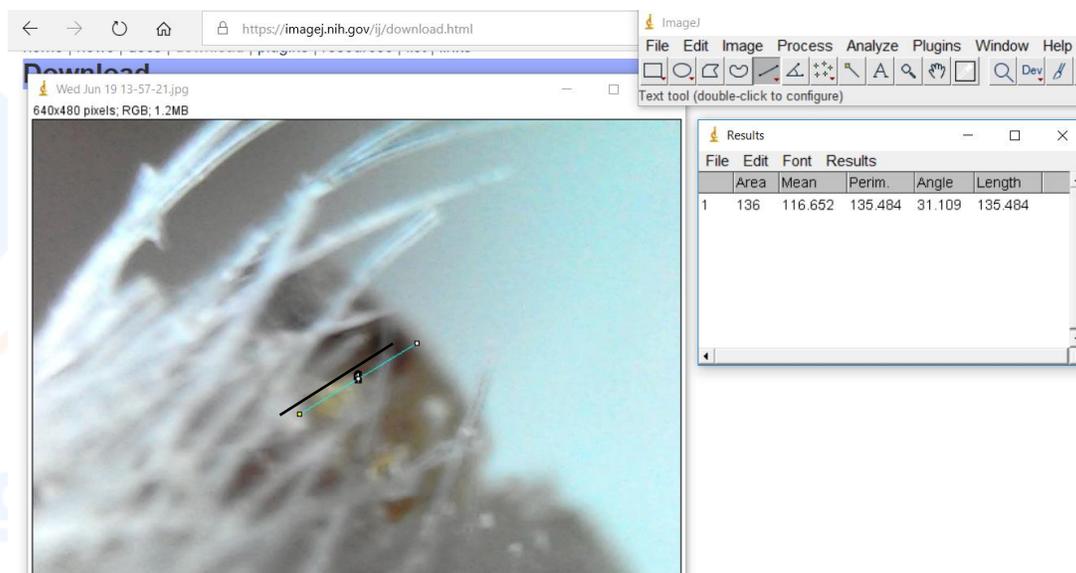
### Histologi dengan pulasan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Sediaan histologi diwarnai dengan pulasan *Hematoxylin Eosin* (HE) dan histokimia: formalin 10%; alkohol 70%; alkohol 80%; alkohol 95%; dan alkohol 100%; xylol; blok parafin; *hematoxylin-eosin*; akuades; pulasan *Van Gieson*.

### Penghitungan semi kuantitatif sediaan HE dengan program *ImageJ I-46*

Perangkat lunak *ImageJ I-46* merupakan perangkat lunak yang memiliki berbagai fitur yang dapat digunakan dalam analisis semi kuantitatif sediaan histologi dengan pewarnaan HE. Pada perangkat lunak *Image J* ini dapat dilakukan penghitungan jumlah sel serta pengukuran panjang atau luas sel serta jaringan. Perangkat lunak *Image J* dapat diunduh secara gratis dan digunakan secara *offline*.<sup>22</sup>

Penghitungan panjang dilakukan dengan membuka file gambar histologi terlebih dahulu dan dilakukan pengaturan skala gambar dengan menggunakan fitur *set scale*. Penghitungan panjang digunakan fitur gambar garis hasil penghitungan didapat secara otomatis dengan menggunakan fitur *measure* (Gambar 1).<sup>23</sup>



Gambar 1. Penghitungan panjang jaringan jari kaki mencit dengan menggunakan perangkat lunak *Image J*.

### Analisis mRNA qPCR

Hasil desain primer gen *Cyt*, *Wnt-5a*, *Hedgehog (HH)*, dan *ADAM 17* diamplifikasi dengan larutan isolasi DNA dari sampel jaringan dengan menggunakan prosedur qPCR, melalui tahapan sintesis DNA, inaktivasi *Reverse transcriptase*, siklus PCR dilakukan 40 siklus dengan suhu anealling pada suhu 57°C untuk gen *HH*, *Wnt-5a*, dan *ADAM 17*, serta suhu annealing 55°C untuk gen *Cyt-c* dan *18S rRNA*, dan selanjutnya tahap *melting curve*. Gen *18srRNA* digunakan sebagai gen referens. Kontrol negatif digunakan air bebas nuklease sebagai pengganti RNA untuk menyingkirkan hasil positif palsu. Dari hasil qRT-PCR diperoleh nilai efisiensi dan *Cycle Treshold (CT)*. Analisis ekspresi gen dinilai secara *relatif quantification* sehingga diperoleh nilai kadar relatif ekspresi mRNA dengan menggunakan metode Livak.

### Analisis Statistik

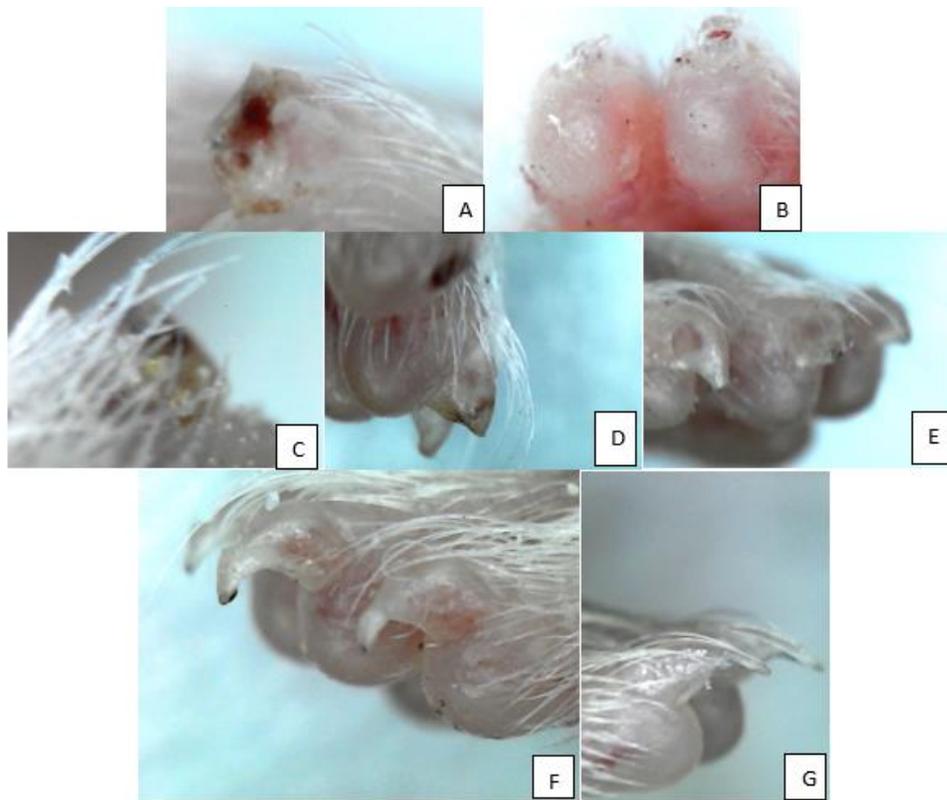
Analisis statistik dengan uji Kolmogorov smirnov dilakukan uji normalitas data. Jika tidak memenuhi standar tersebut dilakukan transformasi data dan dilakukan kembali uji normalitas. Jika data yang diperoleh ternyata homogen dan normal

maka dilakukan uji parametrik. Sebaliknya jika data yang telah ditransformasi masih berdistribusi tidak normal maka digunakan uji non parametrik. Dilakukan uji homogenitas dengan uji ANOVA, karena data bersifat non parametrik dan untuk uji korelasi digunakan uji korelasi Spearman.

### Hasil

#### Pertumbuhan ujung jari kaki mencit (*Mus musculus*)

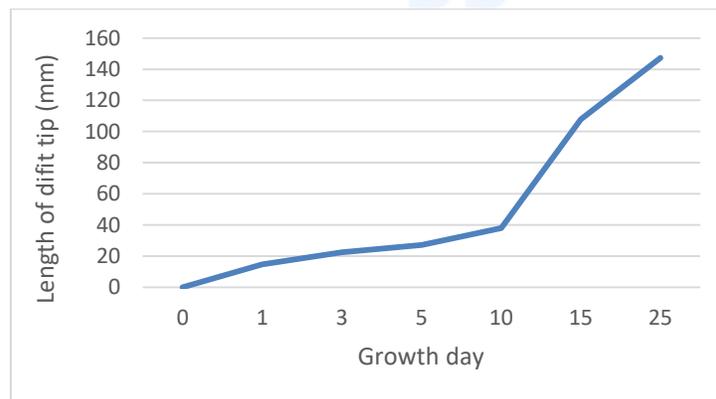
Pertumbuhan digit tip mice (*Mus musculus*) setelah amputasi (gambar 2), menghasilkan pertumbuhan jaringan yang terus tumbuh sehingga pada hari ke 25 pertumbuhan jaringan sama dengan kontrol. Pada hari ke 0 dan ke 1 belum tampak adanya pertumbuhan jaringan, diperkirakan merupakan jaringan yang mengalami inflamasi. Pada hari ke 3 sampai ke 10, tampak adanya jaringan yang tumbuh dari area luka merupakan hasil pembelahan sel yang belum membentuk jaringan yang sesungguhnya. Hari ke 15 dan 25, jaringan baru yang terbentuk terlihat nyata dan telah membentuk jaringan kuku.



Gambar 2. Pertumbuhan jari kaki mencit (*Mus musculus*) dari hari ke 0 sampai hari ke 25: (A) Jari kaki pada hari ke 0 (4 jam setelah amputasi) (B) 1 hari setelah amputasi (C) 3 hari setelah amputasi (D) 5 hari setelah amputasi (E) 15 hari setelah amputasi (F) 25 hari setelah amputasi (G) kontrol

Pada gambar 3 tampak adanya kurva pertumbuhan jaringan digit tip mice yang tumbuh lambat pada hari ke 0 (4 jam setelah amputasi)

sampai hari ke 10 setelah amputasi. Setelah hari ke 10, garis kurva tampak meningkat dengan tajam sampai hari ke 25.

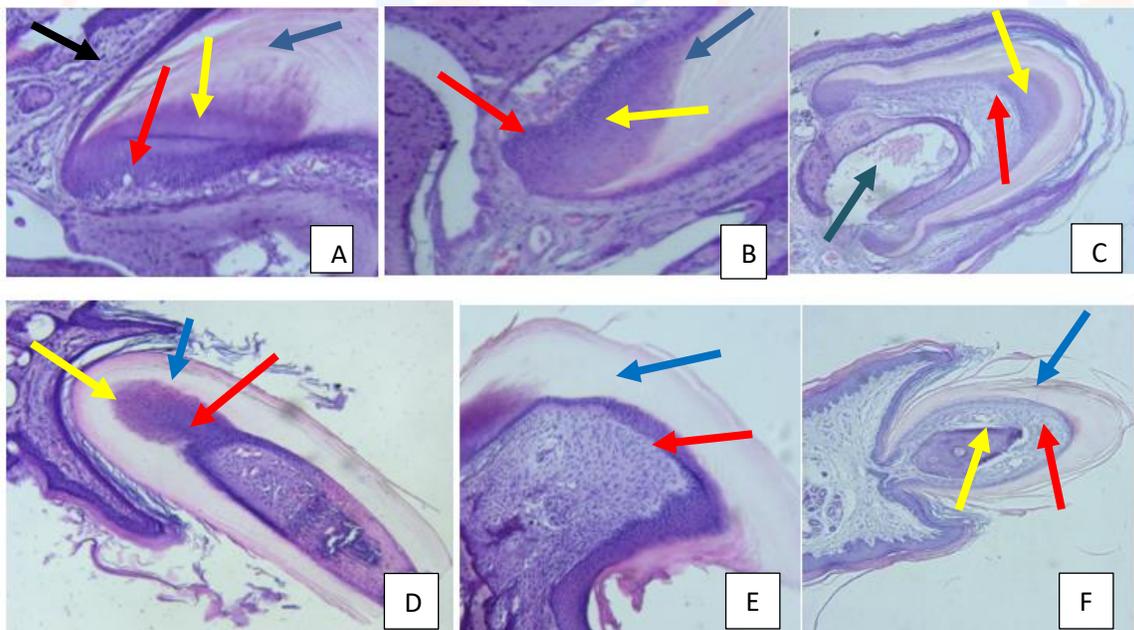


Gambar 3. Kurva pertumbuhan jaringan digit tip mencit (*Mus musculus*) dari hari ke 0 (4 jam setelah amputasi) sampai hari ke 25. Garis kurva meningkat dengan lambat mulai hari ke 0 sampai hari ke 10, dan meningkat tajam setelah hari ke 10.

### Hasil perwarnaan histologi konvensional

Hasil pengamatan histologi jaringan pertumbuhan digit tip mice (*Mus musculus*) tampak adanya aktivitas sel dan perubahan bentuk jaringan (Gambar 4). Pada hari ke 0 (4 jam setelah amputasi) dan hari ke 1 tampak pada area luka didominasi oleh sel darah putih. Pada hari ke 5

dan 10 mulai tampak pembelahan sel punca sehingga jaringan semakin luas, namun belum terbentuk jaringan baru. Pada hari ke 15 dan 25, tampak terbentuk jaringan baru membentuk jaringan kuku, jaringan epidermis, dermis, jaringan ikat, serta jaringan tulang.

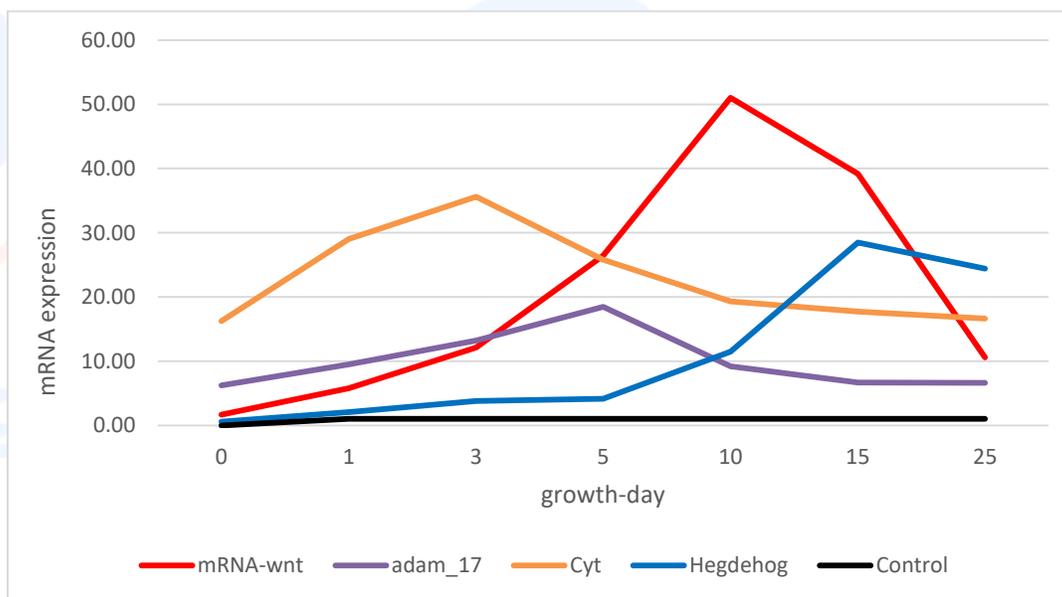


Gambar 4. Histologi pertumbuhan jaringan digit tip mice (*Mus musculus*) dari hari ke 0 (4 jam setelah amputasi) sampai hari ke 25 (A) pertumbuhan jaringan digit tip mice hari ke 0, proliferasi sel punca osteoblast (panah merah), sel mesenkim (panah kuning), jaringan tulang rawan (panah biru), sel fibroblast (panah hitam) (B) Jaringan pada hari ke 1, jaringan tulang rawan tumbuh mendesak ke bawah (panah biru), sel mesenkim (panah kuning), sel osteoblast (panah merah) (C) pertumbuhan jaringan hari ke 5, jaringan epitel menutup area luka (panah hitam), sel mesenkim terus bermigrasi ke ujung jaringan (panah kuning), sel osteoblast pada dasar dari jaringan (panah merah), tampak mulai pembentuk area bakal sumsum tulang (D) pertumbuhan jaringan hari ke 10, tulang rawan tumbuh terus membentuk kuku baru (panah biru), area osteoblast (panah merah) dan sel mesenkim (panah kuning) semakin menyempit (E) pertumbuhan jaringan hari ke 15, tulang rawan membentuk jaringan kuku baru semakin luas (panah biru), area sel embryonal semakin menyempit (panah merah) (F) pertumbuhan kuku sudah semakin terlihat jelas bentuknya (panah biru), area embryonal semakin menyempit (panah merah), mulai tampak terlihat sumsum tulang (panah kuning), jaringan pada hari ke 25 lebih lengkap (perbesaran 10 x 40).

### mRNA gene expression

Hasil perhitungan secara relative kuantitatif terhadap kontrol menghasilkan ekspresi gen yang berbeda pada setiap tahap regenerasi jaringan (Gambar 5). Pada fase inflamasi gen Cyt dan ADAM 17 relatif tinggi dibandingkan kontrol. Ekspresi gen Cyt meningkat dan mencapai puncaknya pada hari ke 3 setelah amputasi. Sedangkan gen ADAM 17

mencapai puncaknya pada hari ke 5 dan ekspresinya menurun setelah hari ke 10. Ekspresi gen ADAM 17 ini relative lebih rendah dibandingkan ekspresi gen lainnya. Gen Wnt-5a meningkat ekspresinya pada hari ke 10 dan menurun tajam setelah hari ke 25. Sedangkan gen HH mencapai puncaknya pada hari ke 15 dan ekspresinya tetap tinggi pada hari ke 25.

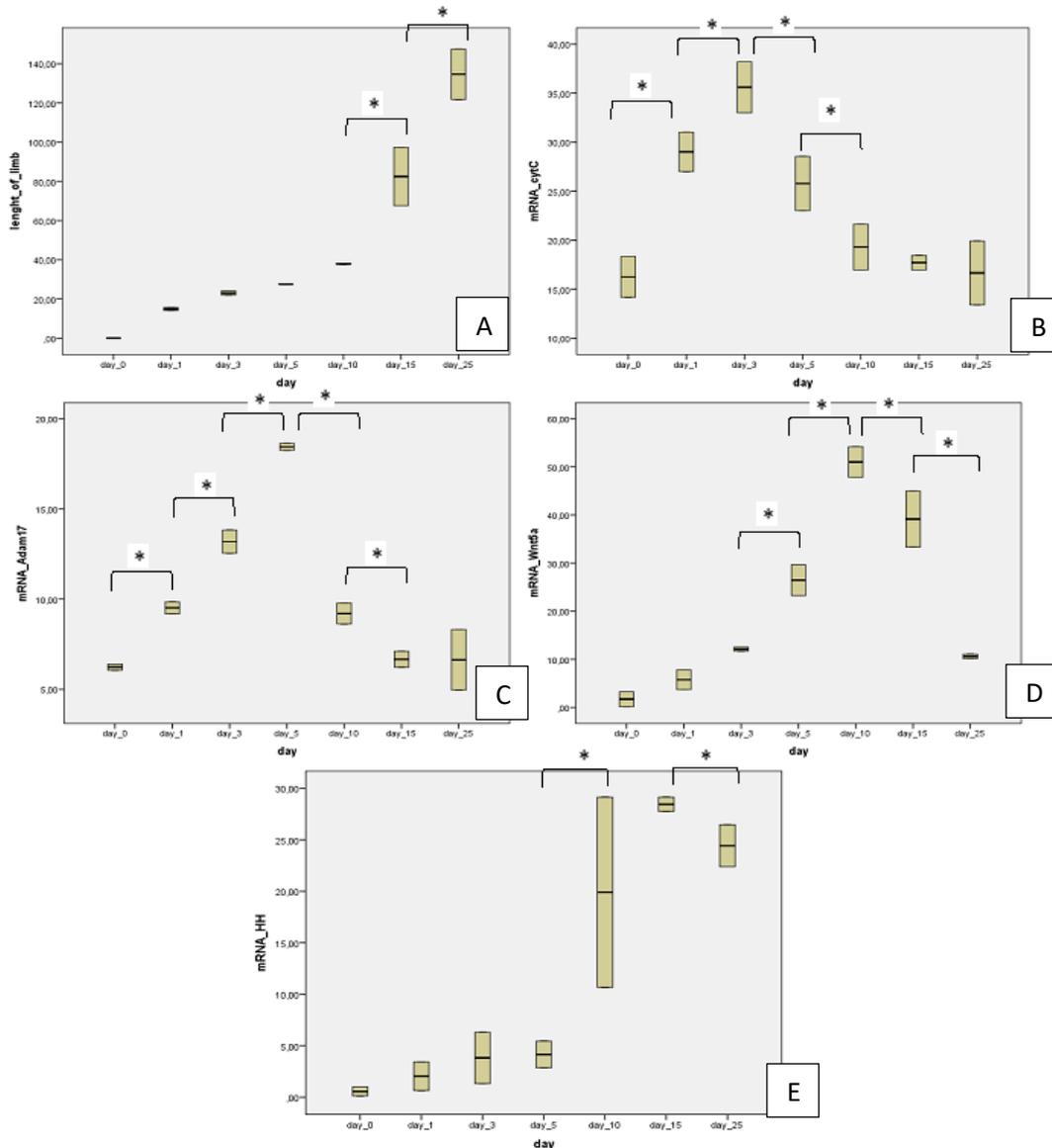


Gambar 5. Ekspresi mRNA gen Wnt-5a, gen ADAM17, gen Cyt, dan gen Hedghog (HH) relative terhadap kontrol. Ekspresi ke 4 gen tersebut berbeda pada setiap tahap pertumbuhan jaringan.

### Analisis statistic Uji Homogenitas

Pada gambar 6 menunjukkan adanya hasil uji homogenitas data hasil penelitian. Hasil uji homogenitas pertumbuhan panjang digit tip mencit pada setiap hari pertumbuhan menunjukkan adanya suatu perbedaan pertumbuhan jaringan secara nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji ANOVA. Tampak adanya perbedaan pertumbuhan jaringan digit tip antara hari ke 10 dan hari ke 15 serta antara hari ke 15 dengan hari ke 25. Perbedaan ekspresi mRNA gen berbeda secara nyata antara hari ke 0 dengan hari ke 1, antara hari ke 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 3 dengan hari ke 5, antara hari ke 5 dengan hari ke 10. Perbedaan ekspresi mRNA gen Cyt ini

berbeda secara nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji ANOVA. Hasil uji ANOVA perbedaan ekspresi mRNA gen ADAM 17 menunjukkan adanya perbedaan ekspresi secara nyata antara hari ke 0 dengan hari ke 1, antara hari ke 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 3 dengan hari ke 5, serta antara hari ke 5 dengan hari ke 10 ( $p < 0,05$ ). Ekspresi mRNA gen Wnt-5a menunjukkan adanya perbedaan secara nyata dengan uji ANOVA ( $p < 0,005$ ). Perbedaan tersebut tampak pada ekspresi antara hari ke 3 dan 5, antara hari ke 5 dan 10, antara hari ke 10 dan 15, dan antara hari ke 15 dan 25. Ekspresi gen HH terjadi perbedaan sangat nyata ( $p < 0,05$ ) antara hari ke 5 dan hari ke 10, serta antara hari ke 15 dan hari ke 25.



Gambar 6. Uji homogenitas ANOVA yang berbeda secara nyata ( $p < 0,05$ ) (A) Pertumbuhan jaringan digit tip mice (*Mus musculus*) yang berbeda antara hari ke 10 dengan hari ke 15 serta antara hari ke 15 dengan hari ke 25 (\*) (B) Ekspresi mRNA gen Cyt yang berbeda antara hari ke 0 dengan hari ke 1, antara hari 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 3 dengan hari ke 5, serta antara hari ke 5 dengan hari ke 10 (\*) (C) Ekspresi mRNA gen ADAM 17 yang berbeda antara hari ke antara hari ke 0 dengan hari ke 1, antara hari ke 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 3 dengan hari ke 5, serta antara hari ke 5 dengan hari ke 10 (\*) (D) ekspresi mRNA gen Wnt-5a berbeda antara hari ke 3 dan 5, antara hari ke 5 dan 10, antara hari ke 10 dan 15, dan antara hari ke 15 dan 25 (\*) (E) Ekspresi mRNA gen HH berbeda antara hari ke 5 dan hari ke 10, serta antara hari ke 15 dan hari ke 25 (\*)

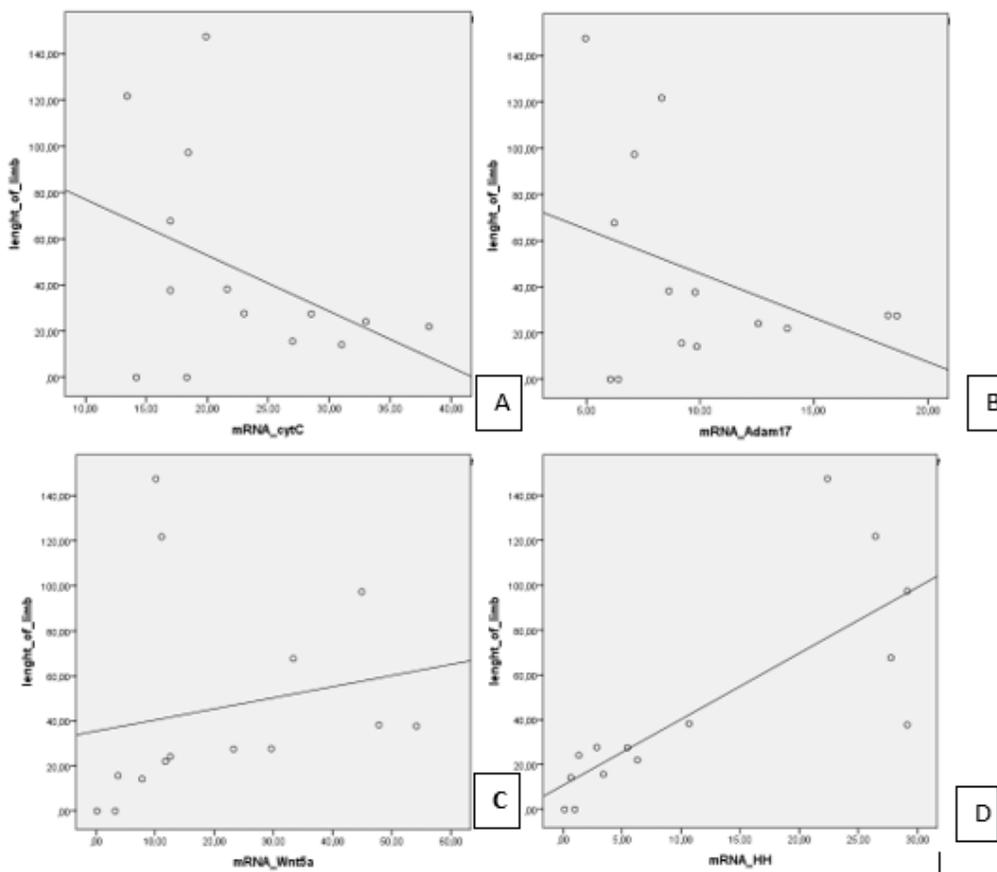
**Uji korelasi**

Hasil uji korelasi Spearman menunjukkan bahwa antara ekspresi mRNA gen Cyt dengan panjang pertumbuhan digit tip mice serta antara ekspresi

mRNA gen ADAM 17 dengan pertumbuhan panjang digit tip mice, tidak terjadi korelasi. Hasil uji korelasi Spearman menunjukkan hasil uji  $p > 0,05$  dan nilai korelasi kecil dan negative. Uji

korelasi Spearman antara panjang pertumbuhan digit tip mice dengan ekspresi mRNA Wnt-5a menunjukkan adanya korelasi nyata ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,598$ ) yang bersifat sedang. Sedangkan uji korelasi antara Spearman antara panjang pertumbuhan jaringan digit tip mice dengan

ekspresi mRNA gen HH menunjukkan adanya korelasi nyata yang bersifat kuat ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,837$ ).



Gambar 7. Uji korelasi Spearman (A) Uji korelasi antara panjang dengan ekspresi mRNA gen Cyt ( $p > 0,05$ ) (B) Uji korelasi antara panjang pertumbuhan digit tip mice dengan ekspresi mRNA gen ADAM 17 ( $p < 0,05$ ) (C) Uji korelasi antara panjang pertumbuhan digit tip mice dengan ekspresi mRNA Wnt-5a ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,598$ ) (D) uji korelasi antara panjang pertumbuhan jaringan digit tip mice dengan ekspresi mRNA gen HH ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,837$ ).

### Pembahasan

Pertumbuhan jaringan digit tip mice (*Mus musculus*) menunjukkan adanya pertumbuhan yang secara significant berbeda pada setiap fasa. Pertumbuhan pada fase wound healing terjadi sangat lambat, hasil analisa histologi pada jaringan tampak adanya proliferasi sel dan migrasi sel. Menurut Meschner, pada fase wound healing terjadi proses inflamasi, granulasi, proliferasi sel dan migrasi sel karea pada fase ini terjadi proses kontraksi luka. Pada fase ini jaringan belum

membentuk jaringan baru, tetapi terjadi proses pembersihan jaringan pada area luka dari infeksi bakteri dan sel yang rusak. Sel embryonal akan mengalami proliferasi sel dan migrasi sel sebagai persiapan pembentuk jaringan baru. Pada fase ini, area luka mulai tertutup oleh lapisan epidermis dan dermis baru, sehingga pada jaringan digit tip mice proliferasi sel embryonal tampak lebih aktif. Jaringan tulang rawan bakal pembentuk kuku tampak meluas dan bermigrasi melingkupi jaringan lainnya dan mendominasi jaringan digit tip mice. Hasil penelitian

menggunakan jaringan digit tip mice, tampak adanya proliferasi sel embryonal yang sangat aktif membentuk bakal jaringan epidermis, dermis, jaringan ikat, dan pembentukkan bakal pembuluh darah baru.

Pada fase inflamasi regenerasi jaringan digit tip mice, tampak adanya beberapa sel leukosit pada area luka yang menunjukkan terjadinya inflamasi pada area tersebut. Protein ADAM 17 yang terletak pada permukaan sel diduga memiliki peran dalam fase inflamasi, ditunjukkan dengan tingginya ekspresi gen tersebut pada fase inflamasi. Ekspresi ini menurun setelah fase inflamasi berakhir. Hasil uji analisis statistic menunjukkan tidak ada korelasi ekspresi gen tersebut dengan pertumbuhan regenerasi jaringan digit tip mice. Hingga kini peranan gen tersebut dalam proses inflamasi masih belum jelas, namun letal gen ADAM17 mengakibatkan kerusakan pada sel neutrofil selama proses inflamasi.

Pada proses regenerasi jaringan digit tip mice tampak aktivitas sel yang sangat tinggi melakukan proliferasi, diferensiasi, dan migrasi sel. Aktivitas sel yang sangat tinggi ini memerlukan energi yang sangat tinggi dan aktivitas respirasi sel yang sangat tinggi pula. Protein Cytochrome-c (Cyt-c) merupakan protein yang terdapat pada inner membrane mitokondria yang berperan menangkap electron pada rantai respirasi dan berperan menangkal dan menghambat terjadinya stress oksidatif. Pada proses regenerasi jaringan digit tip mice, ekspresi mRNA gen Cyt-c relative tinggi pada tahap inflamasi dan granulasi pada fase wound healing. Hal tersebut terjadi karena pada fase wound healing terjadi peningkatan aktivitas sel agositosis sel leukosit, proliferasi dan migrasi sel punca, oleh karena pada fase tersebut terjadi peningkatan respirasi sel dan sejalan dengan peningkatan ekspresi mRNA gen Cyt-c. Namun, hasil uji korelasi antara pertumbuhan digit tip dengan ekspresi gen mRNA Cyt tidak terjadi korelasi, hal ini mungkin dikarenakan ekspresi protein tersebut tidak secara langsung berdampak pada proses regenerasi. Ekspresi gen Cyt tetap bertahan dan relative tinggi dibandingkan kontrol sampai hari ke 25, hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas proses regenerasi jaringan memerlukan energi dan terjadi respirasi sel. Menurut Osuma, selama proses regenerasi jaringan, peningkatan kebutuhan

energi meningkat selama proses regenerasi jaringan.

Setelah hari ke 10, pada jaringan histologi digit tip mice tampak adanya sel embryonal yang terkumpul menjadi satu membentuk blastema yang akan membentuk jaringan baru. Menurut Alibardi, blastema akan membentuk suatu kuncup yang berisi sel punca yang akan berdiferensiasi membentuk jaringan baru. Pembentukkan jaringan baru akan tumbuh terus menyebabkan pertumbuhan jaringan digit tip mice tumbuh sangat cepat. Kurva pertumbuhan memperlihatkan garis yang meningkat tajam sampai hari ke 25. Pada pengamatan histologi tampak pertumbuhan lapisan epidermis, dermis, tulang rawan yang membentuk kuku baru, serta jaringan ikat muncul membentuk kembali jaringan digit tip yang baru seperti semula. Menurut Meschner, pada fase regenerasi dan maturase ini aktivitas sel meningkat untuk melakukan diferensiasi sel dan membentuk sel baru sehingga terbentuk jaringan baru.

Protein Wnt-5a merupakan protein yang memiliki peran dalam proses proliferasi sel, pembentukan sel, migrasi sel, serta diferensiasi sel membentuk jaringan baru. Pada regenerasi jaringan digit tip mice ini, ekspresi mRNA Wnt-5a mulai meningkat tajam pada hari ke 3 dan mencapai puncaknya pada hari ke 10 saat pembentukkan blastema. Ekspresi ini masih tetap dipertahankan relative tinggi dibandingkan kontrol dan relative lebih tinggi dibandingkan ekspresi mRNA gen lainnya pada fase regenerasi. Tingginya ekspresi mRNA gen Wnt-5a ini diduga berkaitan dengan perannya dalam proses proliferasi, diferensiasi, pembentukkan bentuk sel, dan migrasi sel pada proses regenerasi jaringan digit tip mice. Hasil uji korelasi menunjukkan adanya korelasi nyata dan significant dengan pertumbuhan jaringan digit tip mice. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen Wnt-5a memiliki peran dalam proses regenerasi jaringan digit tip mice.

Demikian pula halnya dengan gen Hedgehog (HH) yang memiliki peran dalam mengatur proses proliferasi spesifikasi bentuk sel dan morfogenesis pada proses regenerasi jaringan organisma dewasa. Gen HH memiliki peran meneruskan sinyal ke populasi sel punca pada berbagai organ sehingga proses regenerasi itu terjadi. Pada proses regenerasi jaringan digit tip

mice tampak ekspresi gen tersebut muncul pada hari ke 10 saat fase blastema dimulai, dan ekspresi ini mencapai puncaknya pada fase regenerasi. Hasil uji korelasi antara pertumbuhan panjang digit mice dengan ekspresi mRNA HH terjadi korelasi nyata dan kuat. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen HH memiliki peran dalam proses pembentukan digit tip mice yang baru.

Dinamikan ekspresi gen Cyt, ADAM 17, Wnt-5a, dan gen HH seperti orchestra yang memiliki perannya masing-masing pada setiap fase namun berpadu dan saling bergantian peran sehingga menghasilkan jaringan digit tip mice yang baru. Saat jaringan dalam keadaan inflamasi gen ADAM17 muncul untuk mengatasi keadaan tersebut, setelah inflamasi terlewati gen Wnt-5a mulai menunjukkan perannya dalam proliferasi sel, diferensiasi sel, dan migrasi sel. Gen HH muncul tak lama dari gen Wnt-5a dengan peran yang sama namun mengakhiri orchestra ini dengan memperindah bentuk jaringan dan organ. Keseluruhan orchestra ini memerlukan energi yang tidak sedikit, maka respirasi sel harus tetap berlangsung dari mulai proses ini dimulai sampai berakhirnya proses tersebut, maka gen Cyt-c yang berperan dalam respirasi sel tetap dipertahankan dari awal hingga akhir dan mencapai puncaknya saat proses ini memerlukan energi tertinggi pada fase blastema.

Hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk langkah selanjutnya dalam stimulasi regenerasi jaringan dewasa yang memiliki kemampuan regenerasi jaringan yang terbatas. Dalam upaya stimulasi regenerasi jaringan dewasa, maka kita harus berupaya menstimulasi ekspresi gen yang berperan mengatasi inflamasi, gen yang berperan menyediakan energi, serta gen yang berperan dalam proses proliferasi, diferensiasi, migrasi sel, dan morfogenesis jaringan.

### Kesimpulan

Ekspresi gen Cyt, ADAM 16, Wnt-5a, dan HH membentuk suatu dinamika yang menarik dengan fungsinya masing-masing pada setiap fase pertumbuhan jaringan, namun saling bersinergi sehingga terbentuk kembali jaringan dan organ yang utuh.

### Ucapan terima kasih

Terimakasih kepada kementerian riset dan teknologi Pendidikan tinggi (Kemenristek DIKTI) atas hibah penelitian PKPT yang diberikan untuk pendanaan tahun 2019-2020. Ucpan terimakasih disampaikan kepada Universitas Sumatera Utara atas kerjasamanya dalam penelitian ini. Terimakasih tak terhingga kepada Litbangkes RI atas kerjasamanya dalam pemeliharaan mencit selama penelitian berlangsung.

### Daftar Pustaka

- [1] Krafts KP. The hidden drama Tissue repair. *Organogenesis*. 2010;6(4):225–33.
- [2] Nakatani Y, Kawakami A, Kudo A. Cellular and mollecular processes of regeneration with special emphasis on fish fins. *Dev growth Differ*. 2007; 49: 145-54.
- [3] Marrero L, Simkin J, Sammarco M & Muneoka K. Fibroblast reticular cells engineer a blastema extracellular network during digit tip regeneration in mice. *Wiley Regeneration*. 2017; 4: 69-84. DOI:10.1002/reg2.75.
- [4] Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Wiley regeneration*. 2017; 4:9-53. DOI: 10.1002/reg2.77.
- [5] Calve S & Simon H. Biochemical and mechanical environment cooperatively regulate skeletal muscle regeneration. *The FASEB Journal*. 2012: 2538-2548
- [6] Fernando WA, Leininger E, Simkin J, Li N, Malcolm CA, Sathyamoorthi S, Han M, & Muneoka K. Wound Healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Developmental Biology*. 2011;350: 301-310
- [7] Pintoa R, Godwina JW, Alexander R & Rosenthala NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. 2013. *PNAS*; vol. 110 (no. 23): 9415–9420
- [8] Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*. 2014. 141: 3445-3457. doi:10.1242/dev.083691
- [9] Schnapp E, Kragl M, Rubin L, Tanaka EM. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and

- cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development*. 2005. 132 (14): 3243-3253.
- [10] Simkin J, Han M, Yu L, Yan M & Muneoka K. The Mouse Digit Tip: From Wound Healing to Regeneration. Article in *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) Source: PubMed. 2013: 414-435. DOI: 10.1007/978-1-62703-505-7\_24
- [11] Wynn TA & Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016; 44: 450-462.
- [12] Panigrahy D, Kalisha BT, Huang S, Bielenberga DR, Lea HD, Yang J, Edini ML et al. Epoxyeicosanoids promote organ and tissue regeneration. *PNAS*. 2013; vol. 110 (33): 13528–13533.
- [13] The blastema and epimorphic regeneration in mammals Ashley W. Seiferta\*, Ken Muneokab, *Developmental Biology* 433 (2018) 190–199
- [14] Guedelhofer OC and Alvarado AS. Amputation induces stem cell mobilization to sites of injury during planarian regeneration. *Development*. 2012;139(19): 3510-3520. DOI: 10.1242/dev.082099.
- [15] Lozito TP and Tuan RS. Lizard tail skeletal regeneration combines aspects of fracture healing and blastema-based regeneration. *Development*. 2016; 143(16):2946–2957. DOI: 10.1242/dev.129585
- [16] Londono R, Wenzhong W, Wang B, Tuan RS. Cartilage and Muscle Cell Fate and Origins during Lizard Tail Regeneration. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*. 2017; 5(70):1–9. DOI: 10.1242/dev.129585.
- [17] Reinke JM and Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 2012; 49(1):35-43. DOI: 10.3390/ijms15011647.
- [18] Shi X and Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes and Development*. 2006; 20(13): 1692-1708. DOI: 10.1101/gad.1419406
- [19] Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. 2017;(March):39–53.
- [20] Guedelhofer OC and Alvarado AS. Amputation induces stem cell mobilization to sites of injury during planarian regeneration. *Development*. 2012;139(19): 3510-3520. DOI: 10.1242/dev.082099.
- [21] Novianti T, Juniantito V, Jusuf AA, Arida EA, Jusman SA, Sadikin M. Expression and role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in tissue regeneration: a study of hypoxia in house gecko tail regeneration. *Organogenesis*. 2019. 15(3): 69-84. DOI: 10.1080/15476278.2019.1644889.
- [22] Tahrin Mahmood P-CY. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *Nam J Med Sci*. 2012;4(9):429–34.
- [23] Ramadhani D, Kurnia I, Soetopo S, Tetriana D, Ramli I, Budiningsih, Andrijono, Kurjana T, Tobing MDL. Analisis Serta Stitching Citra Imunohistokimia Mib-1 Dengan Immunoratio dan perangkat lunak Nish Element. *Lokakarya komputansi dala sains dan Teknologi Nuklir*. 2012;(October): 187-97.