

SKRIPSI SARJANA FARMASI

**UJI TOKSISITAS AKUT DERMAL SEDIAAN PATCH YANG MENGANDUNG
SEKRETOM MSC (*MESENCHYMAL STEM CELLS*)
PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**



Oleh :

EDU PANDE RAJA

NIM: 2211012065

Dosen Pembimbing:

apt. Fithriani Armin, S.Si, M.Si

Prof. apt. Marlina, M.S., Ph.D

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

2026

**UJI TOKSISITAS AKUT DERMAL SEDIAAN PATCH YANG MENGANDUNG
SEKRETOM MSC (*MESENCHYMAL STEM CELLS*)
PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Oleh :



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2026**

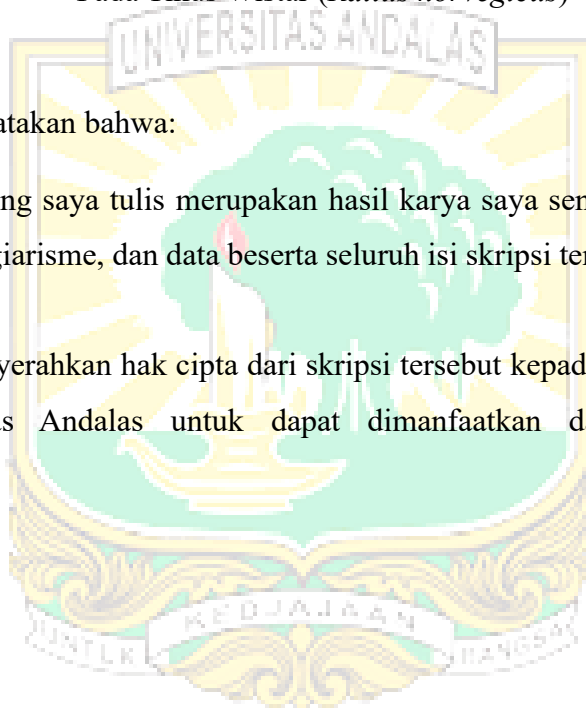
PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Edu Pande Raja
Nomor BP : 2211012065
Judul Skripsi : Uji Toksisitas Akut Dermal Sediaan Patch Yang
Mengandung Sekretom MSC (*Mesenchymal Stem Cells*)
Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri, terhindar dari unsur plagiarisme, dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya.
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis.



Padang, Mei 2026

Edu Pande Raja

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh Seminar Hasil Penelitian Program Sarjana (S1) Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Nama : Edu Pande Raja

No. BP : 2211012065

Judul Skripsi : Uji Toksisitas Akut Dermal Sediaan Patch Yang Mengandung Sekretom MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)



Disetujui oleh :

Pembimbing I,

Pembimbing II,

apt. Fithriani Armin, S.Si, M.Si
NIP. 197611142006042002

Prof. apt. Marlina, M.S., Ph.D
NIP. 196203111989012001

LEMBAR PERTAHANAN

Proposal Penelitian Tugas Akhir ini telah Diperbaiki Sesuai Masukan Pembahas
Seminar Proposal Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Pada : 9 Februari 2026

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. apt. Dwisari Dillasamola, M.Farm	Ketua	
2	Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M.Si	Pembahas	
3	Dr. apt. Rustini, M.Si	Pembahas	
4	apt. Fithriani Armin, S.Si, M.Si	Pembimbing 1	
5	Prof. apt. Marlina, M.S, Ph.D	Pembimbing 2	

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan YME yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya yang tanpa kekuatan, petunjuk, dan rencana-Nya, penulis tidak akan sampai ke titik ini. Segala kemudahan di tengah kesulitan, segala jalan di tengah kebuntuan adalah bukti bahwa tiada daya dan upaya selain dengan pertolongan-Nya. Skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Dermal Sediaan Patch yang Mengandung Sekretom MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)” ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Andalas.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis tidak terlepas dari dukungan, doa, dan semangat dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan penuh rasa syukur dan hormat, penulis ingin mengungkapkan apresiasi dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu apt. Fithriani Armin, S.Si, M.Si selaku pembimbing I dan Prof. apt. Marlina, M.S., Ph.D selaku pembimbing II yang dengan penuh kesabaran telah membimbing, mengarahkan, dan mendukung, memberi semangat serta motivasi kepada penulis selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Dr. apt. Dwisari Dillasamola, M.Farm, Bapak Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M.Si, dan Ibu Dr. apt. Rustini, M.Si selaku dosen pembahas yang telah memberikan masukan dan saran kepada penulis selama proses penyusunan skripsi.
3. Ibu apt. Nova Syafni, M.Si., Ph.D selaku dosen penasehat akademik yang telah membimbing penulis selama menempuh pendidikan di jurusan Farmasi.
4. Bapak dan Ibu dosen, analis laboratorium, dan seluruh keluarga besar Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu, bantuan, dan dukungan selama masa perkuliahan.

5. Kedua orang tua tercinta (Ibu Marti Diana Sitanggang dan Bapak Paulus Abidin Tampubolon) yang selalu memberikan doa, dukungan, kepercayaan, dan cinta yang tidak henti diberikan. Semua usaha dan pengorbanan yang telah diberikan menjadi motivasi bagi penulis untuk terus berjuang dan menyelesaikan tanggung jawab dalam pendidikan.
6. Keluarga BP 04 khususnya sobep (Indah, Veki, dan Ausza) yang telah menjadi keluarga kecil yang menemani penulis dalam sibuk nya kehidupan farmasi.
7. Teman-teman seperjuangan INA-LAB (Fakhri, Rafid, Adam, Lusi, Jihan, Zahra, dan Rahma) yang telah berjuang bersama penulis melakukan penelitian.
8. Kepada UKMF PHASPORT.COM yang telah menjadi wadah penulis untuk mengembangkan diri selama perkuliahan.
9. Rekan-rekan Angkatan 2022 “PROGREZZIO” terutama PGZ Boys (Najib, Adit, Fakhri Putra, Rezy, Fakhri Yusuf, Yogi, Fares, Habib, Devan, Dhafa, Rafid, Arif, Rahil, Yudis, Adam, Farhan, Zidane, Rian, Sulthan, Shiddiq, Jelang, dan Said) yang telah berjuang bersama dari awal perkuliahan sampai saat ini.

Akhir kata penulis sekali lagi mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Tuhan YME membalas setiap kebaikan dengan keberkahan yang berlimpah. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk kesempurnaan skripsi ini. Penulis juga berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Padang, Mei 2026
Penulis

Edu Pande Raja

ABSTRAK

UJI TOKSISITAS AKUT DERMAL SEDIAAN PATCH YANG MENGANDUNG SEKRETOM MSC (*MESENCHYMAL STEM CELLS*) PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)

Oleh:
EDU PANDE RAJA
NIM: 2211012065
(Program Studi Sarjana Farmasi)

Sekretom *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) merupakan kumpulan molekul bioaktif yang berperan dalam regenerasi jaringan, modulasi inflamasi, dan penyembuhan luka. Sekretom MSC memiliki komponen biokatif seperti sitokin, faktor pertumbuhan dan vesikel ekstraseluler. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati tanda klinis toksisitas akut dermal, perubahan berat badan, dan mortalitas pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) selama 14 hari periode pengamatan setelah pemberian sediaan *patch* yang mengandung sekretom MSC. Pengujian toksisitas akut dermal secara *in vivo* ini mengacu pada Peraturan BPOM Nomor 10 Tahun 2022 dan OECD Test Guideline 402 dengan kelompok dosis 200 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB. Sekretom MSC diperoleh melalui proses kultur *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells* (ADMSC) menggunakan media pertumbuhan DMEM pada *passage* 5, kemudian diformulasikan dalam sediaan *patch* film menggunakan metode *solvent casting*. Hasil evaluasi menunjukkan seluruh formula *patch* film memiliki penampilan bening, tidak berbau, ketebalan kurang dari 1 mm, daya lipat diatas 300 kali, pH rentang 7,1 – 7,4, persentase elongasi diatas 30%, dan nilai tensile strength diatas 1 N/mm². Hasil pengujian toksisitas akut dermal menunjukkan tidak ditemukan kematian maupun tanda klinis toksisitas sampai dengan dosis tertinggi (2000 mg/kgBB). Nilai *Primary Irritation Index* (PII) yang diperoleh adalah 0, dikategorikan tidak mengiritasi dan terdapat penurunan berat badan yang melebihi 10% dari nilai awal pada seluruh tingkatan dosis uji. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa sediaan *patch* film yang mengandung sekretom MSC bisa digunakan untuk pengobatan dermal akut dan dinyatakan aman secara toksikologis.

Kata Kunci: Sekretom, *Mesenchymal Stem Cells*, toksisitas akut dermal, *patch* film

ABSTRACT

ACUTE DERMAL TOXICITY TEST OF PATCH FORMULATION CONTAINING MESENCHYMAL STEM CELL (MSC) SECRETOME IN WISTAR RATS (*Rattus norvegicus*)

By:
EDU PANDE RAJA
Student ID Number: 2211012065
(Bachelor of Pharmacy)

Mesenchymal Stem Cell (MSC) secretome is a collection of bioactive molecules that play roles in tissue regeneration, inflammation modulation, and wound healing. MSC secretome contains bioactive components, including cytokines, growth factors, and extracellular vesicles. This study aimed to observe clinical signs of acute dermal toxicity, changes in body weight, and mortality in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) during a 14-day observation period following the administration of a patch formulation containing MSC secretome. The in vivo acute dermal toxicity test was conducted in accordance with BPOM Regulation Number 10 of 2022 and OECD Test Guideline 402, using dose levels of 200 mg/kg body weight, 1000 mg/kg body weight, and 2000 mg/kg body weight. MSC secretome was obtained through the culture of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) as the growth medium at passage 5, and was subsequently formulated into a film patch using the solvent casting method. The evaluation results showed that all film patch formulations had a clear appearance, were odorless, had a thickness of less than 1 mm, a folding endurance of more than 300 folds, a pH ranging from 7.1 to 7.4, an elongation percentage of more than 30%, and a tensile strength of more than 1 N/mm². The acute dermal toxicity test results showed no mortality or clinical signs of toxicity up to the highest tested dose of 2000 mg/kg body weight. The Primary Irritation Index (PII) value was 0, indicating that the formulation was classified as non-irritating. However, a decrease in body weight exceeding 10% of the initial body weight was observed at all tested dose levels. Based on these results, the film patch formulation containing MSC secretome can be considered suitable for acute dermal application and was considered toxicologically safe under the conditions of this study.

Keywords: Secretome, Mesenchymal Stem Cells, acute dermal toxicity, film patch

DAFTAR ISI

PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERTAHANAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesa Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kulit	5
2.1.1 Definisi Kulit	5
2.1.2 Struktur Kulit	5
2.1.3 Jalur Penetrasi Zat Melalui Kulit.....	8
2.1.4 Absorpsi Perkutan.....	9
2.2 Sel Punca	10
2.2.1 Definisi Sel Punca.....	10
2.2.2 Karakteristik Sel Punca.....	11
2.2.3 Jenis-jenis Sel Punca.....	11
2.2.4 Sel Punca Mesenkimal.....	14
2.3 Sekretom	15
2.3.1 Definisi Sekretom	15
2.3.2 Komponen sekretom	15
2.3.3 Kelebihan Sekretom.....	16
2.4 Kultur Sel	16
2.4.1 Definisi Kultur Sel	16
2.4.2 Subkultur.....	17
2.4.3 <i>Thawing cell</i>	17

2.4.4	Lingkungan dan kondisi kultur sel.....	17
2.5	Sistem Pengantaran Obat	18
2.6	<i>Patch Film</i>.....	18
2.6.1	Definisi <i>Patch Film</i>	18
2.6.2	Jenis <i>Patch</i>	19
2.6.3	Keuntungan dan Kekurangan <i>Patch</i>	20
2.6.4	Bahan Tambahan <i>Patch</i>	21
2.6.5	Metode Pembuatan <i>Patch</i>	23
2.7	Metode <i>In Vivo</i>	25
2.7.1	Definisi Metode <i>In Vivo</i>	25
2.7.2	Kelebihan dan Kekurangan Metode <i>In Vivo</i>	25
2.7.3	Tikus Putih	25
2.8	Toksisitas.....	26
2.8.1	Definisi Toksisitas.....	26
2.8.2	Klasifikasi Toksisitas	26
2.8.3	Toksisitas Akut Dermal.....	29
2.8.4	Gejala Toksisitas Dermal	30
III.	METODE PENELITIAN	32
3.1	Waktu dan Tempat	32
3.2	Alat dan Bahan	32
3.2.1	Alat.....	32
3.2.2	Bahan	32
3.3	Prosedur Kerja.....	33
3.3.1	Penyiapan media kultur	33
3.3.2	<i>Thawing Sel</i>	33
3.3.3	Perbanyakkan kultur sel.....	33
3.3.4	Pengumpulan sekretom.....	34
3.3.5	Formulasi Sediaan <i>Patch Film</i>	34
3.3.6	Pembuatan <i>Patch</i> Sekretom	34
3.3.7	Uji Toksisitas Sediaan.....	35
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	39
V.	KESIMPULAN	53
5.1	Kesimpulan.....	53
5.2	Saran	53
	DAFTAR PUSTAKA.....	54
	LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Formulasi <i>patch</i> sekretom per 10 gram	34
Tabel 4.1	Hasil evaluasi organoleptis sediaan <i>patch</i> film dalam basis dan berbagai konsentrasi	42
Tabel 4.2	Hasil evaluasi ketebalan, daya lipat dan pH sediaan <i>patch</i> film dalam basis dan berbagai konsentrasi	43
Tabel 4.3	Hasil evaluasi ketahanan mekanik sediaan <i>patch</i> film dalam basis dan berbagai konsentrasi	44
Tabel 4.4	Hasil pengujian penentuan rentang dosis pada tikus wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	47
Tabel 4.5	Hasil pengujian utama kelompok basis, kontrol, dan konsentrasi 2000 mg/kgBB terhadap tikus wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	48
Tabel 4.6	Hasil pengujian indeks iritasi primer kelompok basis, kontrol, dan konsentrasi 2000 mg/kgBB terhadap tikus wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	49
Tabel 4.7	Hasil uji <i>paired t-test</i> dan persentase perubahan berat badan tikus selama 14 hari	52
Tabel 1	Hasil pemeriksaan bahan	59
Tabel 2	Hasil evaluasi <i>patch</i> film	61
Tabel 3	Data berat badan hewan uji pada hasil uji utama	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Lapisan kulit	5
Gambar 2.2	Lapisan epidermis kulit	8
Gambar 2.3	Eritema dan edema pada tikus	30
Gambar 3.1	Bagan uji penentuan rentang dosis	36
Gambar 3.2	Bagan uji utama	36
Gambar 4.1	Grafik berat badan tikus selama masa observasi	51
Gambar 1	Sel yang telah konfluen dilihat dari mikroskop	59
Gambar 2	Pengumpulan sekretom dalam wadah	59
Gambar 3	<i>Patch</i> film dalam proses pengeringan	60
Gambar 4	<i>Patch</i> film yang telah kering dan dipotong menyesuaikan ukuran punggung hewan uji	60
Gambar 5	Aklimatisasi hewan uji hari ke 1	62
Gambar 6	Aklimatisasi hewan uji hari ke 7	62
Gambar 7	Pencukuran bulu hewan uji sehari sebelum pemberian <i>patch</i> film	62
Gambar 8	Pemberian <i>patch</i> film pada hewan uji	62
Gambar 9	Pengamatan hewan uji setelah pemberian <i>patch</i> film hari ke 1 - 14	63
Gambar 10	Sertifikat analisis <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC)	64
Gambar 11	Sertifikat analisis PVA	65
Gambar 12	Sertifikat analisis propilen glikol	66
Gambar 13	Sertifikat kode etik	67
Gambar 14	Skema kerja pengumpulan sekretom	68
Gambar 15	Skema kerja formulasi dan evaluasi <i>patch</i> film	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Hasil Penelitian	59
Lampiran 2	Data Penunjang	59
Lampiran 3	Skema Kerja	60



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kulit merupakan organ terbesar pada tubuh manusia yang memiliki peran penting sebagai *barrier* utama dalam melindungi tubuh dari pengaruh lingkungan eksternal, termasuk paparan zat kimia, mikroorganisme, dan agen fisik. Secara anatomi, kulit tersusun atas tiga lapisan utama, yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis, di mana lapisan *stratum corneum* pada epidermis berfungsi sebagai penghalang utama terhadap penetrasi zat asing. Meskipun demikian, beberapa zat dapat menembus lapisan kulit melalui mekanisme absorpsi dermal dan berpotensi menimbulkan efek lokal maupun sistemik (1). Sehingga menciptakan inovasi pengembangan pengobatan melalui kulit untuk beberapa situasi karena memiliki keuntungan tertentu dibandingkan pemberian obat melalui rute lain. Dalam hal ini, penghantaran obat melalui kulit memiliki beberapa keunggulan seperti dapat menghindari metabolisme *first-pass*, menghasilkan pelepasan obat yang stabil dan terkontrol, serta meningkatkan kenyamanan dan kepatuhan pasien karena mudah diaplikasikan. Hal-hal ini membuat terapi melalui kulit menjadi banyak dikembangkan dalam sistem penghantaran obat yang efektif dan aman (2).

Pengembangan sistem penghantaran obat melalui kulit sudah melalui berbagai inovasi, salah satu nya yaitu berbentuk sediaan *patch* yang mana telah menjadi fokus penting dalam teknologi farmasi modern karena kemampuannya memberikan zat aktif secara kontinu melalui kulit secara non-invasif (3). *Patch* bekerja dengan menempel pada permukaan kulit dan melepaskan zat aktif yang menembus *stratum corneum* menuju jaringan target atau sirkulasi sistemik, sehingga sediaan ini dapat digunakan untuk tujuan terapi lokal maupun sistemik dengan efisiensi yang lebih tinggi dan efek samping yang lebih rendah. Kajian literatur menunjukkan bahwa keberhasilan *patch* sangat dipengaruhi oleh sifat fisikokimia zat aktif serta formulasi pembawanya (4). Sejalan dengan hal tersebut, pada penelitian yang dilakukan Fauzi (2025), sekretom *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) diformulasikan dalam bentuk *patch film* menggunakan metode *solvent casting* dengan polivinil alkohol (PVA) sebagai polimer pembentuk *film* dan propilen glikol sebagai plastisizer. Formulasi dengan PVA 5% dan propilen glikol

10% menghasilkan *patch* yang bening, homogen, memiliki ketebalan yang sesuai, serta sifat mekanik yang baik, ditunjukkan oleh nilai *tensile strength* dan persentase elongasi yang memadai untuk aplikasi topikal. Penambahan sekretom MSC ke dalam formula terpilih tidak mengganggu karakteristik fisik sediaan, sehingga menunjukkan bahwa formulasi *patch* tersebut berpotensi digunakan sebagai sistem penghantaran obat secara topikal (5).

Dalam beberapa tahun terakhir, terapi regeneratif berbasis sel punca berkembang pesat, salah satunya melalui pemanfaatan *Mesenchymal Stem Cells* (MSC). MSC diketahui memiliki kemampuan regeneratif yang signifikan, tidak hanya melalui diferensiasi seluler, tetapi juga melalui mekanisme parakrin (6). Produk parakrin utama dari MSC dikenal sebagai sekretom, yang merupakan kumpulan molekul bioaktif berupa sitokin, faktor pertumbuhan, kemokin, serta vesikel ekstraseluler (7). Penelitian oleh Putri (2025) menjelaskan bahwa sekretom *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) yang mengandung berbagai faktor bioaktif berperan dalam modulasi inflamasi, penghambatan mikroorganisme, serta mendukung proses regenerasi jaringan. Sekretom MSC telah dilaporkan memiliki kemampuan dalam mempercepat penyembuhan luka, meningkatkan angiogenesis, serta merangsang proliferasi dan migrasi sel kulit, sehingga berpotensi besar untuk diaplikasikan dalam terapi regenerasi jaringan kulit (8).

Meskipun efektivitas biologis sekretom MSC dalam regenerasi jaringan kulit telah banyak dilaporkan, aspek keamanan dan toksisitasnya, khususnya melalui rute dermal, masih belum banyak diteliti secara mendalam (9). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ha DH (2020), dilaporkan bahwa pengujian pada eksosom yang merupakan molekul bioaktif yang berasal dari *human adipose-derived Mesenchymal Stem Cells* yang di uji iritasi dan sensitisasi kulit, serta pengamatan tanda klinis dan perubahan morfologi kulit menunjukkan hasil bahwa tidak ditemukan adanya eritema, edema, maupun reaksi iritan pada kulit, serta tidak menyebabkan perubahan berat badan pada hewan uji (10). Meskipun demikian, penggunaan sistem penghantaran seperti *patch* yang digunakan dalam durasi dan kontak zat aktif dengan kulit yang lama dapat berpotensi menimbulkan efek yang tidak diinginkan apabila terabsorpsi melalui kulit dalam jumlah tertentu (11). Oleh

karena itu, pengujian toksisitas dermal menjadi langkah krusial sebelum sekretom MSC dapat diaplikasikan secara luas sebagai sediaan topikal.

Uji toksisitas akut dermal merupakan metode standar yang digunakan untuk mengevaluasi efek toksik yang muncul akibat paparan tunggal atau paparan jangka pendek suatu zat melalui kulit. Uji ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi efek merugikan berupa reaksi lokal kulit seperti eritema, gatal (*pruritus*) dan edema, serta untuk menentukan tingkat keamanan suatu sediaan (12). Organisasi Internasional seperti *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) telah menetapkan pedoman uji toksisitas akut dermal, yaitu OECD Test Guideline 402 sebagai acuan dalam penelitian toksikologi praklinis (13).

Model hewan percobaan tikus (*Rattus norvegicus*) digunakan dalam uji toksisitas dermal karena memiliki karakteristik fisiologis dan respons biologis yang relevan untuk mengevaluasi efek toksik suatu zat sebelum diaplikasikan pada manusia. Penggunaan tikus sebagai hewan uji memungkinkan pengamatan parameter toksisitas secara komprehensif, termasuk mortalitas, tanda klinis toksisitas, perubahan berat badan, reaksi lokal pada kulit, serta perubahan makroskopik organ (14). Data yang diperoleh dari uji ini menjadi dasar penting dalam penilaian keamanan dan pengembangan produk berbasis sekretom MSC terutama dalam penghantaran obat melalui kulit.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian *patch* yang mengandung sekretom MSC menimbulkan efek toksik akut dermal pada tikus?
2. Apakah pemberian *patch* yang mengandung sekretom MSC menyebabkan perubahan berat badan pada tikus?
3. Apakah pemberian *patch* yang mengandung sekretom MSC menyebabkan mortalitas pada tikus?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengamati adanya tanda klinis toksisitas akut dermal setelah pemberian *patch* yang mengandung sekretom MSC pada tikus.

2. Mengamati perubahan berat badan pada tikus selama periode pengamatan uji toksisitas akut dermal.
3. Mengamati mortalitas pada tikus selama periode pengamatan uji toksisitas akut dermal.

1.4 Hipotesa Penelitian

1. *Patch* yang mengandung sekretom MSC menimbulkan efek toksik akut dermal berupa perubahan klinis pada tikus.
2. *Patch* yang mengandung sekretom MSC menimbulkan perubahan berat badan pada tikus.
3. *Patch* yang mengandung sekretom MSC menimbulkan mortalitas pada tikus.

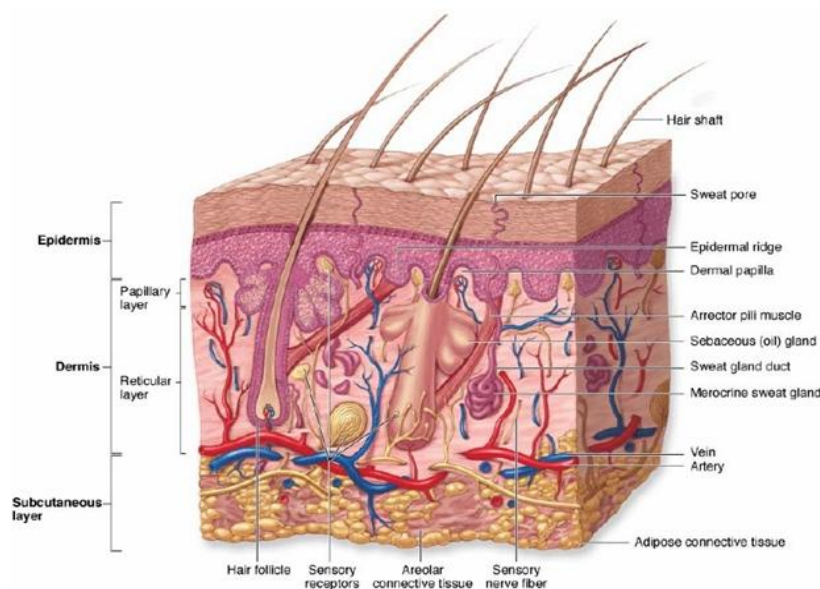


II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

2.1.1 Definisi Kulit

Kulit merupakan suatu organ besar yang berlapis-lapis. Kulit menutupi permukaan lebih dari 20.000 cm² dan mempunyai bermacam-macam fungsi dan kegunaan. Kulit merupakan organ yang essential dan vital serta merupakan cermin kesehatan dan kehidupan. Kulit juga sangat kompleks, elastis, dan sensitif, serta bervariasi pada keadaan iklim, umur, seks, ras, dan lokasi tubuh. Kulit merupakan suatu organ besar yang berlapis-lapis. Kulit menutupi permukaan lebih dari 20.000 cm² dan mempunyai bermacam-macam fungsi dan kegunaan (15).



2.1.2 Struktur Kulit

Kulit terdiri atas 2 lapisan utama yaitu epidermis dan dermis. Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat agak padat yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis, yang pada beberapa tempat terutama terdiri dari jaringan lemak (16).

1. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit dan terdiri atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak mempunyai pembuluh darah, oleh karena itu semua nutrisi dan oksigen diperoleh dari kapiler pada lapisan dermis. Ketebalan epidermis berbeda-beda pada berbagai bagian tubuh, yang paling tebal ukurannya 1 mm, misalnya pada telapak kaki dan telapak tangan, dan lapisan yang tipis berukuran 0,1 mm terdapat pada kelopak mata, pipi, dahi, dan perut. Sel-sel epidermis ini disebut keratinosit (16).

Para ahli histologi membagi epidermis dari bagian terluar hingga kedalam menjadi 5 lapisan, yakni :

a) Lapisan Tanduk (*Stratum corneum*)

Stratum corneum dikenal sebagai lapisan yang paling atas. *Stratum corneum* adalah lapisan paling luar epidermis yang disebut juga lapisan tanduk. *Stratum corneum* merepresentasikan fase akhir diferensiasi kulit. Tiap sel mempunyai diameter sebesar 40 μm dan ketebalan sebesar 0,5 μm .

Stratum corneum terdiri dari sel korneosit yang tersusun rapat. Setiap lapisan korneosit terdiri hampir seluruh sel. Bila dilihat secara melintang, *stratum corneum* menyerupai struktur batu bata dan semen pada dinding. Korneosit “batu bata” itu mengandung keratin terhidrasi yang berada diantara bilayer lipid “semen”. Bilayer lipid itu terdiri dari seramida, asam lemak dan kolesterol. Permeabilitas obat ditentukan oleh kandungan lipid dalam *stratum corneum*. Lipid juga berperan dalam menjaga kohesi dan deskuamasi (pengelupasan).

Stratum corneum berasal dari lapisan epidermis di bawahnya yang mengalami diferensiasi. Epidermis terdiri dari beberapa strata sel berdasarkan tingkat diferensiasinya. Sel-sel di epidermis berasal dari *basal lamina* yang berada di antara epidermis dan dermis. Pada *basal lamina* ini terdapat melanosit, sel langerhans dan dua tipe sel keratin. Sel keratin tipe pertama berfungsi sebagai sel yang mempunyai kapasitas untuk menghasilkan sel baru dan sel keratin tipe kedua berfungsi sebagai jangkar yang mengaitkan epidermis ke membran dasar. Membran dasar ini mempunyai ketebalan sebesar 50-70 nm dan terdiri dari dua lapisan yaitu *lamina densa* dan *lamina lusida*. Kedua lapisan ini tersusun atas protein seperti kolagen tipe IV, laminin, dan fibronektin. Kolagen tipe IV berfungsi untuk

mempertahankan stabilitas membran dasar, laminin dan fibronektin berfungsi dalam perekatan antara keratinosit basal dan membran dasar.

Stratum corneum berperan sebagai penghalang penetrasi utama untuk banyak zat. Kemampuan *stratum corneum* sebagai penghalang terkait dengan laju pergantian kulit yang tinggi, densitas penyusun sel yang sangat kompak dan luas permukaan yang rendah untuk transportasi sel. *Stratum corneum* juga berperan untuk mencegah hilangnya komponen internal tubuh, terutama air, ke lingkungan luar.

b) Lapisan Jernih (*Stratum lusidum*)

Stratum lusidum disebut juga “lapisan *barrier*”. *Stratum lusidum* terletak tepat di bawah *stratum corneum* yang merupakan lapisan tipis, jernih, mengandung eleidin, sangat tampak jelas pada telapak tangan dan telapak kaki .

c) Lapisan Berbutir-butir (*Stratum granulosum*)

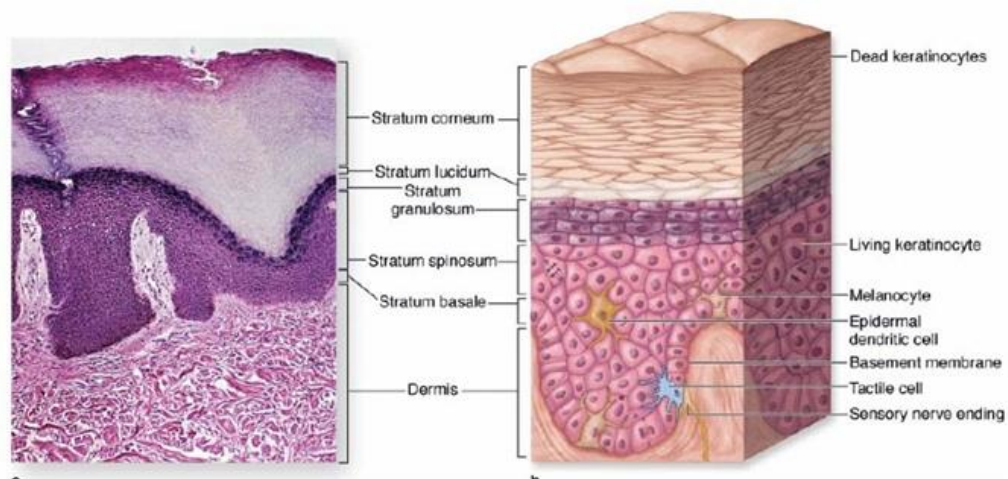
Stratum granulosum tersusun oleh sel-sel keratinoit yang terbentuk poligonal, berbutir kasar, berinti mengerut.

d) Lapisan Malphigi (*Stratum spinosum*)

Stratum spinosum yang selnya seperti berduri. Lapisan malphigi memiliki sel yang berbentuk kubus dan seperti berduri. Intinya besar dan oval. Setiap sel berisi filamen-filamen kecil yang terdiri atas serabut protein. Cairan limfe masih ditemukan mengitari sel-sel dalam lapisan malphigi ini.

e) Lapisan Basal (*Stratum germinativum*)

Lapisan basal adalah lapisan terbawah epidermis. Di dalam *stratum germinativum* juga terdapat sel-sel melanosit, yaitu sel-sel tidak mengalami keratinisasi dan fungsinya hanya membentuk pigmen melanin dan memberikannya kepada sel-sel keratinosit melalui dendrit-dendritnya (17).



2. Dermis

Berbeda dengan epidermis yang tersusun oleh sel-sel dalam berbagai bentuk dan keadaan, dermis terdiri dari bahan dasar serabut kolagen dan elastin yang berbeda di dalam substansi dasar yang bersifat koloid dan terbuat dari gelatin mukopolisakarida. Serabut kolagen dapat mencapai 72% dari keseluruhan berat kulit manusia bebas lemak. Di dalam dermis terdapat adneksa-adneksa kulit seperti folikel rambut, papila rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebacea, otot penggerak rambut, ujung pembuluh darah dan ujung saraf, juga sebagian serabut lemak yang terdapat pada lapisan lemak bawah kulit atau subkutis (18).

3. Hipodermis

Lapisan ini merupakan kelanjutan dermis yang terdiri dari jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak di dalamnya. Lapisan sel lemak disebut *penikulus adiposis*, berfungsi sebagai cadangan makanan. Di lapisan ini terdapat ujung-ujung saraf tepi, pembuluh darah, dan saluran getah bening (18).

2.1.3 Jalur Penetrasi Zat Melalui Kulit

Ada 3 jalur masuknya zat melalui lipid di *stratum corneum*, yaitu jalur interseluler, jalur transseluler, dan jalur transappendageal. Dua faktor penentu utama transportasi zat melalui kulit adalah integritas *stratum corneum* sebagai penghalang penetrasi dan interaksi yang terjadi antara pembawa zat ataupun antara zat-kulit (19).

1. Jalur Interseluler atau Jalur Paraseluler

Jalur interseluler yaitu zat berpenetrasi melewati antar sel korneosit yaitu didomain lipid *stratum corneum*. Jalur ini dilewati oleh hampir sebagian besar zat yang berukuran $< 0,1 \mu\text{m}$. Hal-hal yang berpengaruh transportasi zat melalui jalur interseluler adalah karakteristik zat seperti ukuran molekul, lipofilisitas, muatan, titik leleh dan variasi formula (19).

2. Jalur Intraseluler atau Jalur Transseluler

Jalur intraseluler adalah jalur transportasi melewati sel korneosit. Pada awalnya diperkirakan bahwa mekanisme difusi intraseluler adalah jalur yang mendominasi untuk transport zat melalui kulit. Bukti eksperimental menunjukkan bahwa jalur transport utama melalui *stratum corneum* adalah melalui jalur interseluler (19).

3. Jalur Transappendageal

Jalur transappendageal adalah jalur transportasi zat melalui pori-pori folikel rambut atau melalui kelenjar sebasea. Jalur ini kurang signifikan dalam transportasi zat karena mempunyai luas permukaan yang kecil yaitu hanya sebesar 0,1% dari luas permukaan kulit (19).

2.1.4 Absorpsi Perkutan

Absorpsi perkutan adalah masuknya molekul obat dari kulit ke dalam jaringan di bawah kulit, kemudian masuk ke dalam sirkulasi darah dengan mekanisme difusi pasif. Penyerapan perkutan merupakan gabungan fenomena penembusan senyawa dari lingkungan luar ke bagian dalam kulit ke dalam peredaran darah dan kelenjar getah bening. Istilah perkutan menunjukkan bahwa penembusan terjadi pada lapisan epidermis dan penyerapan dapat terjadi pada lapisan epidermis yang berbeda (20).

Penembusan molekul dari luar ke bagian dalam secara nyata dapat terjadi baik melalui penetrasi transdermal maupun penetrasi transappendageal. Kulit merupakan organ yang bersifat aktif secara metabolik dan kemungkinan dapat merubah obat setelah penggunaan secara topikal. Biotransformasi yang terjadi dapat berperan sebagai faktor penentu kecepatan (*rate limiting step*) pada proses absorpsi perkutan (21).

1. Penetrasi Transappendageal

Penetrasi melalui rute transappendageal adalah penetrasi melalui kelenjar-kelenjar dan folikel yang ada pada kulit. Pada penetrasi transappendageal akan membawa senyawa obat melalui kelenjar keringat dan folikel rambut yang berhubungan dengan kelenjar sebaceous. Rute transappendageal merupakan rute yang sedikit digunakan untuk transport molekul obat, karena hanya mempunyai daerah yang kecil (kurang dari 0,1% dari total permukaan kulit). Rute ini berperan penting pada beberapa senyawa polar dan molekul ion yang hampir tidak berpenetrasi melalui *stratum corneum* (22).

Rute transappendageal dapat menghasilkan difusi yang cepat setelah penggunaan obat karena dapat menghilangkan waktu yang diperlukan oleh obat untuk melintasi *stratum corneum*. Difusi melalui transappendageal ini dapat terjadi dalam 5 menit dari pemakaian obat (21).

2. Penetrasi Transpidermal

Sebagian obat berpenetrasi melintasi *stratum corneum* melalui ruang intraseluler dan ekstraseluler. Kulit normal jalur penetrasi obat umumnya melalui epidermis (transpidermal), dibandingkan penetrasi melalui folikel rambut maupun melewati kelenjar keringat (transappendageal). Prinsip masuknya penetran ke dalam *stratum corneum* adalah adanya koefisien partisi dari penetran (21).

2.2 Sel Punca

2.2.1 Definisi Sel Punca

Istilah sel punca atau stem cells pertama kali diperkenalkan oleh Alexander Maksimov, seorang ahli histologi asal Rusia, pada tahun 1908 di sebuah kongres hematologi di Berlin. Maksimov mengemukakan hipotesis bahwa sel punca mampu dapat membentuk sel-sel darah. Teori ini kemudian terbukti pada tahun 1978, ketika ditemukan sel punca di sumsum tulang manusia yang dapat membentuk berbagai jenis sel darah dalam tubuh (23). Sel punca atau stem cell merupakan sel yang tidak ataupun belum terspesialisasi menjadi sel tertentu dan sel ini juga dapat berkembang menjadi bermacam macam jenis sel yang dibutuhkan (24).

Sel punca berpotensi besar dalam terapi sel dikarenakan kemampuan dari sel ini untuk memperbaharui diri sendiri serta dapat berdiferensiasi menjadi

beberapa jenis turunan sel yang dapat menjadi solusi dari berbagai macam penyakit. Penggunaan sel punca ini sendiri sudah banyak diakui, sekaligus memiliki beberapa keuntungan seperti memiliki kemampuan poliferasi yang baik, memiliki kemampuan berdiferensiasi yang baik (25).

2.2.2 Karakteristik Sel Punca

Untuk digolongkan sebagai sel punca, ada beberapa karakteristik yang harus dimiliki oleh suatu sel yaitu:

1. Kemampuan berdiferensiasi

Sebagian besar sel dalam tubuh mempunyai bentuk dan fungsi yang tidak dapat diubah. Sebagai contoh, sel saraf sudah berkembang sedemikian rupa sehingga mempunyai bentuk dan fungsi yang khusus dan tidak dapat diubah bentuk dan fungsinya menjadi sel lain. Sel punca mempunyai karakteristik yang berbeda dengan sel tubuh yang sudah matang, sel punca merupakan sel yang berada pada stadium awal perkembangan sel, belum mempunyai bentuk dan fungsi yang khusus. Sel punca mampu berkembang (berdiferensiasi) menjadi sel yang lainnya. Dalam hal ini sel punca mampu berkembang menjadi berbagai jenis sel matang, misalnya sel saraf, sel otot jantung, sel otot rangka, sel pankreas, dan lain-lain. (26).

2. Kemampuan regenerasi diri

Sel punca juga memiliki kemampuan untuk memperbarui dirinya sendiri atau meregenerasi (*self-renew*). Dalam hal ini sel punca mempunyai kemampuan untuk dapat membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel (26).

2.2.3 Jenis-jenis Sel Punca

1. Berdasarkan sumbernya

Berdasarkan sumbernya, sel punca terbagi atas dua yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa.

a) Sel punca embrionik (*embryonic stem cell*) yaitu sel punca yang berasal dari inner cell mass pada blastocyst (stadium embrio yang terdiri dari 50 – 150 sel, kira-kira hari ke-5 pasca pembuahan). Sel punca embrionik biasanya didapatkan dari sisa embrio yang tidak terpakai pada IVF (in vitro fertilization). Sel punca

embrionik bersifat pluripoten, yang berarti dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dalam tubuh, termasuk sel dari lapisan mesoderm, endoderm, dan ectoderm. (27).

b) Sel punca dewasa (*adult stem cell*) adalah sel punca yang dapat ditemukan dalam jaringan yang sudah mengalami diferensiasi, dengan karakteristik yang berbeda tergantung pada asal selnya. Jumlah sel punca dewasa jauh lebih sedikit dibandingkan dengan sel-sel yang sudah berdiferensiasi dalam jaringan dewasa. Keunggulan sel punca dewasa adalah bahwa sel-sel ini sudah terspesialisasi, sehingga proses induksinya menjadi lebih sederhana. Dalam terapi, sel punca dewasa dapat langsung diambil dari sel pasien melalui prosedur yang telah ditetapkan. Sel punca dewasa umumnya bersifat multipoten, artinya hanya dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel, biasanya dalam kelompok sel yang sama. Sel-sel ini berperan dalam memelihara dan memperbaiki jaringan tempat mereka ditemukan (28).

Sel punca dewasa digolongkan menjadi 5 macam yang berbeda berdasarkan jalur diferensiasinya, yaitu :

- 1) Sel punca hematopoietik : Dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel darah seperti sel darah merah, trombosit, monosit, neutrofil, basofil, eosinofil, limfosit T, dan sel pembunuh alami (NK cell).
- 2) Sel punca saraf : Mampu berkembang menjadi tiga jenis utama sel saraf yaitu astrosit, oligodendrosit, dan neuron.
- 3) Sel punca kulit : Dapat berdiferensiasi menjadi keratinosit dan umumnya ditemukan pada lapisan *stratum basalis* epidermis dan dasar folikel rambut.
- 4) Sel punca mesenkimal : Mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, kondrosit, adiposit, serta berbagai jenis sel yang membentuk jaringan ikat.
- 5) Sel punca jantung : Mampu berkembang menjadi tiga jenis sel utama yang menyusun jantung, yaitu sel endotel, kardiomyosit, dan sel otot polos (29).

2. Berdasarkan kemampuan berdiferensiasi

Berdasarkan kemampuan berdiferensiasinya, sel punca dapat digolongkan atas 5 yaitu totipoten, pluripoten, multipoten, oligopoten, dan unipoten.

a) Sel induk totipotensi

Sel punca yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi semua jenis sel. Sel punca ini merupakan sel embrionik awal yang masih mempunyai kemampuan untuk membentuk berbagai jenis sel. Sel punca ini dapat membentuk satu individu yang utuh. Adapun yang termasuk dalam sel punca dengan kemampuan totipotent adalah zigot dan morula (30).

b) Sel punca pluripoten (PSC)

Mampu menghasilkan semua jenis sel dari lapisan germinal, namun tidak dapat membentuk struktur ekstraembrionik seperti plasenta. Salah satu contoh sel pluripoten adalah sel punca embrionik (ESC), yang berasal dari massa sel dalam embrio sebelum implantasi. Selain itu, terdapat sel punca pluripoten terinduksi (iPSC) yang berasal dari lapisan epiblas embrio setelah implantasi. Potensi pluripoten ini bervariasi, dimulai dari sel-sel yang benar-benar pluripoten seperti ESC dan iPSC, hingga sel dengan potensi yang lebih rendah, seperti sel multi-, oligo-atau unipoten. Aktivitas dan spektrum mereka sering diuji melalui pembentukan teratoma. iPSC dihasilkan secara buatan dari sel somatik dan memiliki fungsi mirip dengan PSC (30).

c) Sel punca multipoten

Sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Sebagai contoh, hemopoietic stem cell yang terdapat pada sumsum tulang mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel darah seperti eritrosit, leukosit dan trombosit. Contoh lainnya neural stem cell mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi sel saraf dan sel glia. Pada jaringan dewasa, sel punca multipoten terdapat pada jaringan dan organ untuk menggantikan sel yang hilang atau terluka (30).

d) Sel punca oligopoten

Dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel, seperti sel punca myeloid yang dapat berkembang menjadi sel darah putih tetapi tidak menjadi sel darah merah (30).

e) Sel punca unipoten

Memiliki kapasitas diferensiasi yang sangat terbatas dan hanya dapat berkembang menjadi satu jenis sel, seperti dermatosit. Namun, karena kemampuannya untuk membelah berulang kali (30).

2.2.4 Sel Punca Mesenkimal

Mesenchymal Stem Cells (MSC) adalah sel punca yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan karena sumbernya yang melimpah, mudah dikultur secara *in vitro*, memiliki imunogenitas rendah, potensi diferensiasi multipoten, serta dapat dimodifikasi atau dimanipulasi secara genetik (26).

Mesenchymal Stem Cell (MSC) merupakan sel punca yang bersifat multipoten progenitor sel nonhematopitik. Sel punca mesenkimal dapat diekspansi dalam kultur dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan sesuai dengan stimulus yang sesuai dan fungsi yang dibutuhkan untuk menggantikan atau meregenerasikan sel yang hilang karena kerusakan. Karakteristik utama MSC adalah kemudahan aksesnya karena dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti jaringan lemak, tali pusat, hati, cairan ketuban, plasenta, pulpa gigi, dan lainnya. Karena isolasinya yang mudah, fungsi biologisnya yang unik, serta kapasitas dan penerimaan etis yang luas, MSC menjadi pilihan utama untuk terapi sel (29).

Sel punca mesenkimal memiliki tiga kriteria utama yaitu:

1. Sel punca mesenkimal harus mampu menempel pada permukaan wadah kultur plastik dalam kondisi kultur normal.
2. Sel punca mesenkimal harus mengekspresikan marker CD73, CD90, dan CD105, serta tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79 atau CD19, dan HLA-DR pada permukaan sel.
3. Sel punca mesenkimal harus mampu berdiferensiasi menjadi sel-sel adiposa (adipogenik), tulang rawan (kondrogenik), dan tulang (osteogenik) secara *in vitro* (31).

2.3 Sekretom

2.3.1 Definisi Sekretom

Sekretom adalah kumpulan molekul yang dilepaskan oleh sel punca, termasuk sitokin, kemokin, faktor anti-inflamasi, faktor pertumbuhan, dan protein yang disampaikan melalui vesikel ekstraseluler (EVs). Vesikel ekstraseluler ini dapat diklasifikasikan berdasarkan asal, ukuran, kepadatan, dan penanda permukaannya menjadi eksosom, mikropartikel, dan badan apoptotik. Komposisi sekretom dapat bervariasi tergantung pada perubahan mikrolingkungannya (32).

Sekelompok senyawa dalam sekretom berfungsi sebagai mediator dalam komunikasi antar sel untuk memperbaiki dan meregenerasi jaringan yang rusak, proses ini dikenal sebagai efek parakrin. Efek parakrin dari sekretom memainkan peran penting dalam mengatur berbagai proses fisiologis, seperti pertumbuhan sel, replikasi, diferensiasi, pensinyalan, apoptosis, adhesi, dan angiogenesis. Faktor pertumbuhan yang disekresikan oleh sekretom antara lain *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *transforming growth factor* (TGF- β 1, TGF- β 2), *hepatocyte growth factor* (HGF), *keratinocyte growth factor* (KGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF-AA), kolagen tipe I, serta beberapa antioksidan seperti *insulin-like growth factor-binding proteins* (IGFBPs) dan superoxide dismutase (SOD) (33).

2.3.2 Komponen sekretom

Sekretom mengandung berbagai faktor seperti faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin, faktor angiogenik, mikrovesikel, dan eksosom yang memiliki potensi besar dalam terapi regeneratif (34). Faktor pertumbuhan berfungsi untuk merangsang perkembangan fibroblas, sel endotel, dan sel progenitor jaringan, yang berkontribusi pada regenerasi dan perbaikan jaringan. Beberapa faktor pertumbuhan yang berperan dalam proses angiogenesis (regenerasi jaringan atau organ yang rusak) termasuk *vascular endothelial derived growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *epidermal growth factor* (EGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *placenta growth factor* (PGF), *stromal derived factor-1* (SDF-1), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), dan *platelet-derived endothelial cell* (PDGF). Selain itu, beberapa sitokin

yang berperan dalam angiogenesis meliputi interleukin, IL-8, kemokin, *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), leptin, angiogenin, dan endostatin (35).

2.3.3 Kelebihan Sekretom

Sekretom dari sel punca mesenkimal mengandung berbagai metabolit bioaktif yang memiliki efek serupa dengan sel punca mesenkimal itu sendiri. Sekretom ini memiliki beberapa keunggulan yang menjadikannya populer sebagai terapi dalam bidang kesehatan, seperti memiliki efek antiinflamasi dan tidak menimbulkan tumor. Selain itu, sekretom ini dapat diproduksi secara massal, disimpan pada suhu -20°C hingga -80°C , mudah digunakan, serta tidak mengandung sel punca sehingga mengurangi risiko terjadinya kanker. Keunggulan lainnya adalah sekretom ini dapat langsung digunakan pada pasien tanpa perlu proses isolasi sel punca dari pasien atau kultur sel yang berkelanjutan seperti pada terapi sel (35).

Sekretom menawarkan beberapa keunggulan dibandingkan dengan sel punca itu sendiri, seperti kemudahan dalam produksi, pembekuan, pengemasan, dan transportasi. Karena sekretom tidak mengandung sel, maka tidak diperlukan pencocokan antara donor dan penerima untuk menghindari masalah penolakan. Sekretom sel punca memiliki prospek yang cerah dalam pengobatan regeneratif karena mengandung faktor pertumbuhan dan sitokin yang memiliki efek terapi. Selain itu, sekretom memiliki ekspresi protein permukaan sel yang rendah, yang menghasilkan imunogenitas lebih rendah dibandingkan dengan sel hidup dan sel yang terus berproliferasi (36).

2.4 Kultur Sel

2.4.1 Definisi Kultur Sel

Kultur sel merupakan teknik isolasi dan menumbuhkan sel di luar organisme hidup dalam lingkungan buatan yang terkendali, yaitu media kultur yang mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. Kultur sel dilakukan dengan proses yang kompleks yaitu pertama dilakukan isolasi sel dari jaringan atau organ alami (*in vivo*) kemudian dilakukan pertumbuhan dalam kondisi buatan yang lingkungannya dikendalikan (*in vitro*) (27). Sel-sel tersebut dapat diambil secara

langsung dari jaringan atau dengan proses enzimatis maupun mekanik, sebelum kemudian dikultivasi. Salah satu keuntungan utama dari kultur sel adalah dapat dilakukannya teknik sel-sel manipulasi fisikokimia (seperti suhu, pH, tekanan osmotik, kadar O₂ dan CO₂), serta manipulasi lingkungan fisiologis (seperti hormon dan konsentrasi nutrisi) dimana sel berkembang biak. Keuntungan lainnya dari kultur sel adalah homogenitas sel dan kontrol penuh pada myogenesis (37).

2.4.2 Subkultur

Sel yang telah dipisahkan dari jaringan dapat dikultur dalam kultur primer. Setelah itu, pemindahan sel dari kultur sebelumnya ke media pertumbuhan yang baru disebut subkultur atau *passing*. Pada tahap ini, sel-sel akan menempati fase hidup di lingkungan kulturenya (*Passage*). *Passage 0* menandakan bahwa sel baru diisolasi dan belum dipindahkan ke media kultur. Ketika sel dipindahkan ke kultur baru, itu disebut *passage 1*, dan seterusnya. *Passage 0* dikenal sebagai kultur primer, sementara *passage 1, 2*, dan seterusnya yang merupakan hasil dari sel primer disebut sebagai cell line. Perubahan sifat asli sel dan penurunan masa hidup sel sangat dipengaruhi oleh tingkat *passage* dalam proses kultur (38).

2.4.3 Thawing cell

Proses mencairkan sel setelah disimpan dalam tangki nitrogen cair disebut *thawing cell*. Sel yang disimpan dalam kondisi beku untuk jangka waktu lama tidak mengalami pertumbuhan, sehingga untuk mengaktifkannya kembali diperlukan proses *thawing*. Proses ini dilakukan dengan cara memanaskan sel menggunakan waterbath pada suhu 39°C (39).

2.4.4 Lingkungan dan kondisi kultur sel

Kondisi pada saat kultur bervariasi tergantung setiap jenis sel, tetapi lingkungan buatan dimana sel-sel tersebut dikultur selalu terdiri dari vessel yang sesuai dan mengandung substrat media yang memasok nutrisi penting bagi sel (seperti asam amino, karbohidrat, vitamin, dan mineral). Selain nutrisi tersebut, ada pula Growth Factor, hormon, gas (O₂ dan CO₂), dan dilakukan pengaturan terhadap

lingkungan fisikokimianya (seperti pH, tekanan osmotik, dan suhu). Kebanyakan sel hanya dapat tumbuh dan membelah di media yang cocok untuk sel tersebut (37).

2.5 Sistem Pengantaran Obat

Sistem pengantaran obat atau biasa disebut *drug delivery system* adalah sebuah sistem formulasi pengenalan agen-agen pengobatan dalam tubuh untuk meningkatkan, memberikan, dan mempertahankan jumlah serta waktu yang cukup untuk menghindari degradasi dan pelepasan obat sesuai yang diinginkan. Pemilihan jenis polimer yang digunakan dalam sistem pengantaran obat untuk dapat diformulasikan pada pemberian obat maka bahannya harus bersifat inert, bebas dari zat pengotor, memiliki struktur fisik yang tepat, biodegradable, mudah diproses. Salah satu keunggulan dari sistem pengantaran obat adalah kemampuannya dalam mengarahkan obat ke target spesifik, seperti jaringan atau sel tertentu, sehingga meningkatkan efektivitas terapi dan menurunkan toksisitas pada jaringan yang sehat. Selain itu penggunaan sistem pengantaran obat dengan pelepasan terkontrol memungkinkan pengobatan yang lebih nyaman bagi pasien dan meningkatkan kepatuhan pasien sehingga tujuan terapi dapat dicapai. Pengembangan sistem pengantaran obat juga memungkinkan penggunaan terapi kombinasi dengan pengantaran obat secara simultan untuk meningkatkan sinergi terapeutik dan mengurangi risiko (40).

2.6 Patch Film

2.6.1 Definisi Patch Film

Patch film merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memberikan obat secara transdermal. *Patch film* dapat meningkatkan bioavailabilitas obat. Selain itu, teknologi *patch film* juga dapat dimodifikasi dengan berbagai bahan polimer untuk mengatur laju pelepasan obat secara terkontrol (41). *Patch* berfungsi sebagai sistem penghantar yang mengandung lapisan perekat dan melepaskan obat ke dalam kulit secara terkendali. Selain itu, *patch* juga dapat memperpanjang durasi retensi obat di kulit, berkat lapisan perekat yang membentuk ikatan kuat dengan kulit, memastikan penghantaran obat berlangsung dengan efisien (42).

Dalam penggunaannya *patch* dapat digunakan dalam beberapa kondisi berikut, antara lain :

1. Pasien mengalami efek samping yang tidak dapat ditoleransi dan tidak bisa mengonsumsi obat secara oral (misalnya, disfagia), sehingga diperlukan metode pengobatan alternatif.
2. Pengendalian rasa sakit dapat ditingkatkan melalui manajemen yang sesuai. Hal ini sangat membantu pada pasien dengan demensia atau karena alasan lain, tidak dapat mengonsumsi obat penghilang rasa sakit mereka sendiri (43).

Dalam penggunaan *patch* untuk pengobatan, ada beberapa kriteria yang perlu diperhatikan antara lain :

1. Obat harus memiliki indeks terapeutik yang rendah.
2. Obat yang dipilih harus memiliki waktu paruh yang pendek.
3. Obat yang dipilih sebaiknya memiliki berat molekul rendah (<400 dalton)
4. Obat yang dipilih harus tidak menyebabkan iritasi dan tidak menimbulkan sensitisasi pada kulit.
5. Obat harus dipilih berdasarkan afinitasnya terhadap fase lipofilik dan hidrofilik (44).

Namun penggunaan *patch* tidak cocok dalam kondisi dimana pengobatannya diperlukan dalam penanganan nyeri akut. Ketika dibutuhkan penyesuaian dosis secara cepat, dosis yang diperlukan sama dengan atau kurang dari 30 mg/24 jam (44).

2.6.2 Jenis *Patch*

Patch diklasifikasikan berdasarkan desain dan mekanismenya dalam melepaskan obat, dibagi dalam beberapa jenis yaitu:

1. Tipe Reservoir
 - a) *Patch* obat satu lapis dengan perekat: terdiri dari satu lapisan polimer yang memiliki sifat perekat untuk mendistribusikan obat. Di bawah lapisan terdapat lapisan laminasi yang kedap air. Obat yang tertanam dalam lapisan polimer dilepaskan melalui lapisan penopang yang bertindak sebagai tempat penyimpanan obat.

- b) *Patch* obat berlapis-lapis dengan perekat: *patch* ini memiliki mekanisme pelepasan obat yang terkontrol dalam jangka waktu tertentu, terdiri dari lapisan reservoir obat dan lapisan perekat. Terdapat juga lapisan pelindung sementara dan laminasi penopang.
- c) *Patch* reservoir uap: dirancang dengan satu lapisan polimer perekat yang memiliki fitur pelepasan uap.
- d) *Patch* reservoir dengan membran: memiliki reservoir obat, lapisan belakang kedap air dari laminasi plastik metalik, dan membran polimer berpori yang mengendalikan pelepasan obat. Membran ini biasanya terbuat dari bahan polimer seperti kopolimer etilena vinil asetat dan perekat hipoalergenik.
- e) *Patch* mikro-reservoir : *patch* jenis ini menggabungkan reservoir obat dengan matriks polimer. Reservoir dibuat dengan cara menanggukkan obat dalam larutan polimer hidrofilik, kemudian menyebarkan secara merata pada polimer lipofilik dan menghasilkan bola-bola mikroskopis yang tidak larut, sehingga pelepasan obat mengikuti kinetika laju orde nol, memastikan kadar obat yang konsisten dalam plasma (43).

2. Tipe Matriks

- a) Sistem obat dalam perekat: reservoir obat dibuat dengan mencampurkan obat langsung dengan polimer perekat. Campuran perekat yang mengandung obat ini kemudian didistribusikan melalui metode pengecoran pelarut atau proses peleburan (43).
- b) Sistem matriks-dispersi: obat didistribusikan secara merata ke dalam matriks polimer yang bersifat hidrofilik atau lipofilik. Cakram polimer yang mengandung obat kemudian ditempelkan pada pelat dasar yang bersifat oklusif di dalam kompartemen yang dibentuk oleh lapisan pendukung yang tidak tembus obat. Perekat diaplikasikan di sekitar kompartemen, bukan langsung ke reservoir obat (43).

2.6.3 Keuntungan dan Kekurangan *Patch*

Dalam penggunaan *patch* untuk pengobatan terdapat beberapa keuntungannya, antara berikut:

- 1. Tidak mengalami *first-pass metabolism*.

2. Mudah digunakan dan diaplikasikan.
3. Obat dapat didistribusikan ke daerah yang ingin dituju.
4. Memungkinkan penggunaan obat dengan waktu paruh biologis yang pendek dan jendela terapeutik yang sempit.
5. Dapat digunakan untuk pasien yang mengalami gangguan pencernaan.
6. Meningkatkan kepatuhan pasien terhadap pengobatan dan memungkinkan pengobatan mandiri.
7. Menghindari fluktuasi konsentrasi obat (44).

Sedangkan untuk kekurangan dari *patch* antara berikut :

1. Obat dengan konsentrasi plasma yang sangat rendah mungkin diperlukan untuk memberikan efek.
2. Resiko reaksi alergi.
3. Iritasi lokal di sekitar daerah penggunaan.
4. Obat dengan partikel besar sulit untuk menembus kulit (44).

2.6.4 Bahan Tambahan *Patch*

Bahan-bahan tambahan memegang peranan penting untuk mendukung, adhesi, serta kontrol nya dalam melepaskan obat. Pemilihan bahan tambahan yang tepat sangat menentukan keberhasilan *patch* dalam memberikan bioavailabilitas obat yang optimal tanpa menyebabkan efek samping pada penggunaannya seperti iritasi kulit. Selain itu, stabilitas fisik dan kimia bahan tambahan juga harus diperhatikan untuk menjaga kualitas *patch* selama disimpan (45).

Adapun bahan-bahan tambahan yang digunakan dalam *patch*, antara berikut:

1. Polimer Pembentuk

Polimer adalah molekul yang terbentuk dari banyak unit-unit yang terikat bersama. Molekul ini memiliki ukuran yang sangat besar dan tersusun dari struktur kimia sederhana. Karena polimer mengandung sejumlah besar atom, sifat-sifatnya menjadi lebih kompleks dibandingkan dengan senyawa yang memiliki berat molekul lebih rendah. Sebagian besar polimer merupakan senyawa organik yang tersusun dari molekul hidrokarbon. Namun, polimer anorganik dan komposit juga

semakin banyak dikembangkan (46). Polimer dapat digunakan sendiri atau dalam kombinasi untuk meningkatkan karakteristik *patch*. Polimer dibagi menjadi dua jenis, yaitu polimer alami dan polimer sintetis. Contoh polimer alami meliputi pullulan, natrium alginat, gelatin, Na-CMC, pati, dan maltodekstrin. Sementara itu, polimer sintetis mencakup metil selulosa, polivinil alkohol (PVA), dan polivinil pirolidon (PVP) (47). Beberapa kriteria yang harus dimiliki polimer untuk pembentuk *patch* ialah polimer memiliki berat molekul rendah, aman digunakan, tidak beracun, dan tidak menyebabkan iritasi pada kulit, memiliki kemampuan pembasahan dan penyebaran yang baik, Polimer harus mudah diperoleh dan terjangkau, Polimer perlu menghasilkan *film* yang elastis, kuat, dan dapat disimpan untuk waktu yang lama (48). Salah satu polimer yang sering digunakan sebagai bahan tambahan *patch* adalah polivinil alkohol (PVA), yang juga dikenal sebagai etenol, merupakan polimer sintetis. Polimer ini bersifat mudah larut dalam air. PVA diproduksi melalui proses polimerisasi, di mana polimer vinil ester mengalami hidrolisis dengan menggunakan polivinil asetat sebagai bahan dasar. Secara fisik, PVA memiliki tampilan transparan dengan sedikit kekeruhan, tidak berbau, dan tidak memiliki rasa. Dalam aplikasinya, PVA sering digunakan sebagai pelapis tablet suplemen makanan untuk melindungi dari kelembaban. Senyawa ini dikategorikan sebagai bahan dengan kemampuan membentuk serat yang baik, memiliki ketahanan kimia tinggi, bersifat biokompatibel, tidak beracun, serta biodegradable. Selain itu, PVA juga mudah larut dalam air (49).

2. Zat Pengawet

Zat pengawet adalah bahan yang ditambahkan untuk mencegah atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sehingga mencegah terjadinya proses penguraian. Pengawet berfungsi untuk mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman, atau jenis penguraian lainnya yang disebabkan oleh mikroorganisme. Salah satu pengawet yang sering digunakan adalah metilparaben banyak digunakan sebagai pengawet antimikroba dalam produk kosmetik, makanan, dan formulasi farmasi. Senyawa ini dapat digunakan secara terpisah atau dalam kombinasi dengan paraben lain atau agen antimikroba lainnya. Dalam kosmetik, metilparaben adalah pengawet antimikroba yang paling umum digunakan. Paraben efektif dalam rentang

pH yang luas dan memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas, meskipun mereka paling efektif melawan ragi dan jamur (50).

3. Plastisizier

Zat yang berperan dalam meningkatkan elastisitas dan fleksibilitas *film* serta mencegahnya menjadi kaku dan mudah rapuh. Komponen ini merupakan faktor krusial yang memengaruhi sifat mekanik *film*, seperti kekuatan tarik dan tingkat perpanjangan. Konsentrasi plastisizer yang bervariasi dapat berdampak pada karakteristik mekanis *film*. Beberapa plastisizer yang umum digunakan meliputi gliserol, polietilen glikol, dan sorbitol. Plastisizer berperan seperti pelumas yang mempermudah molekul polimer untuk saling bergeser. Sementara itu, teori gel memandang polimer sebagai struktur tiga dimensi yang kompleks (51). Salah satu plastisizier adalah propilen glikol. Propilen glikol merupakan cairan bening, tidak berwarna, bersifat kental, hampir tidak berbau, dan memiliki rasa manis dengan sedikit sensasi tajam yang menyerupai gliserin. Senyawa ini digunakan sebagai pengawet antimikroba, desinfektan, humektan, plastisizer, pelarut, zat penstabil, serta cosolvent yang larut dalam air (52).

2.6.5 Metode Pembuatan *Patch*

Beberapa metode yang digunakan dalam membuat *patch* antara berikut:

1. *Solvent Casting*

Dalam metode ini, polimer yang larut air dilarutkan untuk membentuk larutan kental dan jernih. Bahan lainnya, termasuk API, dilarutkan dalam sebagian kecil pelarut yang sesuai. Setiap bahan dalam larutan tersebut kemudian dicampurkan dan diaduk hingga homogen. Setelah tercampur merata, larutan didiamkan sejenak untuk menghilangkan gelembung udara. Sediaan kemudian dicetak ke dalam cetakan dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40-60°C selama 24-48 jam, tergantung pada jenis pelarut yang digunakan, lalu dipotong sesuai ukuran yang diinginkan. Metode ini memiliki keunggulan dalam menghasilkan *patch* dengan keseragaman ketebalan yang lebih baik, serta *film* yang lebih fleksibel dan memiliki bentuk fisik yang lebih baik. Namun, dalam penggunaan metode solvent casting ini, diperlukan polimer yang larut dalam air serta pelarut yang mudah menguap (53).

2. *Hot Melt Extrusion*

Pada metode ini zat aktif dicampur dengan pembawa berwujud padat, kemudian bahan granular yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam ekstruder. Proses pengadukan dilakukan dengan kecepatan lambat, sekitar 15 rpm, selama kurang lebih 3-4 menit. Pengolahan dilakukan pada suhu yang bertahap, yaitu 80°C di zona 1, 115°C di zona 2, 100°C di zona 3, dan 65°C di zona 4. Ekstrudat yang dihasilkan dari suhu 65°C kemudian ditekan ke dalam silinder untuk membentuk *film* (53).

3. *Semi Solid Casting*

Dalam metode ini, digunakan campuran larutan polimer yang tidak larut dalam asam dan polimer pembentuk *film* dengan rasio 1:4. Polimer pembentuk *film* terlebih dahulu dilarutkan dalam akuades, kemudian larutan tersebut dicampurkan ke dalam larutan polimer yang tidak larut dalam asam dan ditambahkan plastisizer, hingga terbentuk larutan kental yang homogen (53).

4. *Solid Dispersion Extrusion*

Metode ini menggunakan bahan polimer hidrofilik amorf, satu atau lebih bahan aktif didispersikan dengan bahan pembawa dalam kondisi padatan. Bahan aktif farmasi dilarutkan dalam pelarut yang sesuai untuk mendapatkan suatu larutan. Larutan tersebut ditambahkan ke dalam lelehan polimer pada kondisi suhu dibawah 70° C tanpa melepaskan pelarut yang digunakan, dispersi padatan tersebut kemudian dicetak membentuk suatu *film* (53).

5. *Compression Molding*

Teknik yang digunakan untuk memproduksi produk komposit dengan metode cetakan tertutup. Prinsipnya adalah dengan menerapkan tekanan pada cetakan, di mana mesin kemudian mengontrol suhu melalui pemanas agar bahan dapat dibentuk sesuai dengan cetakan yang permanen setelah mendapat tekanan. Proses ini biasanya digunakan dalam industri untuk produksi dalam jumlah besar, dengan harga mesin yang relatif tinggi (54).

6. *Metode Rolling*

Proses pembuatan *film* dengan metode ini dimulai dengan melarutkan atau menyuspensikan obat ke dalam pembawa. Pelarut utama yang digunakan adalah air

atau campuran air dan alkohol. *Film* kemudian dikeringkan di atas penggulung dan dipotong (55).

2.7 Metode *In Vivo*

2.7.1 Definisi Metode *In Vivo*

Metode *in vivo* merupakan sebuah pendekatan dalam percobaan yang dilakukan dalam organisme hidup secara utuh untuk melakukan pengamatan, pengukuran efek suatu zat atau perlakuan yang dianalisis. Perbedaan yang mendasari metode *in vivo* dengan metode *in vitro* adalah metode *in vivo* dapat memberikan gambaran yang lebih kompleks terhadap efek biologis dari suatu perlakuan karena mempertimbangkan interaksi sistemik yang terjadi dalam tubuh makhluk hidup (56).

2.7.2 Kelebihan dan Kekurangan Metode *In Vivo*

Adapun kelebihan dari metode *in vivo* antara berikut :

1. Dapat memberikan informasi yang lebih komprehensif dibandingkan metode lain tentang pengujian yang dilakukan pada organisme utuh.
2. Memberikan data yang lebih relevan untuk pengembangan penelitian
3. Dapat memberikan kompleksitas interaksi biologis yang tidak dapat direplikasi pada penelitian metode lain (56).

Sedangkan untuk kekurangan metode ini antara berikut :

1. Metode ini memerlukan waktu dan biaya yang lebih besar.
2. Sulitnya mengontrol semua variabel, sehingga hasil penelitian bisa bervariasi.
3. Adanya pertimbangan etika dalam penggunaan hewan coba (56).

2.7.3 Tikus Putih

Tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain. Dalam kode etik penelitian kesehatan dicantumkan bahwa salah satu prinsip dasar riset

biomedis, dimana manusia sebagai subjek harus memenuhi prinsip ilmiah yang telah diakui dan harus didasarkan atas eksperimen laboratorium dan hewan percobaan yang memadai, serta berdasarkan pengetahuan yang lengkap dari literatur ilmiah (57).

Kelebihan dari tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) sebagai binatang percobaan antara lain bersifat *omnivora* (pemakan segala), mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia dan gizi yang dibutuhkan juga hampir sama dengan manusia. Selain itu dari segi ekonomi memiliki harga yang murah, ukuran yang kecil, dan berkembang dengan cepat. Tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) percobaan galur wistar yang dikembangkan secara luas sangat mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan (57).

2.8 Toksisitas

2.8.1 Definisi Toksisitas

Toksisitas merupakan kemampuan suatu zat, baik berupa bahan kimia, senyawa biologis, maupun produk farmasi untuk menimbulkan efek merugikan terhadap organisme hidup setelah pajanan pada dosis tertentu. Efek toksik dapat terjadi akibat interaksi zat toksik dengan sistem biologis tubuh yang selanjutnya memicu perubahan fisiologis, biokimia, maupun struktural pada sel, jaringan, atau organ. Konsep toksisitas merupakan dasar utama dalam ilmu toksikologi dan digunakan sebagai parameter penting dalam penilaian keamanan suatu bahan sebelum diaplikasikan pada manusia atau lingkungan (58). Secara umum, toksisitas dapat didefinisikan sebagai respons biologis yang tidak diinginkan akibat interaksi antara zat toksik dengan sistem biologis tubuh. Respons tersebut dapat bersifat lokal maupun sistemik dan dapat memengaruhi berbagai organ target seperti kulit, hati, ginjal, sistem saraf, dan sistem pernapasan (59).

2.8.2 Klasifikasi Toksisitas

Toksisitas dapat diklasifikasikan berdasarkan durasi pajanan dan jalur masuk zat, yaitu:

1. Berdasarkan durasi pajanan

a) Akut

Toksisitas akut merupakan efek toksik yang muncul setelah paparan tunggal atau paparan berulang dalam jangkawaktu singkat, umumnya kurang dari 24 jam. Uji toksisitas akut sering digunakan sebagai uji awal untuk mengidentifikasi potensi bahaya suatu zat dan menentukan kisaran dosis aman untuk pengujian lanjutan. Parameter yang diamati pada uji toksisitas akut meliputi gejala klinis, perubahan perilaku, perubahan berat badan, serta mortalitas hewan uji. Data dari uji ini juga digunakan untuk menentukan nilai LD₅₀ dan klasifikasi bahaya berdasarkan sistem GHS (13).

b) Subakut

Toksisitas subakut terjadi akibat paparan berulang dalam jangka waktu relatif singkat, biasanya antara 14 hingga 28 hari. Pada fase ini, efek toksik yang muncul sering kali bersifat kumulatif dan dapat melibatkan gangguan fungsi organ tertentu (60).

c) Subkronik

Toksisitas subkronik berlangsung selama 90 hari atau lebih, memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai efek toksik jangka menengah, termasuk perubahan parameter hematologi, biokimia darah, serta perubahan histopatologi organ. Evaluasi toksisitas subakut dan subkronik penting untuk mengidentifikasi efek yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut (60).

d) Kronik

Toksisitas kronik merupakan efek toksik yang muncul akibat paparan jangka panjang yang berlangsung selama sebagian besar umur organisme uji. Efek toksik kronik dapat berupa kerusakan organ permanen, gangguan metabolisme, serta peningkatan risiko terjadinya penyakit degeneratif dan karsinogenesis. Oleh karena itu, pengujian toksisitas kronik sangat penting dalam penilaian keamanan bahan yang digunakan secara terus-menerus atau dalam jangka panjang (61).

2. Berdasarkan jalur masuk zat

a) Oral

Toksisitas oral terjadi ketika zat toksik masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan, baik secara sengaja maupun tidak sengaja. Jalur oral merupakan jalur paparan yang paling umum dalam kehidupan sehari-hari dan sering digunakan dalam pengujian toksisitas karena relevan dengan penggunaan obat, makanan, dan bahan tambahan pangan. Setelah tertelan, zat toksik akan melalui proses absorpsi di saluran cerna dan selanjutnya didistribusikan ke berbagai jaringan tubuh (60).

Proses absorpsi zat melalui saluran pencernaan dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti sifat fisikokimia zat (kelarutan, ukuran molekul, dan stabilitas), kondisi pH saluran cerna, serta adanya makanan atau enzim pencernaan. Selain itu, zat yang diserap melalui jalur oral akan mengalami metabolisme lintas pertama di hati, yang dapat mengurangi atau justru meningkatkan toksisitas suatu zat melalui pembentukan metabolit aktif (58).

Efek toksik akibat paparan oral umumnya melibatkan organ target seperti saluran pencernaan, hati, dan ginjal. Gejala toksisitas oral dapat berupa iritasi gastrointestinal, mual, muntah, diare, serta gangguan fungsi hati dan ginjal pada paparan yang lebih berat. Oleh karena itu, uji toksisitas oral menjadi dasar penting dalam penilaian keamanan bahan yang digunakan melalui rute konsumsi (13).

b) Dermal

Toksisitas dermal terjadi akibat kontak zat toksik dengan permukaan kulit. Jalur ini sangat relevan dalam penggunaan sediaan topikal, transdermal, kosmetik, dan bahan kimia industri. Meskipun kulit berfungsi sebagai penghalang utama terhadap zat asing, paparan zat toksik dalam konsentrasi tertentu atau dalam waktu yang lama dapat menyebabkan efek toksik lokal maupun sistemik (45).

Kemampuan suatu zat untuk menembus kulit dipengaruhi oleh sifat fisikokimianya, seperti berat molekul, kelarutan lipid, dan konsentrasi zat. Lapisan *stratum corneum* berperan sebagai penghalang utama, namun zat dengan berat molekul rendah dan sifat lipofilik tinggi dapat menembus lapisan ini dan masuk ke sirkulasi sistemik. Kondisi kulit, luas area paparan, dan lama kontak juga memengaruhi tingkat absorpsi dermal (13).

Efek toksik akibat paparan dermal dapat berupa reaksi lokal seperti eritema, edema, iritasi, dan sensitisasi kulit. Dalam beberapa kasus, zat yang terabsorpsi melalui kulit dapat menimbulkan efek sistemik yang melibatkan organ target seperti hati dan ginjal. Oleh karena itu, uji toksisitas dermal, khususnya toksisitas akut dermal, menjadi penting dalam evaluasi keamanan sediaan topikal dan bahan yang berpotensi kontak langsung dengan kulit (61).

c) Inhalasi

Toksisitas inhalasi terjadi ketika zat toksik masuk ke dalam tubuh melalui sistem pernapasan dalam bentuk gas, uap, aerosol, atau partikel halus. Jalur inhalasi memiliki tingkat absorpsi yang relatif cepat karena luas permukaan paru-paru yang besar dan suplai darah yang tinggi. Oleh karena itu, paparan melalui inhalasi dapat dengan cepat menimbulkan efek toksik sistemik (58).

Setelah terhirup, zat toksik dapat mengendap di saluran pernapasan bagian atas atau mencapai alveoli, tempat terjadinya pertukaran gas. Zat yang mencapai alveoli dapat langsung masuk ke sirkulasi sistemik tanpa mengalami metabolisme lintas pertama di hati, sehingga berpotensi menimbulkan efek toksik yang lebih cepat dan berat. Faktor seperti ukuran partikel, kelarutan zat, dan durasi paparan sangat memengaruhi tingkat toksisitas inhalasi (61).

Efek toksik akibat inhalasi dapat berupa iritasi saluran pernapasan, gangguan fungsi paru-paru, hingga efek sistemik seperti gangguan sistem saraf dan kardiovaskular. Oleh karena itu, pengujian toksisitas inhalasi menjadi penting terutama untuk bahan kimia industri dan polutan udara yang berpotensi terhirup oleh manusia (62).

2.8.3 Toksisitas Akut Dermal

Toksisitas akut dermal merupakan efek toksik yang timbul akibat paparan suatu zat melalui kulit setelah pemberian tunggal atau paparan berulang dalam jangka waktu singkat, umumnya dalam periode observasi hingga 14 hari. Paparan dermal menjadi perhatian penting dalam toksikologi karena kulit merupakan jalur utama kontak langsung dengan berbagai bahan kimia, baik dalam lingkungan kerja, produk kosmetik, maupun sediaan farmasi topikal dan transdermal. Uji toksisitas akut dermal bertujuan untuk mengidentifikasi potensi bahaya suatu bahan, menilai

tingkat keamanan, serta mengklasifikasikan toksisitas berdasarkan respon biologis yang muncul setelah paparan awal (13).

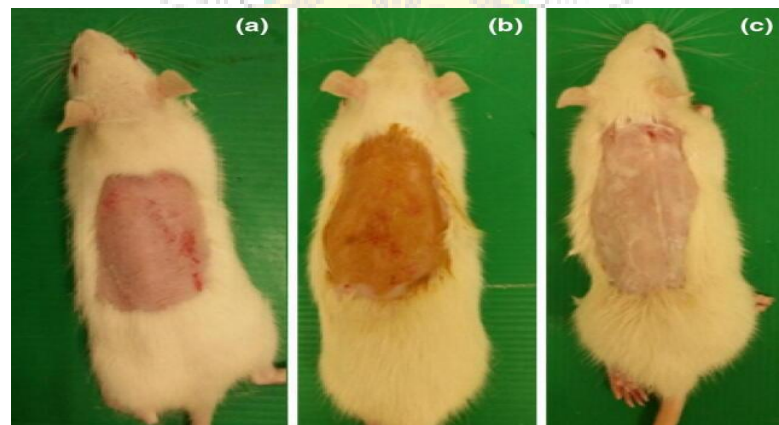
2.8.4 Gejala Toksisitas Dermal

1. Iritasi kulit

Iritasi kulit merupakan gejala toksisitas dermal yang paling sering dijumpai dan ditandai dengan reaksi inflamasi lokal akibat paparan zat kimia. Reaksi ini dapat muncul dalam bentuk eritema, edema, rasa panas, gatal, atau nyeri pada area kulit yang terpapar. Iritasi terjadi akibat kerusakan sel epidermis atau gangguan integritas *stratum corneum*, sehingga memicu respons inflamasi non-imunologis.

Secara patofisiologis, iritasi kulit disebabkan oleh pelepasan mediator inflamasi seperti prostaglandin, sitokin, dan histamin dari sel kulit yang rusak. Zat iritan dapat melarutkan lipid pelindung kulit atau menyebabkan denaturasi protein, sehingga meningkatkan permeabilitas kulit dan memperparah respons inflamasi. Tingkat keparahan iritasi dipengaruhi oleh konsentrasi zat, durasi pajanan, serta luas permukaan kulit yang terpapar.

Dalam pengujian toksisitas akut dermal, iritasi kulit digunakan sebagai parameter utama untuk menilai keamanan suatu bahan. Reaksi iritasi yang bersifat ringan umumnya bersifat reversibel, sedangkan iritasi berat dapat berkembang menjadi kerusakan jaringan yang lebih serius. Oleh karena itu, pengamatan perubahan kulit secara makroskopis dan histopatologis menjadi bagian penting dalam evaluasi toksisitas dermal (63).



Gambar 2.3 Eritema dan edema pada tikus (ket : a,b = eritema, c = edema)

2. Sensitisasi Kulit

Sensitisasi kulit merupakan reaksi toksik yang melibatkan mekanisme imunologis dan terjadi setelah paparan berulang terhadap suatu zat. Gejala sensitisasi biasanya tidak muncul pada paparan pertama, namun berkembang setelah tubuh mengalami proses sensitisasi. Manifestasi klinisnya dapat berupa dermatitis kontak alergi yang ditandai dengan kemerahan, pruritus, vesikel, dan kulit bersisik.

Mekanisme sensitisasi melibatkan pembentukan kompleks hapten-protein yang dikenali oleh sistem imun sebagai antigen asing. Aktivasi sel langerhans dan limfosit T berperan penting dalam perkembangan respons imun ini. Setelah tersensitisasi, paparan ulang terhadap zat yang sama, meskipun dalam dosis rendah, dapat memicu reaksi inflamasi yang lebih berat.

Dalam konteks toksikologi dermal, sensitisasi kulit menjadi perhatian khusus karena dapat menimbulkan efek jangka panjang dan membatasi penggunaan suatu bahan. Oleh sebab itu, uji sensitisasi sering dilakukan sebagai bagian dari penilaian keamanan sediaan topikal dan bahan kimia industri (63).

3. Korosivitas Kulit

Korosivitas kulit merupakan gejala toksisitas dermal yang ditandai dengan kerusakan jaringan kulit secara ireversibel. Paparan zat korosif dapat menyebabkan nekrosis jaringan, ulserasi, dan luka bakar kimia. Kerusakan ini biasanya terjadi akibat zat dengan pH ekstrem atau sifat reaktif tinggi yang merusak struktur sel kulit secara langsung.

Secara klinis, gejala korosivitas meliputi nyeri hebat, pembentukan lepuh, dan perubahan warna kulit yang signifikan. Berbeda dengan iritasi, efek korosif umumnya bersifat permanen dan memerlukan penanganan medis segera. Tingkat kerusakan sangat bergantung pada kekuatan zat korosif dan lama kontak dengan kulit. Dalam uji toksisitas dermal, identifikasi sifat korosif suatu bahan sangat penting untuk menentukan klasifikasi bahaya dan tindakan pengamanan yang diperlukan. Bahan yang bersifat korosif umumnya tidak direkomendasikan untuk penggunaan topikal tanpa modifikasi formulasi yang tepat (63).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih selama 4 bulan di laboratorium Farmasi Fisika Fakultas Farmasi Universitas Andalas, di laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas, di *Animal House* Fakultas Farmasi Universitas Andalas, dan Laboratorium INA-LAB Padang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Pipette gun CV10 (Cleaver®, Inggris), Pipette controller 94700 (TPP®, Swiss), Biosafety cabinet 130 (Thermofisher Scientific®, Amerika Serikat), Inkubator CO2 AMUS080 (Hanil®, Korea), Mikroskop inverted AMEX1000 (Invitrogen®, Amerika Serikat), Waterbath SWB10L1 (Cleaver®, Inggris), Centrifuge tube 15 ml (SPL®, Korea), Centrifuge tube 50 ml (TPP®, Swiss), Plastik okulasi (Parafilm®, Amerika Serikat), Pipet serologi 2 ml (TPP®, Swiss), Pipet serologi 5 ml (SPL®, Korea), Standard tip (SSI®, US), Mikrotube 1 ml (SPL®, Korea), Micropipette elektroforesis (BioRad®, US), Disposable syringe 5 ml (Onemed®, Indonesia), Alcohol swab (Onemed®), Syringe filter 0,22 µm (TPP®, Swiss), Timbangan analitik (Shimadzu®, Jepang), Heating magnetic stirrer (Arec®, Italia), Erlenmeyer (Pyrex®), Gelas ukur (Pyrex®), Beaker Glass (Pyrex®), Cawan Petri (Onemed, Indonesia), Gunting iris (Stille®), Spuit (Onemed®), Kandang Mencit (Tecniplast®), Alat pemberi makan dan minum (Tecniplast®).

3.2.2 Bahan

Sel ADMSC (Adipose Mesenchymal Stem Cells) (Merck®, Germany), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Amerika), Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco®, Amerika), Phosphate Buffer Saline (PBS) (Gibco®, Amerika), Tripsin EDTA (Gibco®, Amerika), Antibiotik-Antimikotik (Gibco®, Amerika), Polyvinyl Alcohol (Petrochemical, Taiwan), Methyl Paraben (Bratacho),

Propilen Glikol (Bratacho, Indonesia), Aquadest, Backing Layer (Onemed, Indonesia), Etanol 70% (Thermo Fisher Scientific), Dietil eter (Oberon).

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Penyiapan media kultur

Media kultur dibuat dengan komposisi 20% FBS + 1% antibiotik antimikotik didalam 79% media DMEM. Prosedur ini dilakukan dibawah *biosafety cabinet* dalam kondisi steril. Media disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C dan dapat dihangatkan kembali dengan menggunakan waterbath sampai dengan suhu 37°C ketika akan digunakan (64).

3.3.2 Thawing Sel

ADMSC yang tersimpan di dalam freezer (-80°C) dikeluarkan kemudian dimasukkan ke dalam waterbath yang telah terisi air dengan suhu 37°C selama 2 menit. Kemudian sel disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 2000 rpm dan dihasilkan supernatan dan pellet. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml media kultur. Kemudian dimasukkan ke dalam flask dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C (39).

3.3.3 Perbanyakan kultur sel

Sel yang sudah mencapai kondisi konfluen kemudian dibuang media pertumbuhannya. Selanjutnya, *flask* dicuci dua kali menggunakan PBS steril. Kemudian lakukan tripsinasi untuk melepaskan sel dari permukaan *flask* dengan menambahkan 1 ml larutan tripsin-EDTA 0,5%, lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 5 menit agar sel dapat terlepas dari dasar *flask*. Setelah itu, kondisi sel diperiksa menggunakan mikroskop inverted untuk memastikan bahwa semua sel sudah terlepas. Untuk menghentikan aksi tripsin, ditambahkan 1 ml media kultur. Sel-sel tersebut kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, dan sel-sel yang terkumpul sebagai pelet diresuspensi dalam 4 ml media kultur. Suspensi sel ini kemudian dibagi ke dalam dua flask dan diinkubasi kembali dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C (65).

3.3.4 Pengumpulan sekretom

Sel yang telah mencapai fase hidup kelima dan kondisi konfluen, diolah dengan mengambil media pertumbuhannya. Media tersebut kemudian disaring menggunakan filter 0,22 μm untuk menghilangkan sisa-sisa puing sel yang tertinggal. Filtrat yang dihasilkan disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20°C dan filtrat tersebut disebut dengan sekretom (65).

3.3.5 Formulasi Sediaan *Patch Film*

Formula terdiri dari sekretom sebagai zat aktif, propilen glikol sebagai plastisizer, PVA sebagai Polimer dan metil paraben sebagai pengawet. Formula *patch* sekretom yang digunakan berasal dari penelitian Fauzi (2025) (5).

Tabel 3.1 Formulasi *patch* sekretom per 10 gram

Bahan	Persentase
Sekretom	5 %
Propilen glikol	10 %
PVA	5 %
Metil paraben	0,2 %
Aquadaest	Add 100%

3.3.6 Pembuatan *Patch* Sekretom

Sediaan *patch* dibuat dengan metode *solvent casting*. PVA dikembangkan dengan *aquadest* diatas hot plate dengan bantuan *magnetic stirrer* pada suhu 80°C . Metil paraben dilarutkan terlebih dahulu dalam sedikit air hangat karena metil paraben kurang larut di dalam air, kemudian ditambahkan ke dalam larutan PVA yang masih hangat sambil diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer*. Ditambahkan propilen glikol dan diaduk hingga larutan homogen. Setelah suhu larutan turun hingga $<40^{\circ}\text{C}$ ditambahkan sekretom secara perlahan ke dalam larutan dan diaduk perlahan hingga tercampur merata. Campuran dituangkan ke cawan petri kemudian dikeringkan selama 4 hari pada suhu ruang untuk menghasilkan lapisan yang kering. Setelah kering, lapisan *film* dikeluarkan dari cetakan dan direkatkan dengan metode *backing layer* (66).

3.3.7 Uji Toksisitas Sediaan

Tahap pengujian ini berpedoman pada Peraturan BPOM Nomor 10 Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praktikum Secara *In Vivo* yang memuat informasi sebagai berikut :

1. Hewan Uji

Kriteria hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar, berusia 8-12 bulan, berat 200–300 gram dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata-rata berat badan. Hewan dalam keadaan sehat, berperilaku normal, belum pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya dan telah dilakukan aklimatisasi hewan di kandang selama 7 hari dengan kondisi lingkungan terkontrol. Hanya hewan uji dengan kondisi kulit yang sehat dan utuh yang digunakan dalam penelitian ini (12).

2. Persiapan Hewan Uji

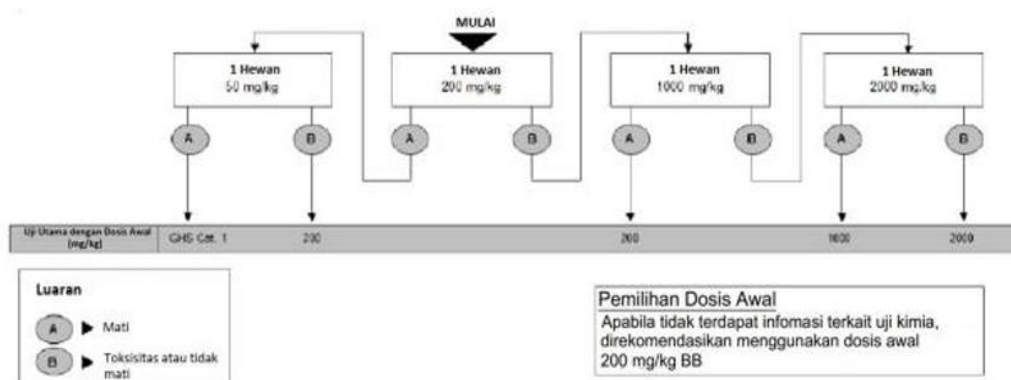
Rambut pada bagian punggung hewan uji dicukur 24 jam sebelum perlakuan pada area seluas 6 x 8 cm², yang setidaknya mencakup $\pm 10\%$ dari luas permukaan tubuh, sebagai lokasi paparan bahan uji. Proses pencukuran dilakukan secara hati-hati untuk menghindari terjadinya cedera pada lapisan dermis. Selama pencukuran, hewan uji diberikan anestesi eter secara inhalasi dengan dosis 3 ml. Pemberian anestesi bertujuan untuk meminimalkan stres dan ketidaknyamanan pada hewan uji selama proses pencukuran (67).

3. Cara Pemberian Sediaan Uji

Bahan uji ditempelkan secara merata pada permukaan punggung kulit tubuh. Bila sediaan uji bersifat toksik, maka paparan sediaan uji tidak perlu 10% dari area permukaan kulit. Untuk menjaga sediaan uji tetap menempel pada kulit, area paparan ditutup dengan kasa berpori dan dibalut dengan perban elastis serta plester yang tidak mengiritasi selama 24 jam. Setelah selesai periode paparan, sisa bahan uji yang masih menempel pada kulit dihilangkan dengan air atau pelarut yang sesuai (12).

4. Uji Penentuan Rentang Dosis Uji

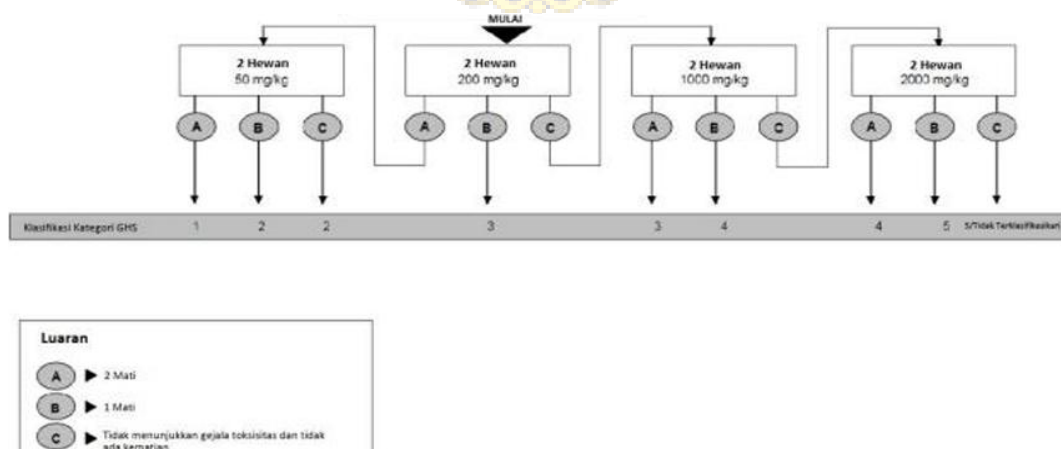
Uji penentuan rentang dosis dilakukan bila tidak ada informasi atau informasi terkait toksisitas senyawa uji tidak memadai. Penentuan rentang dosis dimulai dari menggunakan satu hewan uji dengan pemberian dosis awal, dianjurkan menggunakan dosis 200 mg/kgBB selama kurang lebih 14 hari. Uji utama akan dilakukan menurut hasil dari penentuan uji rentang dosis, langkah-langkah penentuan rentang dosis dilakukan sebagai berikut (13).



Gambar 3.1 Bagan uji penentuan rentang dosis

5. Uji Utama

Dosis awal uji utama didasarkan dari hasil uji penentuan rentang dosis. Jumlah hewan yang digunakan adalah 2 hewan uji untuk setiap dosis dan dilakukan sesuai langkah – langkah uji utama sebagai berikut (13).



Gambar 3.2 Bagan uji utama

6. Pengamatan Klinis

Pengamatan dilakukan pada tiga kelompok uji yaitu kelompok perlakuan, kelompok basis sediaan, dan kontrol secara klinis segera setelah periode paparan bahan uji. Observasi dilakukan secara intensif setiap jam selama 6 jam pertama, kemudian dilanjutkan pengamatan hingga 24 jam, dan selanjutnya dilakukan satu kali setiap hari sampai hari ke-14 (12).

Parameter yang diamati meliputi perubahan berat badan, pengamatan klinis secara visual, serta angka kematian hewan uji. Seluruh data pengamatan, termasuk tanda-tanda toksisitas, waktu kemunculan gejala, durasi toksisitas, waktu pemulihan, perubahan berat badan, serta waktu kematian, dicatat secara sistematis dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Gejala klinis yang menjadi perhatian meliputi tremor, kejang, hipersalivasi, diare, letargi, gangguan tidur, hingga koma. Selain itu, pengamatan juga mencakup perubahan pada kulit, rambut, mata, dan selaput lendir, serta perubahan pola perilaku. Pengamatan rutin umumnya dilakukan pada pagi hari, mengingat tikus merupakan hewan nokturnal yang cenderung lebih aktif dan agresif pada siang hari (12).

Penimbangan berat badan dilakukan sebelum pemberian perlakuan dan selanjutnya diukur setiap hari hingga akhir periode pengamatan. Hewan uji yang ditemukan dalam kondisi sekarat, menunjukkan tanda-tanda nyeri berat, atau mengalami cedera fisik permanen, segera dilakukan eutanasia secara manusiawi sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan (67).

7. Pengamatan Anatomi Kulit

Pengamatan patologi anatomi dilakukan pada area kulit yang diberi perlakuan pada 24, 48, dan 72 jam setelah periode paparan dengan tujuan untuk menilai munculnya gejala iritasi kulit seperti eritema dan edema. Penilaian derajat iritasi dilakukan menggunakan skala arbitrer. Skor eritema ditetapkan sebagai berikut: skor 0 menunjukkan tidak terdapat eritema, skor 1 menunjukkan eritema sangat ringan (diameter < 25 mm), skor 2 menunjukkan eritema yang tampak jelas (diameter 25–30 mm), skor 3 menunjukkan eritema sedang (diameter 30–35 mm), dan skor 4 menunjukkan eritema berat (diameter > 35 mm) (67).

Penilaian edema juga menggunakan skala serupa, yaitu skor 0 menunjukkan tidak terdapat edema, skor 1 menunjukkan edema sangat ringan, skor 2

menunjukkan edema ringan dengan batas yang jelas dan pembesaran, skor 3 menunjukkan edema sedang dengan ketebalan sekitar ± 1 mm, dan skor 4 menunjukkan edema berat dengan ketebalan lebih dari 1 mm (67).

Data skor eritema dan edema yang diperoleh dianalisis untuk menentukan Indeks Iritasi Primer (*Primary Irritation Index/PII*), yang dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$PII = \frac{\text{jumlah seluruh skor eritema dan edema pada setiap waktu pengamatan}}{\text{jumlah hewan uji dan dikalikan dengan jumlah waktu pengamatan}}$$

Tingkat iritasi kulit selanjutnya ditentukan berdasarkan uji Draize, dengan kriteria sebagai berikut: nilai PII < 0,5 dikategorikan tidak mengiritasi, nilai PII 0,5–2,0 dikategorikan iritasi ringan, nilai PII 2,0–5,0 dikategorikan iritasi sedang, dan nilai PII 5,0–8,0 dikategorikan iritasi berat (67).

8. Pengumpulan dan Analisis Data

a) Pengumpulan Data

Data masing-masing hewan harus tersedia dan semua data diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan dosis uji yang digunakan, jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas, jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji, dan yang mati karena sekarat (keadaan *moribound*) (12) .

b) Analisis Data

Perubahan berat badan hewan uji sebelum dan sesudah perlakuan dianalisis menggunakan *paired t-test*, dengan tingkat signifikansi ditetapkan pada $p < 0,05$. Penentuan Indeks Iritasi Primer (*Primary Irritation Index/PII*) diklasifikasikan berdasarkan Uji Draize yang telah dimodifikasi. Kesimpulan penelitian ditetapkan berdasarkan analisis deskriptif terhadap hasil pengamatan dari masing-masing parameter yang diuji (67).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi profil keamanan awal sediaan *patch* film yang mengandung sekretom *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) melalui uji toksisitas akut dermal pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*), dengan mengacu pada pedoman OECD *Test Guideline* 402 dan Peraturan BPOM Nomor 10 Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik Secara *In Vivo*. Evaluasi keamanan sediaan ini menjadi tahapan awal yang penting, mengingat sekretom MSC merupakan komponen biologis aktif yang belum banyak dikaji profil toksisitas dermalnya secara mendalam, khususnya ketika diformulasikan dalam sistem penghantaran topikal seperti *patch* film.

Dalam penelitian ini digunakan *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) yang diperoleh secara komersial yang di produksi oleh PT. Merck Tbk yang telah memenuhi kriteria standar sel punca mesenkimal. Berdasarkan panduan dari *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee - International Society for Cellular Therapy* (ISCT), identifikasi dan karakterisasi MSC didasarkan pada tiga parameter utama. Syarat pertama, sel harus menunjukkan sifat adheren atau mampu menempel pada permukaan *flask* selama proses kultur *in vitro* standar. Kedua, hasil analisis menggunakan *flow cytometry* harus membuktikan bahwa minimal 95% populasi sel mengekspresikan *surface marker* positif berupa CD105, CD73, dan CD90. Di saat yang sama, maksimal hanya 2% sel yang boleh menunjukkan ekspresi penanda negatif seperti CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79 α atau CD19, serta HLA-DR. Syarat ketiga, MSC wajib memiliki kapasitas multipotensi untuk berdiferensiasi menjadi tiga garis keturunan jaringan mesodermal, yakni osteoblas, adiposit, dan kondroblas secara *in vitro* (68). *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) ini sendiri diperoleh dari jaringan adiposa manusia. Jaringan ini dipilih karena memiliki beberapa keunggulan seperti proses isolasi yang sederhana dan tersedia dalam jumlah yang relatif melimpah. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dari jaringan adiposa juga diketahui memiliki kemampuan dalam proliferasi dan diferensiasi serta dapat mensekresikan berbagai faktor pertumbuhan yang memiliki peranan dalam proses penyembuhan luka dan proses regenerasi jaringan (69).

Sel punca mesenkimal yang telah diperoleh kemudian dipelihara dan dikembangkan menggunakan media basal *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Pemilihan DMEM didasarkan pada superioritas formulasinya dibandingkan media pertumbuhan lain, seperti MEM- α maupun RPMI 1640. DMEM memiliki profil nutrisi yang jauh lebih kaya, dengan konsentrasi vitamin dan asam amino mencapai empat kali lipat lebih tinggi, serta kandungan glukosa dua hingga empat kali lebih masif. Secara spesifik, media standar ini tersusun atas 4500 mg/L glukosa, 4 mM L-glutamin, 1 mM sodium piruvat, dan 1500 mg/L sodium bikarbonat (70). Dalam memenuhi kebutuhan nutrisi sel selama masa pertumbuhan, media kultur kemudian diperkaya dengan agen suplementasi berupa *Fetal Bovine Serum* (FBS). FBS menjadi peran penting sebagai penyedia nutrisi utama yang merangsang dan mendukung proses proliferasi seluler. Selain itu, upaya pencegahan kontaminasi dilakukan dengan menambahkan profilaksis penisilin-streptomisin, sebuah kombinasi antibiotik yang terbukti ampuh dalam menghambat aktivitas bakteri gram positif dan gram negatif (71).

Sebelum tahapan kultur in vitro dimulai, stok sel yang sebelumnya disimpan dalam suhu rendah pada suhu -80°C harus melewati prosedur *thawing* atau pencairan. Langkah ini sangat penting untuk mengembalikan fungsi seluler dan menstabilkan kondisi sel pasca-fase dorman selama masa penyimpanan (72). Setelah proses pencairan selesai, pelet sel disuspensikan ulang ke dalam media cair untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu optimal 37°C dengan paparan gas CO_2 sebesar 5%. Pengaturan konsentrasi CO_2 ini berperan dalam mempertahankan keseimbangan derajat keasaman (pH) fisiologis agar tetap stabil pada kisaran 7,2 hingga 7,4 melalui mekanisme sistem *buffer* (penyangga) berbasis karbonat (73).

Sel punca mesenkimal kemudian menjalani proses kultur dan subkultur sebanyak lima kali atau sampai berada pada fase pertumbuhan kelima/*passage* 5 (P5). Pada fase pertumbuhan ini, sel-sel punca mesenkimal akan mulai mensekresikan *growth factor* dan berbagai komponen ekstraseluler lainnya ke dalam media kultur (74). Subkultur itu sendiri merupakan metode amplifikasi populasi sel yang dilakukan dengan cara memanen sel-sel yang telah mencapai tingkat konfluensi 80–90%, yaitu suatu kondisi di mana koloni sel telah berekspansi dan menutupi hampir seluruh area permukaan dasar *flask* (75). Proses pemanenan

atau *collecting* sekretom dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) dapat dilakukan setelah sel-sel di dalam *flask* kultur mencapai tingkat konfluensi yang dipersyaratkan. Secara fisiologis, akumulasi sekretom ini kaya akan berbagai faktor pertumbuhan (*growth factors*), yang mana produksinya akan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah populasi sel maupun perpanjangan waktu kultur menuju konfluensi optimal. Akan tetapi, tingkat kepadatan sel harus dikontrol dengan cermat. Apabila densitas populasi sel terlampaui tinggi, kemampuan atau tingkat ekspresi sel dalam mensekresikan faktor-faktor pertumbuhan tersebut justru berisiko mengalami penurunan (76).

Setelah pengumpulan sekretom, tahapan kemudian dilanjutkan dengan pembuatan sediaan topikal berupa *patch* film. Mengacu pada pedoman OECD *Test Guideline* 402 dan Peraturan BPOM Nomor 10 Tahun 2022, penelitian ini menetapkan beberapa kelompok formulasi yang terdiri dari kelompok basis sediaan dan kelompok variasi konsentrasi sekretom. Kedua regulasi tersebut dipilih sebagai acuan utama karena telah diakui secara internasional, dirancang untuk mengoptimalkan desain studi toksikologi, serta mengedepankan prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) dalam upaya meminimalkan jumlah hewan coba yang digunakan tanpa mengorbankan validitas data yang dihasilkan. Berdasarkan ketentuan dalam pedoman tersebut, apabila suatu zat aktif belum memiliki data uji fisikokimia yang memadai, maka konsentrasi yang digunakan dalam pengujian dimulai dari dosis awal 200 mg/kgBB, dilanjutkan dengan 1000 mg/kgBB, dan dosis tertinggi 2000 mg/kgBB (13).

Dalam pembuatan *patch* film dalam penelitian ini digunakan metode *solvent casting*, yaitu suatu teknik pembuatan *film* dengan cara melarutkan polimer dan bahan-bahan penyusun formula ke dalam pelarut yang sesuai hingga membentuk larutan homogen, kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dikeringkan hingga pelarut menguap dan terbentuk lapisan *film* yang padat. Metode ini dipilih karena memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan metode lainnya, di antaranya mampu menghasilkan *patch* dengan keseragaman ketebalan yang lebih baik, menghasilkan *film* yang lebih fleksibel dan elastis, serta prosesnya yang relatif sederhana (53).

Setelah sediaan *patch* film berhasil dibuat, tahapan selanjutnya melakukan evaluasi sediaan untuk memastikan kualitas sediaan sebelum diujikan secara *in vivo*

pada hewan uji. Parameter evaluasi dasar sediaan *patch* film meliputi pemeriksaan organoleptis dan homogenitas, pengujian ketebalan sediaan, pengujian ketahanan lipat, pemeriksaan pH, dan pengujian ketahanan mekanik sediaan.

Tabel 4.1 Hasil evaluasi organoleptis sediaan *patch* film dalam basis dan berbagai konsentrasi

Formula	Tampilan	Bau	Permukaan
Basis	<i>Patch</i> bening, jernih dan transparan	Tidak memiliki bau	Halus dan rata
200 mg/kgBB	<i>Patch</i> bening, jernih dan transparan	Tidak memiliki bau	Halus dan rata
1000 mg/kgBB	<i>Patch</i> bening, jernih dan transparan	Tidak memiliki bau	Halus dan rata
2000 mg/kgBB	<i>Patch</i> bening, jernih dan transparan	Tidak memiliki bau	Halus dan rata

Pemeriksaan organoleptis dan homogenitas dilakukan untuk mengamati konsistensi bentuk fisik, warna, dan tekstur permukaan *patch* secara visual. Berdasarkan **Tabel 4.1**, hasil pengamatan organoleptis sediaan *patch* yang telah dibuat menunjukkan bahwa seluruh formula baik basis maupun yang terdapat sekretom menghasilkan sediaan dengan penampilan yang jernih dan transparan, permukaan yang halus dan rata, tidak terdapat gelembung udara, tidak berbau, serta menunjukkan keseragaman warna yang homogen pada seluruh bagian *patch*. Kejernihan sediaan *patch* film menandakan bahwa proses pelarutan dan pencampuran bahan-bahan penyusun formula berlangsung dengan baik dan sempurna, sehingga tidak terdapat partikel yang tidak terlarut maupun endapan yang dapat mempengaruhi kualitas sediaan. Tidak adanya gelembung udara pada permukaan *patch* menunjukkan bahwa proses penuangan dan pengeringan (*solvent casting*) dilakukan secara optimal, karena keberadaan gelembung dapat menyebabkan ketidakseragaman ketebalan yang berdampak pada pelepasan zat aktif. Tekstur permukaan yang halus dan rata mencerminkan keberhasilan proses pembentukan matriks polimer secara merata, sehingga diharapkan kenyamanan penggunaan pada kulit dapat terjaga dengan baik. Tidak adanya bau yang khas pada sediaan mengindikasikan bahwa pelarut organik yang digunakan dalam proses pembuatan telah menguap secara sempurna selama proses pengeringan (77). Homogenitas sediaan yang baik menunjukkan bahwa zat aktif dan eksipien

terdistribusi secara merata di seluruh matriks *patch*, yang merupakan parameter penting untuk menjamin keseragaman dosis dan efektivitas terapi (78). Secara keseluruhan, hasil uji organoleptis seluruh formula *patch* memenuhi persyaratan sediaan *patch* yang baik.

Tabel 4.2 Hasil evaluasi ketebalan, daya lipat dan pH sediaan *patch* film dalam basis dan berbagai konsentrasi

Formula	Rata-rata ketebalan	Rata-rata daya lipat	Rata-rata pH
Basis	$0,0549 \pm 0,00340$ mm	$307x \pm 0,58$	6,47
200 mg/kgBB	$0,0579 \pm 0,00160$ mm	$305x \pm 1,53$	7,15
1000 mg/kgBB	$0,0879 \pm 0,02450$ mm	$302x \pm 2,00$	7,27
2000 mg/kgBB	$0,0941 \pm 0,01450$ mm	$301x \pm 2,00$	7,41

Pengujian keseragaman ketebalan dilakukan untuk memastikan keseragaman distribusi zat aktif pada seluruh matriks sediaan. *Patch* yang terlalu tebal dapat mempengaruhi pelepasan obat, semakin tebal *patch* maka pelepasan obat akan semakin lambat sehingga mempengaruhi timbulnya efek terapeutik yang diharapkan. Persyaratan ketebalan *patch* yaitu tidak lebih dari 1 mm (79).

Berdasarkan **Tabel 4.2**, rata-rata ketebalan sediaan *patch* baik basis maupun yang mengandung sekretom menghasilkan nilai ketebalan yang berada di bawah 1 mm sehingga seluruh formula memenuhi persyaratan ketebalan sediaan *patch*. Peningkatan nilai ketebalan yang terjadi seiring dengan meningkatnya konsentrasi sekretom menunjukkan bahwa penambahan sekretom turut berkontribusi terhadap massa matriks polimer yang terbentuk. Peningkatan nilai ini disebabkan karena polimer yang secara signifikan meningkatkan ketebalan *patch*, sehingga menyebabkan kemampuannya menyerap lembab dari udara dan meningkatkan ketebalan *patch* (79).

Uji ketahanan lipat (*folding endurance*) juga menjadi parameter esensial untuk membuktikan fleksibilitas mekanik sediaan *patch* saat digunakan pada kulit. *Patch* yang tidak mengalami sobekan atau dapat dilipat hingga lebih dari 300 kali lipatan dianggap memiliki nilai daya tahan lipatan yang baik (78).

Berdasarkan hasil evaluasi pada **Tabel 4.2**, rata-rata daya tahan lipatan pada seluruh formula baik basis dan yang mengandung sekretom menghasilkan nilai daya tahan lipatan yang memenuhi persyaratan, yaitu masing-masing menghasilkan

nilai lebih dari 300 kali lipatan. Nilai daya tahan lipatan pada seluruh formula menunjukkan bahwa matriks polimer yang terbentuk memiliki fleksibilitas dan elastisitas yang cukup untuk menahan tekanan mekanis berulang tanpa mengalami kerusakan struktural berupa sobekan maupun retakan. Hal ini juga mengindikasikan bahwa peningkatan konsentrasi sekretom tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan sifat mekanis *patch*, sehingga sediaan dinilai aman dan nyaman untuk diaplikasikan pada permukaan kulit yang dapat bergerak secara dinamis (78).

Pengujian pH juga dilakukan untuk memastikan sediaan *patch* aman digunakan pada kulit dan tidak menyebabkan iritasi. Nilai pH yang disyaratkan berada dalam rentang pH yang tidak mengiritasi kulit, yaitu 5 - 6,5 (78). Berdasarkan hasil evaluasi pada **tabel 4.2**, rata-rata pH formula Basis (pH 6,47) memenuhi persyaratan karena berada dalam rentang pH 5 - 6,5. Sementara itu, formula 200 mg/kgBB (pH 7,15), formula 1000 mg/kgBB (pH 7,27), dan formula 2000 mg/kgBB (pH 7,41) menunjukkan nilai pH yang melebihi batas persyaratan 5 - 6,5. Peningkatan pH yang terjadi seiring meningkatnya konsentrasi sekretom kemungkinan disebabkan oleh sifat basa dari sekretom yang ditambahkan, sehingga memengaruhi keseimbangan asam-basa pada matriks *patch* secara keseluruhan (77). Sekretom stem cell sendiri memiliki rentang pH 7,2 - 7,4, pH tersebut menyesuaikan pada kondisi fisiologis tubuh. Sehingga peningkatan pH yang terjadi tidak menjadi masalah karena tidak mengiritasi kulit saat penggunaan *patch* film.

Tabel 4.3 Hasil evaluasi ketahanan mekanik sediaan *patch* film dalam basis dan berbagai konsentrasi

Formula	Rata-rata <i>tensile</i> (N/mm ²)	Rata-rata persenatse elongasi
Basis	11,421 ± 2,016	32,364 ± 2,633
200 mg/kgBB	10,513 ± 3,374	36,162 ± 14,860
1000 mg/kgBB	9,775 ± 1,423	41,427 ± 2,524
2000 mg/kgBB	6,544 ± 1,699	43,448 ± 2,271

Evaluasi sifat mekanik sediaan *patch* film dilakukan menggunakan instrumen *Universal Testing Machine* (UTM). Prinsip dasar pengujian ini bertumpu pada pemberian gaya tarik secara kontinu pada sediaan hingga film tersebut mengalami kerusakan struktural atau terputus. Terdapat dua parameter utama yang

diamati, yakni *tensile strength* (kuat tarik) dan persentase elongasi. *Tensile strength* merepresentasikan besaran gaya tarik maksimum yang mampu dipertahankan oleh matriks film sebelum robek, yang berfungsi untuk mengukur tingkat ketangguhan sediaan. Sementara itu, persentase elongasi menunjukkan rasio pertambahan panjang sediaan pada titik putus terhadap dimensi panjang awalnya, yang menjadi indikator tingkat elastisitas dan fleksibilitas *patch* film (80).

Berdasarkan hasil evaluasi pada **Tabel 4.3**, rata-rata persentase elongasi pada seluruh formula baik basis dan yang mengandung sekretom menunjukkan hasil yang baik, yang mana ditunjukkan dengan nilai rata-rata diatas 30%. Penelitian oleh Prajapati, dkk (2011) dengan menggunakan metode yang sama, diperoleh hasil persentase elongasi sebesar 35,8% yang menunjukkan kekuatan mekanik dan fleksibilitas *patch* yang baik yang tidak mudah robek selama penggunaan (81). Adanya peningkatan persentase elongasi seiring dengan bertambahnya konsentrasi zat aktif, mengindikasikan bahwa penambahan sekretom berperan dalam meningkatkan elastisitas matriks *patch*. Nilai elongasi yang lebih tinggi mencerminkan kemampuan *patch* untuk mengikuti pergerakan kulit lebih baik sehingga memberikan kenyamanan yang lebih optimal dalam penggunaan (77).

Pada evaluasi *tensile strength*, berdasarkan **Tabel 4.3**, terjadi penurunan nilai *tensile strength* seiring dengan meningkatnya konsentrasi sekretom. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi sekretom cenderung menurunkan kekuatan tarik matriks *patch*. Kondisi ini kemungkinan disebabkan oleh pengaruh sekretom terhadap kerapatan jaringan matriks polimer, di mana sekretom yang bersifat hidrofilik dapat melemahkan ikatan antarmolekul polimer sehingga mengurangi kekuatan tarik sediaan (77).

Penelitian kemudian dilanjutkan dengan pengujian sediaan *patch* film secara *in vivo* pada hewan uji tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai subjek penelitian. Sebelum dilakukan pengujian, tahapan awal adalah melakukan aklimatisasi terhadap hewan uji, aklimatisasi dilakukan guna memfasilitasi adaptasi hewan terhadap kondisi lingkungan yang baru, meminimalisasi respons stres akibat proses transportasi atau perubahan habitat, serta memastikan stabilitas sistem fisiologis hewan agar tidak menjadi faktor perancu yang dapat memengaruhi validitas hasil

pengujian toksisitas (82). Selama masa pemeliharaan, hewan ditempatkan dalam kandang beralaskan sekam dengan ukuran luas dasar 350 cm² dan tinggi 18 cm. Kondisi ruang eksperimental dikontrol secara ketat untuk menciptakan lingkungan yang minim stres, dengan parameter suhu ruangan $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dan penerapan siklus pencahayaan terang dan gelap yang seimbang. Kebutuhan nutrisi harian dipenuhi melalui pemberian pakan pelet komersial standar laboratorium sebanyak 20 gram per ekor, sementara air minum disediakan secara tidak terbatas (*ad libitum*) (12). Setelah di aklimatisasi selama 7 hari, hewan uji dianggap layak digunakan dalam pengujian karna dinilai memenuhi syarat proses aklimatisasi yang mana ditandai dengan perilaku hewan yang aktif namun tidak agresif, pola konsumsi pakan dan minum yang teratur, suhu tubuh serta denyut jantung yang berada pada rentang normal, dan tidak terjadinya penurunan bobot badan (13).

Persiapan hewan uji dengan proses pembersihan rambut menggunakan alat cukur dan krim perontok rambut-rambut halus dilakukan 24 jam sebelum pemaparan sediaan. Area pencukuran difokuskan pada bagian punggung dengan luas dimensi sekitar 6 x 8 cm², yang merepresentasikan kurang lebih 10% dari total luas permukaan tubuh tikus. Untuk meminimalisasi stres mekanis dan respons nyeri, prosedur pembersihan diiringi dengan pemberian agen anestesi eter. Proses pembersihan rambut ini dieksekusi secara presisi dan sangat berhati-hati untuk memastikan lapisan *stratum korneum* pada dermis tidak mengalami perlukaan, sehingga tidak menimbulkan reaksi iritasi palsu sebelum pengujian dimulai (13).

Pada tahap perlakuan, sediaan *patch* film yang mengandung sekretom MSC diaplikasikan secara topikal tepat pada area kulit punggung yang telah bebas dari bulu. Pemaparan sediaan dibiarkan berlangsung selama 24 jam secara kontinu. Setelah periode kontak tersebut berakhir, plester dilepaskan secara perlahan, kemudian sisa residu sediaan yang mungkin masih tertinggal di permukaan kulit dibersihkan menggunakan air suling (*aquadest*) sebelum dilakukan pengamatan patologi anatomi kulit terhadap munculnya eritema maupun edema (13).

Pada tahapan awal sebelum pelaksanaan uji toksisitas akut dermal utama, terlebih dahulu dilakukan uji penentuan rentang dosis (*dose range finding/DRF*) untuk mengidentifikasi rentang konsentrasi yang aman dan relevan secara toksikologis. Prosedur ini merujuk pada panduan OECD *Test Guideline* 402 (*Acute*

Dermal Toxicity) serta Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Nomor 10 Tahun 2022. Pengujian DRF bertujuan untuk menetapkan dosis yang akan digunakan pada uji utama. Pada metode OECD 402, uji DRF dilakukan menggunakan tabel alir (*flowchart procedure*) yang bersifat sekuensial, di mana pemberian dosis dimulai dari konsentrasi awal dan dilanjutkan berdasarkan hasil observasi tiap kelompok perlakuan selama 14 hari. Metode ini meminimalkan penggunaan hewan uji sekaligus tetap menghasilkan data yang valid sesuai prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) dalam penggunaan hewan percobaan (13).

Tabel 4.4 Hasil pengujian penentuan rentang dosis pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

Parameter	Perlakuan				
	Basis	Kontrol	200 mg/kgBB	1000 mg/kgBB	2000 mg/kgBB
Observasi klinis	Tidak ada kematian atau gejala klinis yang terlihat	Tidak ada kematian atau gejala klinis yang terlihat	Tidak ada kematian atau gejala klinis yang terlihat	Tidak ada kematian atau gejala klinis yang terlihat	Tidak ada kematian atau gejala klinis yang terlihat
Indeks iritasi primer	0 (Tidak mengiritasi)	0 (Tidak mengiritasi)	0 (Tidak mengiritasi)	0 (Tidak mengiritasi)	0 (Tidak mengiritasi)
Berat Badan	+ 8 gram	+ 4 gram	+ 6 gram	+ 6 gram	+ 5 gram

Observasi klinis dilakukan secara sistematis setiap hari meliputi pemantauan terhadap perubahan perilaku (seperti aktivitas motorik, refleks, dan respons terhadap rangsangan), kondisi fisik umum (postur tubuh, kondisi bulu, dan kondisi mata), serta tanda-tanda toksisitas lokal di area aplikasi seperti eritema, dan edema. Berdasarkan **Tabel 4.4**, hasil observasi klinis pada seluruh kelompok perlakuan (basis, kontrol, 200 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB) menunjukkan tidak ditemukannya kematian maupun gejala klinis yang nyata selama periode pengamatan yang masing-masing dilakukan secara berurutan selama 14 hari. Sesuai dengan prosedur tabel alir OECD 402, apabila pada uji DRF tidak ditemukan kematian pada dosis 2000 mg/kgBB, maka dosis tertinggi tersebut

dapat ditetapkan sebagai batas atas pada uji toksisitas akut utama dengan mempertahankan kelompok basis dan kontrol sebagai pembanding.

Tahapan kemudian dilanjutkan dengan uji toksisitas akut dermal utama yang dilaksanakan berdasarkan hasil uji penentuan rentang dosis (DRF) yang telah ditetapkan sebelumnya, di mana tidak ditemukan kematian maupun gejala toksisitas pada rentang dosis 200 - 2000 mg/kgBB. Sesuai dengan prosedur tabel alir OECD 402, uji utama dilakukan pada dosis tertinggi yaitu 2000 mg/kgBB dengan dua hewan uji per perlakuan (13).

Tabel 4.5 Hasil pengujian utama kelompok basis, kontrol, dan konsentrasi 2000 mg/kgBB terhadap tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

Parameter	Perlakuan					
	Basis (1)	Basis (2)	Kontrol (1)	Kontrol (2)	2000 mg/kgBB (1)	2000 mg/kgBB (2)
Perubahan pada kulit dan rambut	-	-	-	-	-	-
Perubahan pada mata dan selaput lendir	-	-	-	-	-	-
Gangguan Sistem pernapasan	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Perubahan perilaku	-	-	-	-	-	-
Aktivitas somatomotorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Kematian	Tidak terjadi kematian	Tidak terjadi kematian	Tidak terjadi kematian	Tidak terjadi kematian	Tidak terjadi kematian	Tidak terjadi kematian

Berdasarkan **Tabel 4.5**, hasil observasi klinis selama 14 hari menunjukkan tidak ditemukan adanya gejala klinis toksisitas yang terjadi seperti perubahan pada kulit dan rambut, perubahan pada mata dan selaput lendir, maupun perubahan perilaku pada seluruh kelompok perlakuan. Aktivitas somatomotrik dan kondisi sistem pernapasan pada semua kelompok percobaan berada dalam batas normal. Tidak adanya gangguan aktivitas somatomotrik mengindikasikan bahwa sekretom

MSC yang terpapar secara dermal tidak menimbulkan efek neurotoksik yang berpengaruh pada sistem saraf pusat.

Tidak adanya kelainan pada mata dan selaput lendir seperti lakrimasi (keluarnya air mata secara berlebihan) dan hiperemia (kemerahan akibat peningkatan aliran darah) merupakan tambahan bukti bahwa sediaan tidak menimbulkan absorpsi sistemik yang bermakna melalui kulit yang dapat mencapai organ-organ target. Hal ini dapat dijelaskan melalui sifat fisikokimia molekul-molekul bioaktif penyusun sekretom MSC yang memiliki berat molekul jauh melampaui ambang batas penetrasi transdermal. Berdasarkan prinsip 500 Dalton Rule yang dikemukakan oleh Bos dan Meinardi (2000), hanya molekul dengan berat molekul di bawah 500 Da yang mampu menembus *stratum corneum* secara pasif (83). Berat rata-rata berat molekul komponen bioaktif terlarut sekretom MSC berkisar antara 25–90 kDa atau setara dengan 25.000–90.000 Da, jauh di atas batas 500 Da yang dipersyaratkan untuk penetrasi transdermal pasif (84). Dengan demikian, molekul-molekul bioaktif sekretom MSC hanya bekerja secara lokal di permukaan kulit tanpa mencapai sirkulasi sistemik dalam jumlah yang bermakna secara toksikologis, sehingga menjelaskan tidak ditemukannya tanda-tanda toksisitas sistemik pada seluruh kelompok perlakuan.

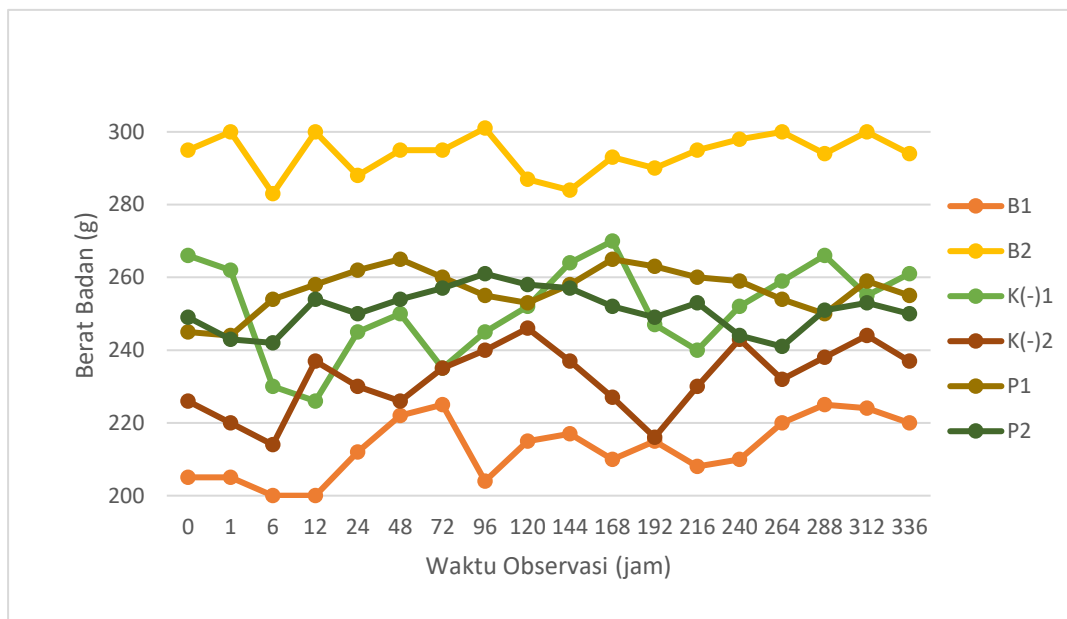
Tabel 4.6 Hasil pengujian indeks iritasi primer kelompok basis, kontrol, dan konsentrasi 2000 mg/kgBB terhadap tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Skor Iritasi		Rata-rata	PPI	Hasil
	Edema	Eritema			
Basis (1)	0	0	0	0	Tidak mengiritasi
Basis (2)	0	0			
Kontrol (1)	0	0	0	0	Tidak mengiritasi
Kontrol (2)	0	0			
2000 mg/kgBB (1)	0	0	0	0	Tidak mengiritasi
2000 mg/kgBB (2)	0	0			

Evaluasi indeks iritasi primer (PII) juga merupakan parameter penting dalam uji toksisitas akut dermal yang dihitung berdasarkan sistem scoring Draize, mencakup skor eritema dan edema pada 24 dan 72 jam pascapaparan. Berdasarkan **Tabel 4.6**, nilai PII pada seluruh kelompok perlakuan adalah nol untuk semua parameter skor edema maupun eritema yang mana hal ini menunjukkan tidak

terjadinya edema dan eritema pada semua kelompok perlakuan. Nilai PII = 0 dikategorikan sebagai tidak mengiritasi berdasarkan klasifikasi Draize yang umum digunakan, di mana rentang PII 0,0–0,4 menunjukkan kategori tidak iritatif (85).

Nilai PII = 0 pada semua kelompok, termasuk kelompok dosis 2000 mg/kgBB, membuktikan bahwa formulasi patch sekretom MSC tidak bersifat iritatif terhadap kulit tikus secara lokal. Meskipun nilai pH formula *patch* yang mengandung sekretom (7,15–7,41) berada sedikit di atas rentang pH kulit normal (5–6,5), ketidaksesuaian nilai pH tersebut tidak berdampak pada keamanan klinis karena sekretom merupakan komponen biologis endogen yang memiliki biokompatibilitas tinggi serta bersifat isohidris terhadap kondisi fisiologis tubuh, sehingga kondisi tersebut masih dapat ditoleransi oleh kulit dan tidak menimbulkan respons iritasi secara biologis (86). Selain itu, hasil ini didukung oleh mekanisme *skin buffering capacity* yang memungkinkan kulit menetralkan pergeseran pH sediaan serta profil fisiologis kulit tikus yang cenderung memiliki pH lebih netral dibandingkan manusia dengan rentang berkisar antara 6,5 hingga 7,5, sehingga peningkatan pH pada formulasi dipastikan tidak menimbulkan risiko iritasi lokal saat diaplikasikan (87). Hasil ini konsisten dengan temuan pada uji DRF sebelumnya. Komponen matriks polimer patch juga telah diketahui memiliki biokompatibilitas yang baik sehingga berkontribusi terhadap profil non-iritatif sediaan ini.



Keterangan : B1 = Basis 1, B2 = Basis 2, K1 = Kontrol 1, K2 = Kontrol 2, P1 = Sekretom konsentrasi 2000 mg/kgBB 1, P2 = Sekretom konsentrasi 2000 mg/kgBB 2

Gambar 4.1 Grafik berat badan tikus selama masa observasi

Pemantauan berat badan (BB) juga dilakukan guna mendeteksi toksisitas sistemik dalam uji toksisitas akut dermal. Penurunan berat badan hewan uji yang signifikan, yaitu lebih dari 10% dari berat badan awal merupakan indikator klinis yang umum digunakan untuk mendeteksi adanya toksisitas sistemik akibat paparan zat biologis (88). Menurut Hayes (2014), penurunan massa tubuh yang persisten selama masa observasi mengindikasikan adanya gangguan metabolik atau respons toksik sistemik yang timbul akibat penyerapan zat aktif melalui kulit. Oleh karena itu, pemantauan berat badan secara berkala menjadi parameter krusial dalam uji toksisitas akut dermal untuk memastikan keamanan sediaan bagi subjek uji (61). Analisis statistik dilakukan menggunakan uji *paired t-test* terhadap perubahan BB dari baseline selama seluruh periode observasi 14 hari, dengan tingkat signifikansi ditetapkan pada $p < 0,05$.

Tabel 4.7 Hasil uji *paired t-test* dan persentase perubahan berat badan tikus selama 14 hari

Perlakuan	BB Awal (g)	BB Hari ke-14 (g)	Perubahan BB (g)	Persentase Perubahan BB (%)	p-value	Keterangan
Basis data 1 dan 2	250,0 ± 63,64	257,0 ± 52,33	+7,0	+2,80	0,542	Tidak berbeda signifikan
Kontrol data 1 dan 2	246,0 ± 28,28	249,0 ± 16,97	+3,0	+1,22	0,772	Tidak berbeda signifikan
2000 mg/kgBB data 1 dan 2	247,0 ± 2,83	252,5 ± 3,54	+5,5	+2,23	0,437	Tidak berbeda signifikan

Hasil pengamatan selama periode observasi 14 hari menunjukkan bahwa seluruh kelompok mengalami peningkatan berat badan, dengan persentase kenaikan sebesar 2,80% pada kelompok basis sediaan, 1,22% pada kelompok kontrol, dan 2,23% pada kelompok patch sekretom dosis 2000 mg/kgBB. Hasil analisis menggunakan uji *paired t-test* menunjukkan bahwa perubahan berat badan pada kelompok basis sediaan ($p = 0,542$), kelompok kontrol ($p = 0,772$), dan kelompok patch sekretom dosis 2000 mg/kgBB ($p = 0,437$) tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian patch sekretom MSC hingga dosis 2000 mg/kgBB tidak menyebabkan perubahan berat badan yang bermakna secara statistik. Selain itu, tidak ditemukan penurunan berat badan yang melebihi 10% dari berat badan awal selama periode pengamatan, sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan patch sekretom MSC tidak menimbulkan toksisitas sistemik yang ditinjau berdasarkan parameter perubahan berat badan.

Mengacu pada OECD 402 dan Peraturan BPOM No. 10 Tahun 2022, karena tidak ditemukan kematian, gejala klinis maupun perubahan berat badan pada dosis tertinggi 2000 mg/kgBB maka sediaan *patch* sekretom MSC dapat dikatakan aman secara toksikologis untuk pemaparan dermal akut hasil ini dapat dijadikan dasar yang layak untuk dilanjutkan pada tahap pengembangan dan uji klinis berikutnya.

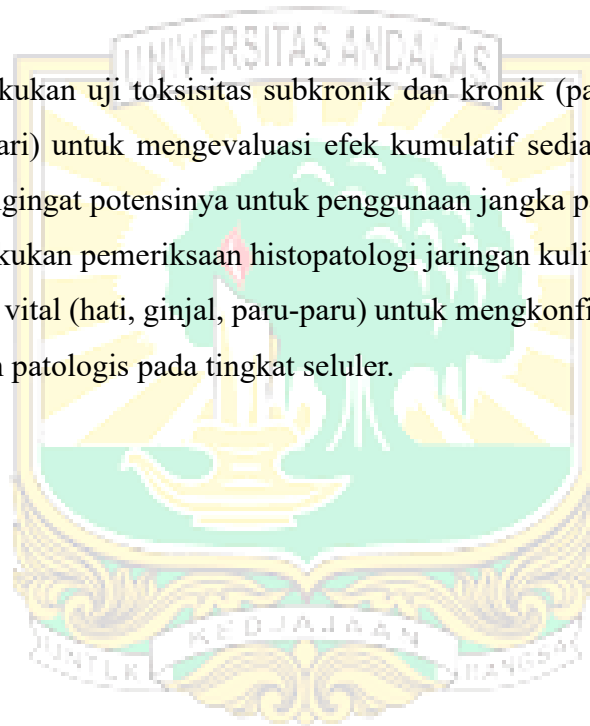
V. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemberian sediaan *patch* film sekretom tidak menimbulkan efek toksik maupun gejala klinis akut dermal pada tikus.
2. Pemberian sediaan *patch* film sekretom tidak menimbulkan perubahan berat badan pada tikus.
3. Pemberian sediaan *patch* film sekretom tidak menimbulkan kematian atau mortalitas pada tikus.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji toksisitas subkronik dan kronik (paparan berulang 28 atau 90 hari) untuk mengevaluasi efek kumulatif sediaan *patch* sekretom MSC mengingat potensinya untuk penggunaan jangka panjang.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi jaringan kulit pada area aplikasi dan organ vital (hati, ginjal, paru-paru) untuk mengkonfirmasi tidak adanya perubahan patologis pada tingkat seluler.



DAFTAR PUSTAKA

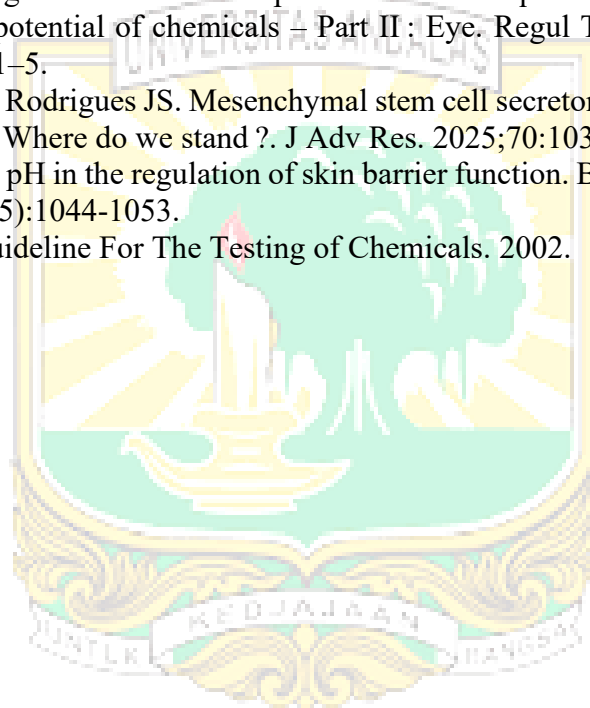
1. Narode R, Saruk V, Garad M, Wani P. Therapeutic Advance in Transdermal Drug Delivery Systems , Enhancing Efficiency Through the Skin. 2025;2(11):221–30.
2. Paudel KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Stinchcomb AL. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther Deliv*. 2010;1(1):109–31.
3. Banerjee PS, Animesh C, Ghosh MP, Singh PS. Acute Dermal Irritation, Sensitization, and Acute Toxicity Studies of a Transdermal Patch for Prophylaxis Against ($\pm$) Anatoxin-A Poisoning. *Int J Toxicol*. 2013;1–6.
4. Qa J, Lesta ND, Wahyuni S. Kajian Literatur : Peran Sifat Fisika-Kimia Obat Dalam Efektivitas Sistem Penghantaran Transdermal Patch. *J Ilmu Teknol Kesehatan, dan Hum*. 2025;6(4):114–23.
5. Fauzi MF. Formulasi dan Evaluasi Patch Film dari Secretome MSC (Mesenchymal Stem Cell). [skripsi] Fakultas Farmasi. Universitas Andalas; 2025.
6. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(63):1–9.
7. Ignat S rebecca N, Gharbia S, Hermenean A. Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells' (MSCs) Secretome for Liver Fibrosis Therapies. *Int J Mol Sci*. 2021;22:1–16.
8. Putri MI, Marlina, Sudji IR. Future Acne Therapy MSC Secretome as an Antimicrobial Agent : Literature Review. *J Biol Trop*. 2025;25:507–12.
9. Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application : A Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021;14:1401–12.
10. Ha DH, Kim S don, Lee J, Kwon HH, Park G hun. Toxicological evaluation of exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020.
11. Liu S, Deng T, Cheng H. Advances in Transdermal Drug Delivery Systems and Clinical Applications in Inflammatory Skin Diseases. *Pharmaceutics*. 2025;17(746):1–28.
12. BPOM RI. Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik Secara In Vivo. 2022;(490).
13. OECD. Acute Dermal Toxicity : Fixed Dose Procedure. 2017;(402).
14. Meza MA, Hermawati E. Dermal Acute Toxicity Test. *Int J Soc Heal*. 2024;3(9):624–9.
15. Lachman L. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. III. 1994.
16. Kalangi S. Histofisiologi kulit. *Jurnal Biomedik*. 2013;12–20.
17. Touitou E, Barry BW. Enhancement in Drug Delivery. 2010.
18. Tranggono RI, Latifah F. Buku pegangan ilmu pengetahuan kosmetik. 2007;
19. Dash GK, Murthy PN. Would Healing Effect of *Ageratum Conyzoides* Linn. *Pharma Bio Sci*. 2011;2(2):369.

20. JM A, JP D, RH G. Biofarmasi dan farmasetika. 2nd ed. Surabaya: Airlangga University; 1993.
21. Swarbrick J, Boylan J. Percutaneous absorption. In: Pharmaceutical Technology. 1995.
22. Moghimi H, Williams A, Barry B. Penetration pathways through the stratum corneum. *Drugs Cosmet Mech Methodol*. 1999;3:135–55.
23. Suparno A, Rubinadzari N, Kasasiah A. Generasi Berikutnya: Sel Punca Mesenkim Sebagai Sistem Penghantaran Obat Berbasis Sel. *Maj Farmasetika*. 2022;7(2):121–40.
24. Santi. Peranan Sel Punca dalam Penyembuhan Luka. *Contin Professional Dev*. 2018;45(5):374–9.
25. Zizhen S, Wang X, Changhui S. Adipose-derived stem cells : Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother*. 2019;114.
26. Hartono B, Evans M, Smithies O. Sel Punca : Karakteristik , Potensi dan Aplikasinya. *J Kedokt meditek*. 2016;22(60):72–25.
27. Chang L, Fan W, Pan X, Zhu X. Stem cells to reverse aging. *Chin Med J (Engl)*. 2022;135(8):901–10.
28. Azab AE, Abofila M, Azab AE, Shebani A, Bshena A. Stem Cells : Insights into Niche, Classification, Identification, Characterization, Mechanisms of Regeneration by Using Stem Cells, and Applications in Joint Disease Remedy. *Biotechnol Bioprocess*. 2021;2(1):1–7.
29. Widowati W, Noverina R, Ayuningtyas W, Kurniawan D, Arumwardana S, Rizal R, et al. Potential of Conditioned Medium of hATNSCs in Agung Cells Model. *J Biosci*. 2022;29(3):378–88.
30. Zakrzewski W, Dobrzy M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells : past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(68):1–22.
31. Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in. *Biomed Res Int*. 2014;1–14.
32. Rosita C, Prakoeswa S, Tinduh D, Notobroto HB, Rantam FA, Utomo DN, et al. The potential of mesenchymal stem - cell secretome for regeneration of intervertebral disc : A review article. *Indones J Biotechnol*. 2021;26(2):61–75.
33. Bayu DT, Ramdhani Dinie K. Prospek media sel punca jaringan adiposa terkondisi sebagai anti aging. *J Kedokt Unram*. 2021;
34. Putri WE, Cita RS, Anang E, Rantam FA. Mesenchymal Stem cell-Conditioned Medium (secretome) in skin aging : A systematic review. *J Pharm Res*. 2021;13(2).
35. Widhiastuti SS. Aplikasi Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal dalam Terapi Penyakit Degeneratif dan Penyembuhan Luka. *J Ilm Ilmu-Ilmu Hayati*. 2020;5(1):48–60.
36. Teixeira F, Salgado A. Mesenchymal stem cells secretome : current trends and future challenges. *Neural Regen Res*. 2020;15(1):75–7.
37. Khumairoh I, Puspitasari IM. Kultur Sel. *Farmaka Suplemen*. 2016;14(2):98–110.
38. Elida N. Pengaruh Conditioned Medium - Synovial Membrane Mesenchymal Stem Cell (Cm-Smmsc) Terhadap Ekspresi Gen Kondrogenik Pada Model Osteoarthritis. Universitas Andalas; 2019.

39. AATC. Animal Cell Culture Guide. Manassas. 2014.
40. Siepmann J, Siepmann F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J Control Release*. 2012;161(2):351–62.
41. Ita K. Transdermal drug delivery : progress and challenges. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2014;24(3):245–50.
42. Cherukuri S, Batchu UR, Mandava K. Formulation and evaluation of transdermal drug delivery of topiramate. *Int J Pharm Investig*. 2017;7(1):10–7.
43. Article R, Shaikh N, Srivastava R. A review on transdermal drug delivery through patches. *IP Indian J Clin Exp Dermatology*. 2024;10(2):113–21.
44. Patel R. A Review on Topical Drug Delivery System Patches. *Int J Pharm Res Appl*. 2022;7(1):292–302.
45. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2009;26(11):1261–8.
46. Yuliani G. Gambaran Umum tentang Polimer. 2021. 1–41
47. Pacheco MS, Barbieri D. A review on orally disintegrating films (ODFs) made from natural polymers such as pullulan , maltodextrin , starch , and others. *Int J Biol Macromol*. 2021;178:504–13.
48. Tengku RF, Nuwarda RF. Teknologi Sediaan Oral Lapis Tipis Terlarut Cepat (Fast Dissolving Film). *Maj Farmasetika*. 2018;3(3):58–68.
49. Nasrullah F. Alginat Dengan Perasan Daun Binahong Sebagai Wound Dressing Antibakteri. 2015.
50. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. London; 2006.
51. Afifah N. Evaluation of Plasticizer Addition in Composite Edible Coating on Quality of Fresh-Cut Mangoes during Storage Evaluation of Plasticizer Addition in Composite Edible Coating on Quality of Fresh-Cut Mangoes during Storage. *Earth Environ Sci*. 2019;1–10.
52. Krisnadi R, Handarni Y, Udyani K. Pengaruh Jenis Plasticizer Terhadap Karakteristik Plastik Biodegradable dari Bekatul Padi. *Semin Nas Sains dan Teknol Terap*. 2019;125–30.
53. Arya A, Chandra A. Fast Dissolving Oral Films : An Innovative Drug Delivery System and Dosage Form. *Int J ChemTech Res*. 2010;2(1):576–83.
54. Hasanah U. Pengaruh Tekanan Compression Moulding terhadap Kinerja Pelat Bipolar Komposit Grafit / Resin Epoksi Komposisi 20 % Karbon Tempurung Kelapa. *J Mek Terap*. 2020;1(1):71–80.
55. Irfan M, Rabel S. Orally disintegrating films : A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharm J*. 2016;24(5):537–46.
56. Ran H, Dale M, Ritter J. Pharmacology. 7th ed. 2012.
57. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research : a review. *Lab Anim Res*. 2022;38(18):1–17.
58. Klaassen C. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 8th ed. McGraw-Hill, editor. New York; 2013.
59. Xia Q. Acute Toxicity: Mechanisms, Measurement and Implications. *Farmacol Toxicol*. 2024;14(6):55.
60. Byung mu L, Sam K, Kim H sik. Lu's basic toxicology : fundamentals, target organs, and risk assessment. 7th ed. Taylor & Francis Group, editor. USA;
61. Hayes AW, Kobets T. Hayes' Principles and Methods of Toxicology. 7th ed.

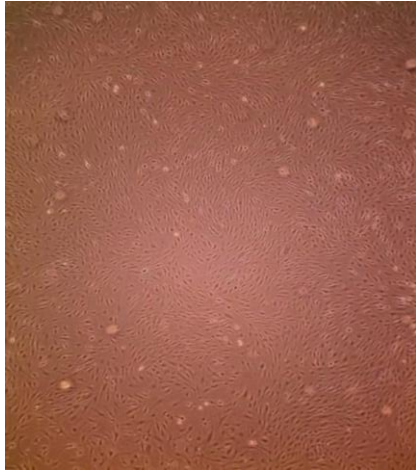
- CRC Press; 2024.
62. Nations U. Globally Harmonized System Of Classification And Labelling Of Chemicals. 5th ed. New York; 2013.
 63. Williams PL, James RC. Principles Of Toxicology. 2nd ed. John Wiley & Sons I, editor. New York; 2000.
 64. Pradifta R, Lucida H, Sudji IR. Formulation Of Mesenchymal Stem Cell Secretome As Antiaging Cream. *Int J Appl Pharm.* 2023;15(1):45–50.
 65. Design SL. Optimasi Formula Sediaan Krim M / A Dari Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa acuminata L .*) Optimization Of M / A Cream Formula From Kepok Banana Peel (*Musa acuminata L .*) Extract. *J Ris kefarmasian Indones.* 2019;1(3):225–37.
 66. Borbolla-jim F, Peña-corona S, Farah S. Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique. *Pharmaceutics.* 2023;15(1914):1–27.
 67. Gede M, Surya A, Sudira IW, Merdana IM, Agung A, Oka G. Evaluation of Acute Dermal Toxicity of Hibiscus Leaves as Simplicial Ointment on Albino Rats. *J Med Vet.* 2023;6(2):216–29.
 68. Bhattarai E, Almutawa YM, Gautam N. Stem Cells and Their Potential Applications in Dermatology. *J Stem Cells Res Dev Ther.* 2020;6(043):1–6.
 69. Chu D toi, Nguyen T. Adipose Tissue Stem Cells for Therapy : An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application. *J Clin Med.* 2019;8(7):917.
 70. Andiana M, Rachmawati Y, Sri SA. Kultur sel Baby Hamster Kidney (BHK) menggunakan media Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM). *J Trop Biol.* 2017;1(1):1–8.
 71. Zhanqiu Y, Xiong HR. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells Chapter. *InTech;* 2012.
 72. Noviantari A. Ragam penelitian dan pengembangan isolasi dan kultur sel punca mesenkim dari berbagai sumber. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.* 2020;6:611–8.
 73. Segeritz C p, Vallier L. Cell Culture : Growing Cells as Model Systems In Vitro. 2020.
 74. Phelps J, Sanati-nezhad A, Ungrin M. Review Article Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives : Toward Cell-Free Therapeutics. *Hindawi Stem Cells Int.* 2018;2018(iii):1–23.
 75. Noviantari A, Febrianti T. Kajian: Alternatif Pengganti Trypsin pada Kultur Sel Punca Mesenkim. *Prosiding Seminar Nasional Riset Kedokteran (SENSORIK II).* 2021.
 76. Chouaib B, Haack-sørensen M, Chaubron F, Cuisinier F. Towards the Standardization of Mesenchymal Stem Cell Secretome-Derived Product Manufacturing for Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16):1–15.
 77. Andriani D, Kusuma EW. Formulasi Sediaan Patch Transdermal Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi l.*) Dan Uji Aktivitas. *Cendekia J Pharm.* 2024;8(3):254–64.
 78. Supriadi Y, Sherlyke S. Formulasi Dan Evaluasi Sediaan Transdermal Patch Ekstrak Kulit Buah Apel Manalagi (*Malus sylvestris l. mill.*). *J Pharm Sci Clin Pharm.* 2023;01(02):59–66.
 79. Purnamasari N, Sutarna TH. Karakteristik Fisik dan Laju Difusi In Vitro

- Sediaan Transdermal Patch Domperidon Menggunakan Polimer Turunan Metil Metakrilat-Asam Metakrilat. *J Kartika Kim.* 2024;6(2):123–30.
80. Handayani R, Nurzanah H. Karakteristik edible film pati talas dengan penambahan antimikroba dari minyak atsiri lengkuas. *J Kompetensi Tek.* 2018;10(1):1–11.
 81. Prajapati ST, Patel CG, Patel CN. Formulation and Evaluation of Transdermal Patch of Repaglinide. *ISRN Pharm.* 2011;2011:1–10.
 82. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animal. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
 83. Bos JD, Meinardi MMHM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, editor. *Exp Dermatol.* 2000;9(3):165–9.
 84. Zhang L, Dong Z, Liu W. Novel Pharmaceutical Strategies for Enhancing Skin Penetration of Biomacromolecules. *Pharm Rev.* 2022;15(887):1–22.
 85. Charneau-genevois C. A simplified index to quantify the irritation / corrosion potential of chemicals – Part II : Eye. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2021;123:1–5.
 86. Trigo CM, Rodrigues JS. Mesenchymal stem cell secretome for regenerative medicine : Where do we stand ?. *J Adv Res.* 2025;70:103–24.
 87. Proksch E. pH in the regulation of skin barrier function. *Br J Dermatol.* 2018 Jun 4;179(5):1044-1053.
 88. OECD. Guideline For The Testing of Chemicals. 2002.

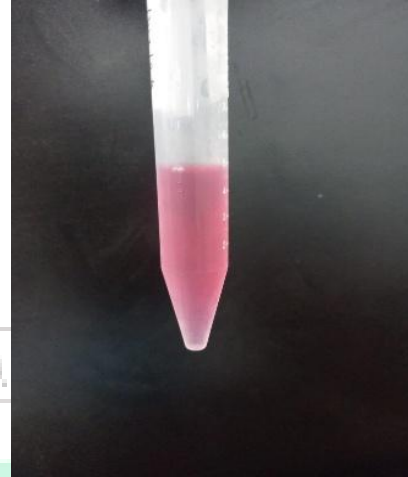


LAMPIRAN

Lampiran 1 Data Hasil Penelitian



Gambar 1 Sel yang telah konfluen dilihat dari mikroskop



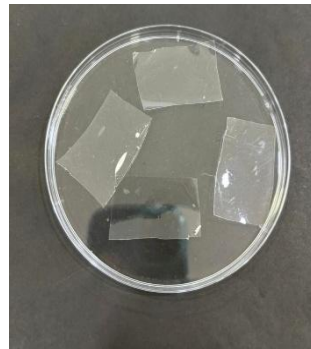
Gambar 2 Pengumpulan sekretom dalam wadah

Tabel 1 Hasil pemeriksaan bahan

No.	Bahan	Pemeriksaan	Persyaratan
1.	Sekretom	• Cairan • Merah muda • Tak berbau	• Cairan • Merah muda • Tak berbau
2.	Propilen glikol	• Kental • Tak berwarna • Larut	• Kental • Tak berwarna • Larut
3.	PVA	• Granular • Putih • Larut	• Granular • Putih • Larut
4.	Metil paraben	• Serbuk • Putih • Tak berbau	• Serbuk • Putih • Tak berbau
5.	Aquadest	• Cairan • Bening-jernih • Tak Berbau	• Cairan • Bening-jernih • Tak Berbau



Gambar 3 *Patch* film dalam proses pengeringan



Gambar 4 *Patch* film yang telah kering dan dipotong menyesuaikan ukuran punggung hewan uji



Tabel 2 Hasil evaluasi *patch* film

Evaluasi	Uji	Basis	200 mg/kgBB	1000 mg/kgBB	2000 mg/kgBB
Tebal Film (mm)	1	0,054	0,058	0,058	0,101
	2	0,049	0,055	0,072	0,077
	3	0,054	0,058	0,090	0,107
	4	0,054	0,059	0,059	0,095
	5	0,057	0,058	0,082	0,089
Rata - rata		0,0549	0,0580	0,0879	0,0941
SD		0,00340	0,00160	0,02450	0,01450
Daya lipat	1	307x	306x	300x	300x
	2	308x	306x	302x	298x
	3	307x	305x	204x	302x
Rata - rata		307x	305x	302x	301x
SD		0,58	1,63	2,00	2,00
pH	1	6,47	7,16	7,27	7,42
	2	6,49	7,16	7,28	7,41
	3	6,46	7,15	7,28	7,72
Rata - rata		6,47	7,15	7,27	7,41
<i>Tensile strength</i> (N/mm ²)	1	9,296	6,618	8,859	5,912
	2	11,660	12,530	11,881	6,242
	3	13,307	12,391	8,585	8,525
Rata - rata		11,421	10,513	9,775	6,893
SD		2,016	3,374	1,829	1,423
Persentase elongasi (%)	1	30,439	19,175	38,444	43,567
	2	35,364	46,751	40,361	39,224
	3	31,288	42,561	45,476	43,623
Rata - rata		32,364	36,162	41,427	42,138
SD		2,633	14,860	3,635	2,524



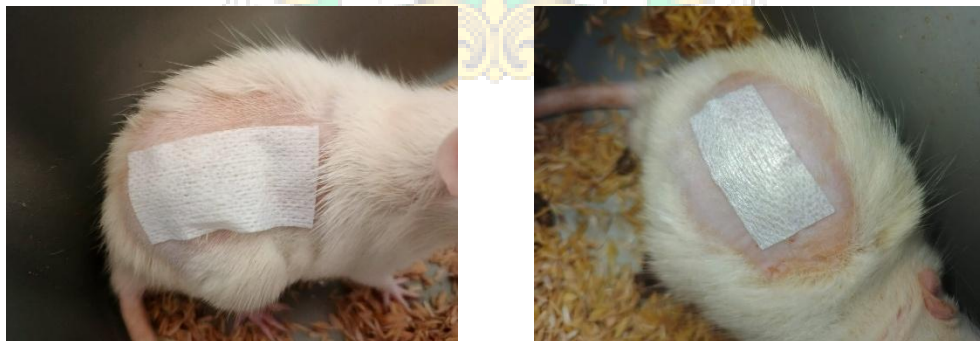
Gambar 5 Aklimatisasi hewan uji hari ke 1



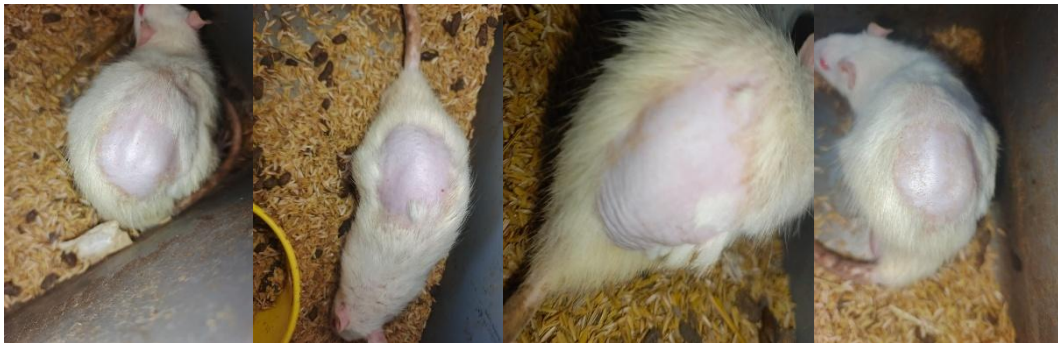
Gambar 6 Aklimatisasi hewan uji hari ke 7



Gambar 7 Pencukuran bulu hewan uji sehari sebelum pemberian *Patch* film



Gambar 8 Pemberian *Patch* film pada hewan uji



Gambar 9 Pengamatan hewan uji setelah pemberian *Patch* film hari ke 1 - 14

Tabel 3 Data berat badan hewan uji pada hasil uji utama

Jam	Perlakuan					
	Basis (1)	Basis (2)	Kontrol (1)	Kontrol (2)	2000 mg/kgBB (1)	2000 mg/kgBB (2)
0	205	295	266	226	245	249
1	205	300	262	220	244	243
6	200	283	230	214	254	242
12	200	300	226	237	258	254
24	212	288	245	230	262	250
48	222	295	250	226	265	254
72	225	295	235	235	260	257
96	204	301	245	240	255	261
120	215	287	252	246	253	258
144	217	284	264	237	258	257
168	210	293	270	227	265	252
192	215	290	247	216	263	249
216	208	295	240	230	260	253
240	210	298	252	243	259	244
264	220	300	259	232	254	241
288	225	294	266	238	250	251
312	224	300	255	244	259	253
336	220	294	261	237	255	250
Rata - rata	213,17	294,00	251,39	232,11	256,61	251,00
SD	8,41	5,62	12,86	9,31	6,03	5,70

Lampiran 2 Data Penunjang

Gambar 10 Sertifikat analisis *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)



Catalog No.: SCC038

Lot No.: VP1806250
Exp. Date.: Not Reported

CERTIFICATE OF CONFORMANCE

Human Adipose Mesenchymal Stem Cells

This lot conforms to specifications established by EMD Millipore Corp. for this product.



Quality Control / Assurance Signature

11 NOV 2020

Date

FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC
PROCEDURES. NOT FOR HUMAN OR ANIMAL CONSUMPTION

Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals.

©2002 – 2020: EMD Millipore Corporation. All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

28820 Single Oak Drive • Temecula, CA 92590
Technical Support: T: 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476) • F: 1-800-437-7502
www.emdmillipore.com
20452340; Version 2.0

SCC038/11 NOV 2020/NE

Gambar 11 Sertifikat analisis PVA

 DOW CHEMICAL PACIFIC (SINGAPORE) PRIVATE LIMITED		Ship From: Yusen Laem Chabang Sub Mft Chonburi Thailand			
Certificate of Analysis Product Number 00000114875 Product Name Propylene Glycol USP/EP Delivery No. 811380179 / 000010 Order Number 107218663 Shipping Units 160.000 DR Date Shipped 2022-11-23 (YYYY-MM-DD) Shipment No. 30820007			Customer Information Specification Number 000000059518		
Batch Number Manufacturing Date Expiration Date Quantity Net Weight Manufacturing Plant		C818HBK22T 2021-11-20 (YYYY-MM-DD) 2024-11-20 (YYYY-MM-DD) 160.00 DR 34400.000 KG MTP ATE PG			
It is hereby certified that the material indicated above has been inspected and tested in accordance with the conditions and requirements of the contract or purchase order and, unless agreed otherwise conform in all respects to the specification relevant thereto and it meets all requirements of the current United State Pharmacopoeia, current Food Chemical Codex, current European Pharmacopoeis and current Pharmacope of Japan.					
Test	Unit	Lower Limit	Upper Limit	Value	Method
Assay	%	99.80	-	99.97	Current USP
M Acidity	ml	-	0.20	0.01	Current USP
M Chlorides	ppm	-	70	< 70	Current USP
M Heavy Metals	ppm	-	5.0	< 5.0	Current USP
M Residue on Ignition per 50g	mg	-	3.50	0.47	Current USP
M Specific Gravity @ 25/25degC		1.035	1.037	1.036	Current USP
M Sulfate	ppm	-	60	< 60	Current USP
Water Content	%	-	0.200	0.009	Current USP
M ID Test A matches IR scan	%	-	-	Pass	Current USP
ID Test B Limit of Ethylene Glycol		-	-	Pass	Current USP
ID Test B Limit of Diethylene Glycol		-	-	Pass	Current USP
ID Test C matches GC Scan		-	-	Pass	Current USP

Gambar 12 Sertifikat analisis Propilen Glikol

There is another top address in Darmstadt

AppliChem GmbH
 Ottoweg 4
 D-64291 Darmstadt
 Phone 0049 6151 93 57-0
 Fax 0049 6151 93 57-11
 eMail service@applichem.com
 internet www.applichem.com


 BioChemica Chemica Synthesis Service

Page 1 of 1

Certificate of Analysis

Description	Polyvinyl alcohol 72000 BioChemica
Product number	A2255
CAS number	9002-89-5
Molecular weight	approx. 72000 g/mol
Formula	
Lot number	2X004470
QC-release date	06.06.2018
Next retest	06.2020

Parameter	Specification	Analysis
Appearance	white powder	white powder
Assay	min. 98 %	> 98 %
Loss on drying	max. 5 %	2.9 %

This document has been produced electronically and is valid without a signature



i.A. Kay Schubert
 Quality Control

i.A. Katrin Wünsche
 Quality Control

The manufacture of this product is carried out with greatest care. We guarantee the above details secured by our QM system. The suitability for special applications is not guaranteed. The certificate of analysis does not release you from performing the standard control upon receipt of incoming goods.

Gambar 13 Sertifikat Kode etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS,
DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ANDALAS
FAKULTAS FARMASI
Alamat : Gedung Fakultas Farmasi Lt.3, Limau Manis Padang Kode Pos 25163
Telepon : 0751-71682, Faksimile : 0751-777057
Laman: <http://ffarmasi.unand.ac.id> e-mail : dekan@phar.unand.ac.id

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
Nomor : 45/UN16.10.D.KEPK-FF/2026

Tim Komisi Etik Fakultas Farmasi Universitas Andalas, dalam upaya melindungi Hak Azazi dan Kesejahteraan Subjek Penelitian Kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul: *The research ethics committee of Faculty of Pharmacy Universitas Andalas, in order to protect rights and welfare of health research subject, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

Uji Toksisitas Akut Dermal Sediaan Patch yang Mengandung Sekretom MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*)
*Acute Dermal Toxicity Test of Patch Formulation Containing Mesenchymal Stem Cell (MSC) Secretome in Rats (*Rattus norvegicus*)*

Nama Peneliti Utama : Edu Pande Raja
Investigator
Nama Institusi : Fakultas Farmasi, Universitas Andalas
Institution

Protokol tersebut dapat disetujui pelaksanaannya.
And approved the research protocol.

Padang, 20-7-2026
Ketua
Chairman.





Dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas
Dean of Faculty of Pharmacy Universitas Andalas

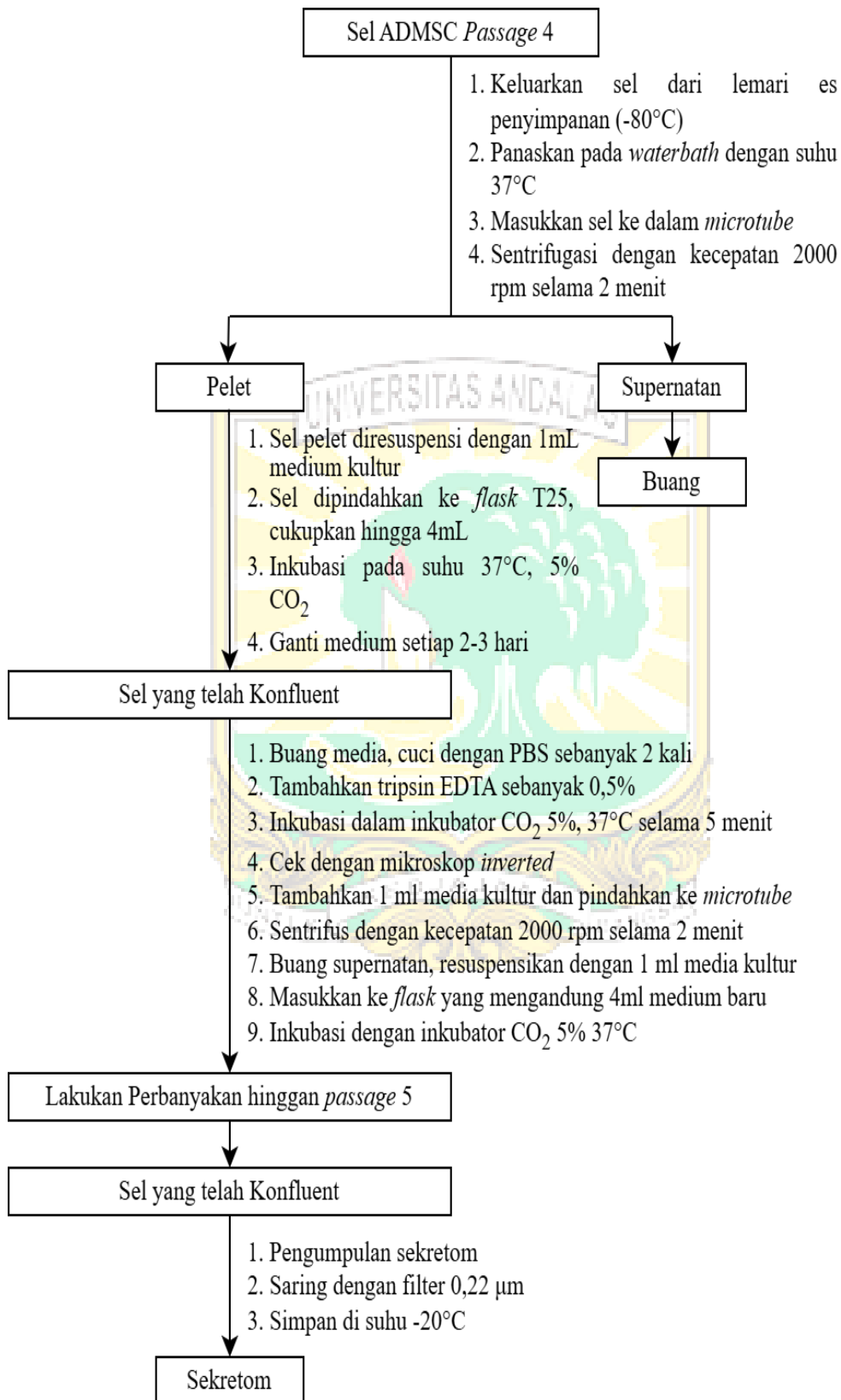
Prof. apt. Fatma Sri Wahyuni, Ph.D
NIP. 19740413 200604 2 001

apt. Najmiatul Fitria, M.Farm, Ph.D
NIP. 19841130 200912 2 006

Keterangan/ notes:
Keterangan kaji etik ini berlaku satu tahun sejak tanggal persetujuan.
This ethical approval is effective for one year from the issued date.
Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD), harus segera dilaporkan kepada Komisi Etik Penelitian.
If there are serious adverse events (SAE), should be immediately reported to the Research Ethics Committee.

Lampiran 3 Skema Kerja

Gambar 14 Skema kerja pengumpulan sekretom



Gambar 15 Skema kerja formulasi dan evaluasi *patch* film

