

**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA
PENYEMBUHAN LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi
pada hari ke 12, 18 dan 24)**

Proposal Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Diajukan Oleh :

Elytia Mutia Rizkiyani

30.101.50.7438

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2021

SKRIPSI
PENGARUH MSC HIPOKZIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA PENYEMBUHAN
LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi Hari Ke 12, 18
dan 24)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Elytia Mutia Rizkiyani

30101507438

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Pada tanggal 14 Desember 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si, Med.

Anggota Tim Penguji



dr. Eko Setiawan Sp.B
Penguji I

Pembimbing II



dr. Azizah Retno K, Sp.A, M.Biomed



dr. Kamilia Dwi Utami M.Biomed
Penguji II

Semarang, 27 Desember 2021

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan



Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH., Sp.KF

PERNYATAAN PERSETUJUAN UNGGAH KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Elytia Mutia Rizkiyani

NIM : 30101507438

Program Studi : Kedokteran Umum

Fakultas : Kedokteran

Dengan ini menyerahkan karya ilmiah berupa Skripsi dengan judul:

**“PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA
PENYEMBUHAN LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi
Hari Ke 12, 18 dan 24)”**

Dan menyetujuinya menjadi hak milik Universitas Islam Sultan Agung serta memberikan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif untuk disimpan, dialih mediakan, dikelola dalam pangkalan data, dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama masih tetap mencantumkan nama penulis sebagai pemilik Hak Cipta.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila dikemudian hari terbukti ada pelanggaran Hak Cipta/Plagiatisme dalam karya ilmiah ini, maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung secara pribadi tanpa melibatkan pihak Universitas Islam Sultan Agung.

Semarang, 20 Desember 2021

Yang menyatakan



Elytia Mutia Rizkiyani

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah rabbil'alam, puji dan syukur kita panjatkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala. Dzat yang hanya kepada-Nya memohon pertolongan. Alhamdulillah atas segala rahmat-Nya penulis telah diberi kesempatan, kesehatan, serta kekuatan sehingga skripsi yang berjudul, "**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA PENYEMBUHAN LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi Hari Ke 12, 18 dan 24)**" yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang telah diselesaikan dengan baik.

Skripsi ini tentunya tidak lepas dari bimbingan, masukan, dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, MSi. Med. dan dr. Azizah Retno K, Sp.A. M.Biomed selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan, membimbing, dan memotivasi penulis sehingga terselesaikannya skripsi ini.

3. dr. Eko Setiawan, Sp.B. dan dr. Kamilia Dwi Utami M.Biomed selaku dosen penguji yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Segenap Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Para staf Laboratorium SCCR Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah membantu penelitian sampai selesai.
5. Kedua orang tua dan keluarga yang tak henti-hentinya mendoakan, mendukung, dan memberi motivasi atas pengerjaan skripsi ini.
6. Sahabat-sahabat tersayang saya dari SMA yang telah memberi semangat dan dukungan atas pengerjaan skripsi ini.
7. Semua pihak yang telah banyak membantu terselesainya Karya Tulis Ilmiah ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu kritik maupun saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan demi tercapainya hal terbaik dari penelitian ini.

Akhir kata penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat sekaligus menambah pengetahuan bagi berbagai pihak di bidang kedokteran.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Semarang, 12 Desember 2021
Penulis



Elytia Mutia Rizkiyani

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN PERSETUJUAN UNGGAH KARYA ILMIAH.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. <i>Transforming growth factor-β</i> (TGF- β).....	5
2.1.1. Definisi TGF- β	5
2.1.2. Fungsi TGF- β	5
2.1.3. Peran TGF- β Dalam Penyembuhan Luka.....	5
2.2. Penyembuhan Luka.....	7
2.3. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka.....	10
2.4. Histologi Kulit.....	11
2.5. <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC) Hipoksia.....	15
2.5.1. Definisi MSC.....	15
2.5.2. Sumber MSC.....	16
2.5.3. Karakteristik MSC.....	16

2.5.4. Faktor-Faktor Yang Dikeluarkan MSC.....	17
2.5.5. Kultur MSC.....	18
2.5.6. Respon MSC Pada Lingkungan Hipoksia.....	19
2.6. Hubungan MSC Hipoksia Terhadap kadar TGF- β Pada Penyembuhan Luka Fase Proliferasi Dan Remodeling.....	20
2.7. Kerangka Teori.....	22
2.8. Kerangka Konsep.....	22
2.9. Hipotesis.....	22
BAB III METODE PENELITIAN.....	27
3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	23
3.2. Variabel Penelitian.....	23
3.2.1. Variabel Bebas.....	23
3.2.1. Variabel Terikat.....	23
3.3. Definisi Operasional.....	23
3.3.1. MSC Hipoksia.....	23
3.3.2. Kadar TGF.....	24
3.4. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	24
3.4.1. Subjek Penelitian.....	24
3.4.2. Sampel Penelitian.....	24
3.4.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	25
3.4.4. Besar Sampel.....	25
3.5. Alat dan Bahan Penelitian.....	26
3.5.1. Alat.....	26
3.5.2. Bahan Penelitian.....	27
3.6. Cara Penelitian.....	27
3.6.1. Pengajuan <i>Ethical Clearence</i>	27
3.6.2. Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	27
3.6.3. Kultur Sel.....	28
3.6.4. Proses Pemanenan Sel.....	29
3.6.5. Proses Penghitungan Sel.....	29
3.6.6. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan <i>Flow Cytometry</i>	30
3.6.7. Prosedur Hipoksia.....	31

3.6.8.	Pembuatan Luka Pada Hewan Coba.....	32
3.6.9.	Perlakuan Pada Luka Hewan Coba.....	32
3.6.10.	Pengambilan Sampel Darah Tikus.....	33
3.6.11.	Perhitungan Kadar TGF- β	33
3.7.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	34
3.7.1.	Tempat Penelitian.....	34
3.7.2.	Waktu Penelitian.....	34
3.8.	Analisis Data.....	34
3.9.	Alur Penelitian.....	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		37
4.1.	Hasil Penelitian.....	37
4.2.	Pembahasan Penelitian.....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		45
5.1.	Kesimpulan.....	45
5.2.	Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....		47
LAMPIRAN.....		51



DAFTAR SINGKATAN



ALK	= <i>Activin receptor-like kinase</i>
AP-1	= <i>Activator protein</i>
bFGF	= <i>Basic fibroblast growth factor</i>
CD	= <i>Cluster of Differentiation</i>
CM	= <i>Conditioned medium</i>
CO ₂	= <i>Carbon dioxide</i>
DMEM	= <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ECM	= <i>Extra cellular matrix</i>
EGF	= <i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	= <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	= <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	= <i>Fibroblast growth factor</i>
FIH-1	= <i>Factor-inhibiting HIF-1</i>
FITC	= <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HGF	= <i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 α	= <i>Hypoxia-inducible factors-1 alpha</i>
HLA-DR	= <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
ID	= <i>Inhibitor of DNA-binding protein</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
MSC	= <i>Mesenchymal stem cells</i>
NF- κ B	= <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PDGF	= <i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	= <i>Phycoerythrin</i>
PHD	= <i>Prolyl hydroxylase</i>
PKC	= <i>Protein kinase C</i>
RSBE	= <i>Repressive Smad binding element</i>
SDF-1	= <i>Stromal-derived factor-1</i>
TGF- β	= <i>Transforming growth factor beta</i>

TNF- α	= <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VEGF	= <i>Vascular endothelial growth factor</i>
α -MEM	= <i>Alpha-modified essential medium</i>
RPMI	= <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
α -SMA	= <i>Alpha smooth muscle actin</i>

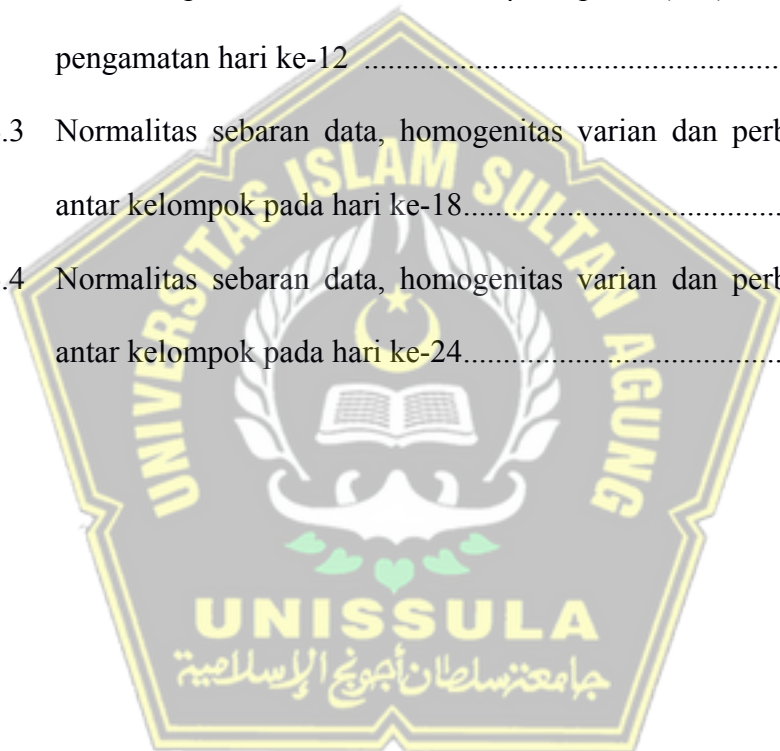


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Peran isoform TGF- β dalam penyembuhan luka kulit.....	6
Gambar 2.2	Proses penyembuhan luka, fase inflamasi.....	8
Gambar 2.3	Proses penyembuhan luka, fase proliferasi.....	9
Gambar 2.4	Proses penyembuhan luka, fase pematangan dan <i>remodeling</i>	10
Gambar 2.5	Gambaran umum kulit dan struktur didalamnya.....	12
Gambar 2.6	Struktur histologi lapisan epidermis pada kulit tebal.....	12
Gambar 2.7	Struktur histologi lapisan epidermis pada kulit tipis.....	13
Gambar 2.8	Morfologi MSC yang memiliki bentuk seperti fibroblas.....	16
Gambar 2.9	Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSC).....	16
Gambar 2.10	MSC mampu diferensiasi menjadi adiposit, kondrosit, osteoblas, kardiomiosit dan sel saraf.....	17
Gambar 2.11	Mekanisme hipoksia pada MSC.....	20
Gambar 2.12	Kerangka Teori.....	22
Gambar 2.13	Kerangka Konsep.....	22
Gambar 3.1	Bilik hitung	30
Gambar 3.2	Alur Penelitian.....	36
Gambar 4.1	Grafik mean Kadar TGF- β antar kelompok dan hari pengamatan	37

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Faktor-Faktor Parakrin yang Dihasilkan oleh MSC.....	17
Tabel 3.1	Reagen yang digunakan dalam <i>flowcytometry</i>	30
Tabel 4.1	Normalitas sebaran data, homogenitas varian dan perbedaan TGF- β antar kelompok pada hari ke-12.....	38
Tabel 4.2	Analisis perbedaan kadar TGF- β tiap 2 (dua) kelompok pada pengamatan hari ke-12	39
Tabel 4.3	Normalitas sebaran data, homogenitas varian dan perbedaan TGF- β antar kelompok pada hari ke-18.....	40
Tabel 4.4	Normalitas sebaran data, homogenitas varian dan perbedaan TGF- β antar kelompok pada hari ke-24.....	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian.....	51
Lampiran 2. <i>Ethical Clearance</i>	57
Lampiran 3. Surat Selesai Penelitian.....	58
Lampiran 4. Surat Undangan Ujian Hasil Skripsi.....	59
Lampiran 5. Gambar Penelitian.....	61



INTISARI

Sel punca mesenkimal (MSCs) memiliki kemampuan diferensiasi serta mampu mensekresikan sitokin dan faktor pertumbuhan yang berguna bagi penyembuhan luka, termasuk *Transforming Growth Factor- beta (TGF-β)*. Kultur hipoksia mampu meningkatkan kualitas MSC dari segi proliferasi, kemampuan bertahan hidup, serta lebih banyak mensekresi sitokin dan faktor pertumbuhan seperti TGF-β. Tujuan Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF-β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan “*posttest only control group design*” dengan menggunakan hewan coba. Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *randomized sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dirandomisasi dan dikelompokkan menjadi empat kelompok: Kelompok I (tidak diberikan perlakuan, sham). Kelompok II (pemberian *phospat buffer saline*, Kontrol), Kelompok III (pemberian MSC normoksia). Kelompok IV (pemberian MSC hipoksia).

Hasil rerata kadar TGF-β berdasarkan kelompok dan hari adalah sebagai berikut antara kelompok Sham, kontrol, P1 dan P2. Hari ke 12 (240,6; 398,9; 262,0; 250,8 pg/ml), hari ke 18 (267,4; 352,0; 225,0; 226,9 pg/ml), hari ke 24 (240,4; 264,8; 253,4; 206,8 pg/ml). Hasil Uji One Way Anova pada pengamatan hari ke 12 ($p < 0,05$), nilai p menunjukkan bahwa kadar TGF-β pada semua kelompok menunjukkan perbedaan yang signifikan. Pengamatan ke 18 dan 24 di dapatkan ($p > 0,05$) kadar TGF-β menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan terdapat pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF-β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling.

Kata kunci: Penyembuhan luka, TGF-β, Hipoksia, MSC, Fase proliferasi, fase remodeling

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Jaringan rusak akan digantikan oleh jaringan baru pada proses penyembuhan luka. Penyembuhan luka kulit merupakan proses fisiologis yang sangat terorganisir yang memulihkan integritas kulit setelah cedera (Hu *et al.*, 2014). Metode yang saat ini paling banyak dikaji untuk menyembuhkan luka adalah mesenchymal stem cell (MSC) karena memiliki kemampuan diferensiasi serta mampu mensekresitokin dan faktor pertumbuhan yang berguna bagi penyembuhan luka, termasuk *Transforming Growth Factor- beta* (TGF- β) (Aydemir *et al.*, 2016). Penggunaan MSC masih kurang optimal sehingga diperlukan kondisi perlakuan seperti hipoksia untuk meningkatkan kualitasnya (Madrigal *et al.*, 2014). *Transforming Growth factor-beta* adalah faktor pertumbuhan yang berperan penting terhadap semua tahap penyembuhan luka, terutama pada fase proliferasi dan remodeling (Gilbert *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2014). Melalui kemampuan parakrinnya, MSC dapat mensekresi TGF- β selama fase remodeling untuk mencegah pembentukan jaringan parut berlebih, membantu proses angiogenesis serta mengontrol kadar TGF- β selama fase remodeling (Cerqueira *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016). Peran MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β dalam mekanisme penyembuhan luka masih sedikit di teliti terutama selama fase proliferasi dan remodeling, oleh sebab itu, diperlukan penelitian tentang pengaruh MSC hipoksia terhadap

kadar TGF- β pada penyembuhan luka pada fase proliferasi dan remodeling pada hari ke 12, 18 dan 24.

Luka merupakan masalah kesehatan global. Di Inggris dan Denmark, setidaknya 3 - 4 orang terluka per 1000 penduduk. Awalnya, banyak luka akut menjadi luka kronis karena metode penyembuhan yang tidak efektif. Sayangnya menurut penelitian sebelumnya 15% luka tidak sembuh satu tahun pasca onset. (Lindholm dan Searle, 2016). Sementara itu, prevalensi kejadian luka di Indonesia berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar pada tahun 2013 yakni sebesar 8,2% dan jenis luka tertinggi yang dialami penduduk Indonesia adalah luka lecet sebesar 70,9% dan diikuti luka robek sebesar 23,2%. Sementara itu untuk etiologi luka terbanyak adalah akibat jatuh yakni sebanyak 40,9% kemudian disusul kecelakaan lalulintas sebanyak 40,6% (Riskesdas, 2013). Luka akut yang tidak segera sembuh akan berkembang menjadi luka kronis apabila gagal mengalami penyembuhan (Augustin *et al.*, 2014). Luka yang sulit sembuh akan berdampak pada pasien yakni menimbulkan stres, cemas, waktu tinggal pasien yang lama di rumah sakit, rasa sakit terus menerus dan bahkan beresiko kematian (Lindholm dan Searle, 2016).

Prakondisi hipoksia pada kultur MSC sering digunakan untuk meningkatkan efek terapeutiknya. Kultur hipoksia memperkuat *stemness* dari MSC (Saller *et al.*, 2012). Peningkatan regulasi fungsi terapeutik MSC sangat terbantu oleh adanya *Hypoxia inducible factor - 1a* (HIF-1 α) (Gonzalez-King *et al.*, 2017). *Hypoxia inducible factor - 1a* (HIF-1 α)

meningkatkan fungsi trofik dan pengeluaran sejumlah faktor pertumbuhan dan sitokin (Hu *et al.*, 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Caliari-Oliveira *et al* (2016) pada tikus model luka bakar dengan perlakuan MSC diperoleh hasil peningkatan kadar TGF- β secara signifikan pada hari ke 15 dibandingkan kontrol PBS dan penurunan kadar TGF- β sampai hari ke 30 dan 45 dimana kadarnya tidak ada beda antara kelompok MSC dengan kelompok kontrol.

1.1. Rumusan Masalah

Adakah pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling?

1.2. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β serum tikus model luka eksisi selama fase proliferasi dan remodeling yakni pada hari ke12, 18, dan 24.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengukur kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling pada kelompok sham
2. Mengukur kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling pada kelompok kontrol
3. Mengukur kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling pada kelompok MSC normoksia

4. Mengukur kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling pada kelompok MSC hipoksia

1.3. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan ilmu pengetahuan tentang penggunaan pemberian MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β fase proliferasi dan remodeling pada tikus model luka eksisi.

1.4.2. Manfaat Praktis

MSC hipoksia sebagai terobosan inovasi terapi regeneratif untuk mempercepat proses penyembuhan luka.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Transforming Growth Factor-B* (TGF- β)

2.1.1. Definisi TGF- β

Transforming growth factor beta (TGF- β) merupakan protein yang berfungsi dalam mengatur proliferasi, diferensiasi serta kematian dari berbagai jenis sel. TGF- β dapat memicu proses angiogenesis walaupun dapat menghambat proliferasi sel endotelial, TGF- β juga termasuk senyawa kemotaktis yang kuat bagi makrofag (Kumar *et al.*, 2018). TGF- β merupakan famili dari sitokin pluripoten yang terdiri dari tiga isoform yakni TGF β -1, 2, dan 3 dengan peran dominan TGF β -1 dalam penyembuhan luka kulit (Ramirez *et al.*, 2014).

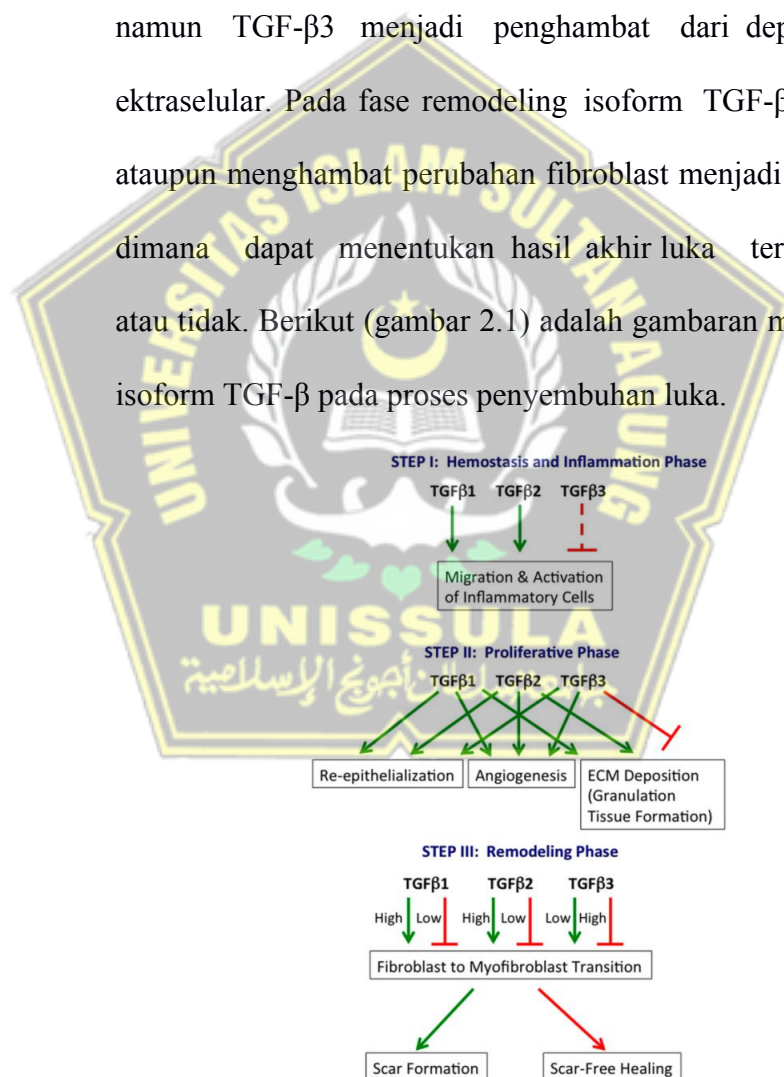
2.1.2. Fungsi TGF- β

Transforming growth factor beta (TGF- β) merupakan sitokin multifungsional dimana berperan secara umum dalam beberapa proses seluler seperti proliferasi, diferensiasi, migrasi, serta apoptosis yang diperlukan dalam menjaga homeostasis suatu jaringan (Oshimori dan Fuchs, 2012).

2.1.3. Peran TGF- β Dalam Penyembuhan Luka

Transforming growth factor beta (TGF- β 1,2,3) memainkan peran penting pada semua fase penyembuhan luka. Pada fase

homeostasis dan inflamasi, isoform TGF- β mempengaruhi pada fase ini, dimana TGF- β 1 dan 2 menstimulasi proses migrasi dan aktivasi sel-sel inflamasi, sedangkan TGF- β berpotensi menghambat terjadinya migrasi dan aktivasi sel-sel inflamasi. Pada fase proliferasi isoform TGF- β 1 dan 2 menstimulasi proses re epitelisasi, angiogenesis dan deposisi matriks ekstraselular, namun TGF- β 3 menjadi penghambat dari deposisi matriks ekstraselular. Pada fase remodeling isoform TGF- β menstimulasi ataupun menghambat perubahan fibroblast menjadi myofibroblast dimana dapat menentukan hasil akhir luka terbentuk eskar atau tidak. Berikut (gambar 2.1) adalah gambaran mengenai peran isoform TGF- β pada proses penyembuhan luka.



Gambar 2.1. Peran isoform TGF- β pada penyembuhan luka kulit. Panah hijau: stimulasi; garis merah terus menerus:

penghambatan; garis merah putus-putus: berpotensi menghambat (Gilbert *et al.*, 2016).

2.2. Penyembuhan Luka

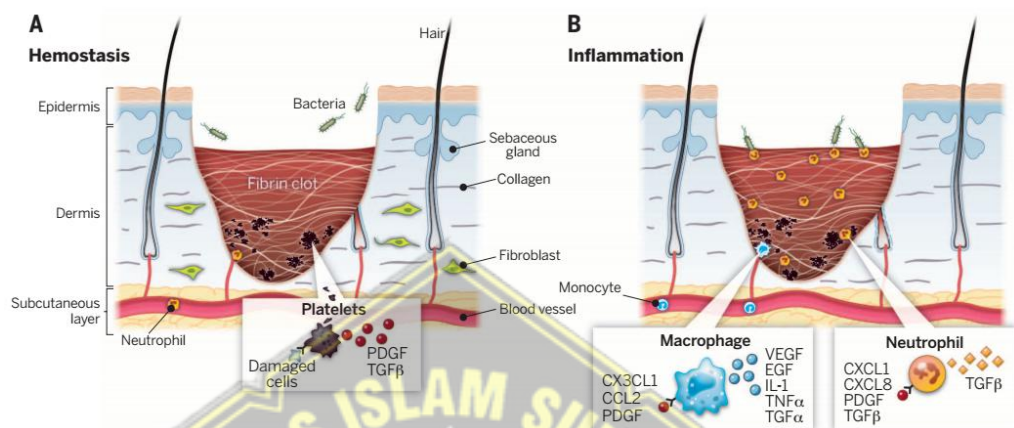
Proses penyembuhan luka secara normal meliputi proses-proses sebagai berikut (Maxson *et al.*, 2012; Yolanda *et al.*, 2014):

1. Reaksi Homeostasis dan peradangan atau inflamasi

Kerusakan jaringan menyebabkan rusaknya pembuluh darah serta ekstrasvasasi darah. Sesaat sebelum permulaan tahap inflamasi, kaskade koagulasi terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Proses ini menyebabkan agregasi trombosit dan pembentukan bekuan darah untuk meminimalkan kehilangan darah di jaringan. Pembentukan trombus adalah proses hemostasis yang membantu menyediakan matriks ekstraseluler sementara yang membantu dalam migrasi sel. Ketika pendarahan berhenti, tahap inflamasi dimulai

Fase inflamasi dimulai dengan dikeluarkannya molekul *Damage Associate Molecule Pattern* (DAMP) oleh sel-sel yang rusak atau mati. DAMP akan memicu makrofag residen untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi seperti PDGF, TNF- α , TGF- β , IL-6 dan IL-8. TNF- α berperan dalam menarik sel-sel leukosit ke daerah luka untuk membersihkan jaringan mati atau pun infeksi dari bakteri yang masuk ke daerah luka. Sedangkan PDGF dan TGF- β berfungsi dalam mengaktivasi sel fibroblast menjadi myofibroblast yang akan memproduksi kolagen. Fase inflamasi sangat penting karena berfungsi

membersihkan daerah luka dari agen-agen yang dapat menghambat proses penyembuhan luka.



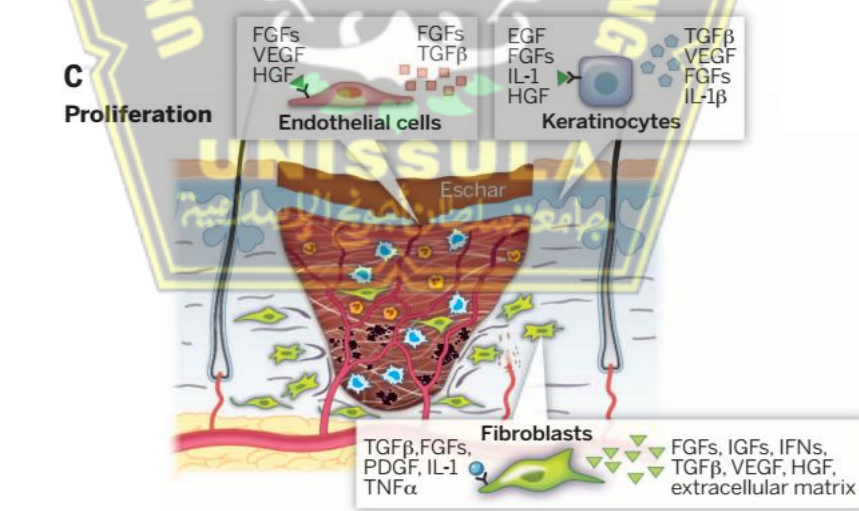
Gambar 2.2. Proses penyembuhan luka, fase inflamasi (Sun *et al.*, 2014).

2. Proliferasi

Umumnya fase proliferasi dimulai pada hari ke 3 sampai hari ke 14 setelah cedera. Ditandai dengan adanya migrasi fibroblast dan deposisi ECM dan bertindak sebagai pengganti jaringan sementara yang terdiri dari fibronectin serta fibrin. Pada tingkat makroskopik, tahap penyembuhan luka ini dapat dilihat sebagai terbentuknya jaringan granulasi yang melimpah. Pada fase ini sel-sel fibroblast yang teraktivasi menjadi myofibroblas oleh PDGF dan TGF beta bermigrasi ke area luka. Setelah berada di area luka, myofibroblas akan berproliferasi dan memproduksi fibronectin, protein matriks hyaluronan, proteoglikan serta prokolagen tipe 1 dan 3. Semua produk tersebut disalurkan secara lokal di area lokasi.

Fase proliferasi juga terdapat proses sintesis kolagen oleh fibroblas. Pada tahap penyembuhan luka kolagen memiliki peranan penting dimana kolagen memberikan integritas pada jaringan, terutama pada fase proliferasi dan fase remodeling. Kolagen berfungsi sebagai penambah kekuatan luka sehingga memperkecil kemungkinan luka terbuka kembali.

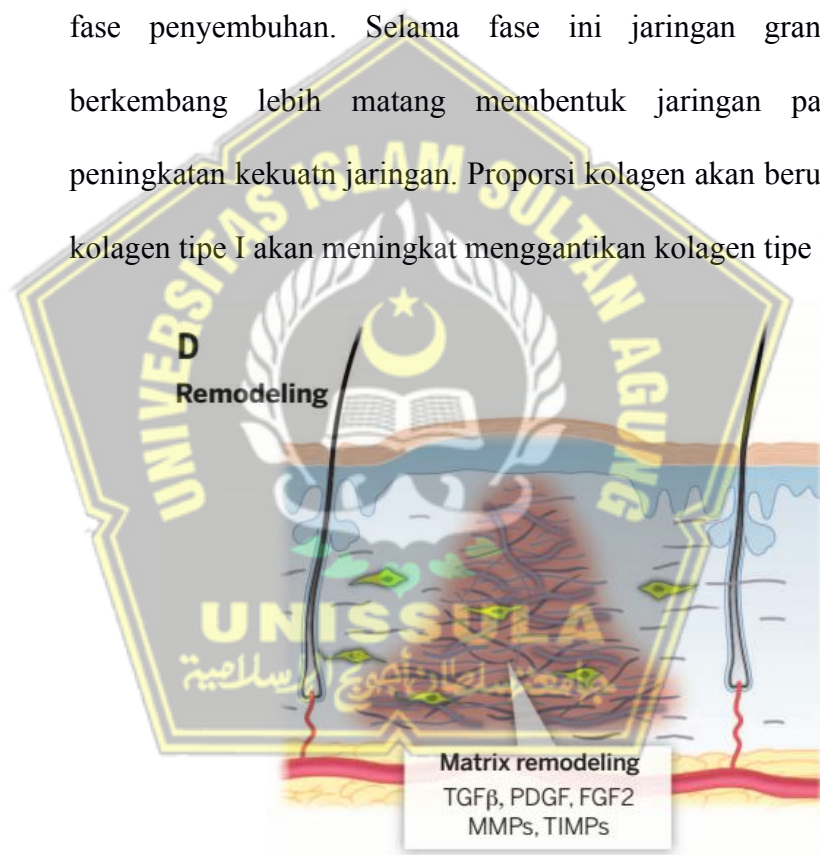
Migrasi sel epitel dimulai di tepi luka dalam beberapa jam setelah luka. Sebuah monolayer sel pertama kali terbentuk pada defek, dengan peningkatan aktivitas mitosis sel epitel di sekitar margin luka. Sel-sel yang bermigrasi menempel pada matriks sementara. Ketika sel-sel epitel yang bergerak bertemu, mereka berhenti bermigrasi dan mulai membentuk membran basal.



Gambar 2.3. Proses penyembuhan luka, fase proliferasi (Sun *et al.*, 2014).

3. Pematangan dan *remodeling*

Remodeling adalah fase terakhir dari penyembuhan luka. Pada fase ini permukaan luka berkontraksi. Fenomena kunci pada proses ini adalah perubahan fibroblast menjadi myofibroblast. Reseptor integrin bereaksi pada kolagen dan memperantarai kontraksi dari jaringan granulasi. Transformasi ini berjalan pada minggu ke-2 fase penyembuhan. Selama fase ini jaringan granulasi akan berkembang lebih matang membentuk jaringan parut diikuti peningkatan kekuatan jaringan. Proporsi kolagen akan berubah dimana kolagen tipe I akan meningkat menggantikan kolagen tipe III.



Gambar 2.4. Proses penyembuhan luka, fase pematangan dan *remodeling* (Sun *et al.*, 2014).

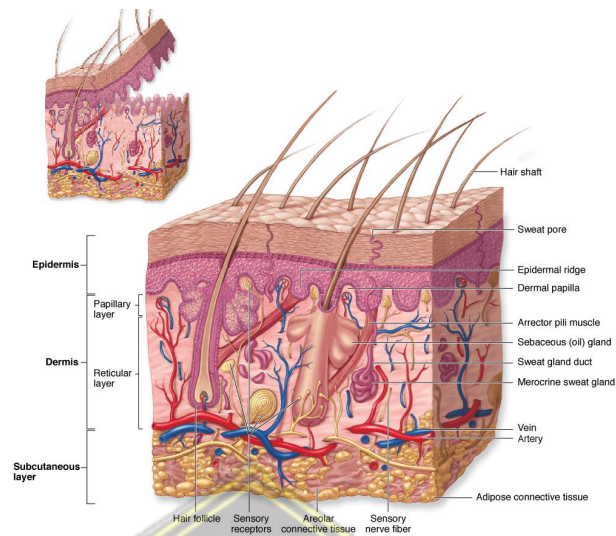
2.3. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Faktor-faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka antara lain (Kumar *et al.*, 2018):

1. Infeksi merupakan penyebab tunggal keterlambatan penyembuhan luka dan memperpanjang fase peradangan.
2. Nutrisi, terutama kekurangan vitamin C dan protein mengganggu sintesis kolagen serta memperpanjang dari penyembuhan luka.
3. Glukokortikoid atau steroid memiliki efek anti inflamasi. Pemberian steroid menghasilkan pengurangan jaringan parut dan fibrosis karena penghambatan TGF- β .
4. Arteriosklerosis, pada kondisi ini ketersediaan darah pada tempat luka tidak mencukupi.
5. Ukuran, lokasi dan jenis luka mempengaruhi proses penyembuhan luka.

2.4. Histologi Kulit

Kulit dikenal dengan istilah lain yaitu Integumen (L. *Integumentum*, yang berarti penutup/pelapis). Kulit terbagi atas dua bagian utama: bagian *epidermis* yang superfisial dan lebih tipis dan bagian *dermis* yang terletak tepat di bawah epidermis dan lebih tebal. Di bawah dermis terdapat lapisan *subkutan* yang berisi jaringan adiposa dan pembuluh darah yang memvaskularisasi dermis dan epidermis.

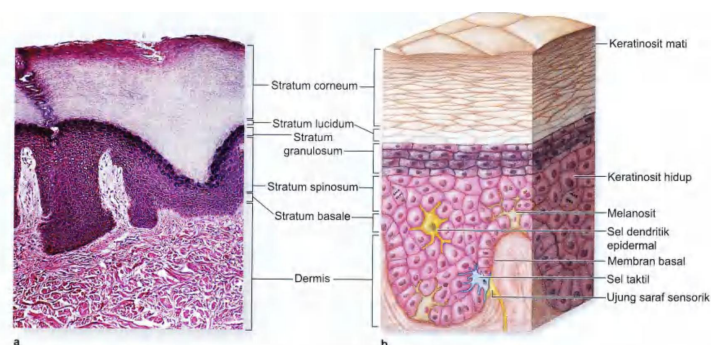


Gambar 2.5. Gambaran umum kulit dan struktur didalamnya. (Junqueira, 2010).

1. Epidermis

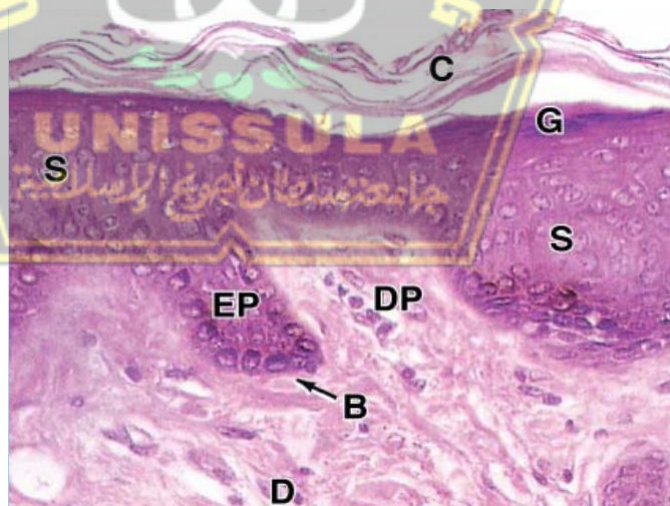
Epidermis dilapisi epitel squamous kompleks berkeratin. Terdapat 4 sel utama penyusun epidermis: keratinosit, melanosit, sel langerhans, dan sel merkel. Epidermis sebagian besar tersusun oleh keratinosit (sekitar 90%) yang tersusun menjadi 4 atau 5 lapis serta menghasilkan protein keratin dan granula lamellar.

Pada jenis *kulit tebal* seperti di telapak tangan dan kaki terdapat 5 lapis susunan keratinosit (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum, dan stratum korneum yang tebal)



Gambar 2.6. Struktur histologi lapisan epidermis pada kulit tebal.
(Junqueira, 2010).

pada jenis *kulit tipis* yang melapisi seluruh bagian tubuh lainnya hanya terdapat 4 lapisan yang menyusun epidermis (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum dan stratum korneum yang tipis). Pertemuan antara dermis dan epidermis di kulit tipis ditahan bersama-sama dengan erat oleh pasak epidermis yang saling mengunci (EP, epidermal pegs) dan papilla dermis (DP). Dermis (D) lebih banyak mengandung sel dan terdistribusikan lebih baik ketimbang kulit tebal, dengan elastin dan lebih sedikit berkas kasar kolagen. Epidermis biasanya hanya memperlihatkan empat lapisan di kulit tipis: stratum basale dengan ketebalan satu sel (B) yang mengandung sebagian besar sel mitosis; stratum spinosum (S) tempat sintesis sejumlah besar keratin dan protein lain; stratum granulosum (G); dan stratum corneum (C), yang terdiri atas skuama mati yang sebagian besar terdiri atas keratin.



Gambar 2.7. Struktur histologi lapisan epidermis pada kulit tipis.
(Junqueira, 2010).

2. Dermis

Dermis merupakan jaringan ikat yang menunjang epidermis dan mengikatnya pada jaringan sub-kutan (Hipodermis). Dermis terdiri atas 2 bagian, yaitu *pars papillaris* yang terletak dekat dengan epidermis dan *pars retikularis* yang terletak dekat dengan jaringan subkutan. Pars papillaris menyusun 1/5 bagian total dari dermis, mengandung serat kolagen dan serat elastik halus. Permukaan pars papillaris membentuk tonjolan-tonjolan seperti jari yang melekat erat dengan struktur epidermis, disebut papilla dermis. Setiap papilla dermis terdapat *loop* kapiler, kadangkala terdapat kurpuskulum meissner (untuk sensasi raba) dan ujung saraf bebas. Lapisan ini tersusun atas jaringan ikat longgar dengan serabut kolagen (tipe 1 dan 3), sel makrofag, sel mast, leukosit lainnya, beserta fibroblast.

Pars retikularis melekat kuat dengan lapisan subkutan di bawahnya, berukuran lebih tebal dari pars papillaris dermis di atasnya. Pars retikularis tersusun atas jaringan ikat padat ireguler berupa serat kolagen tebal (kebanyakan tipe I), fibroblast yang tersebar dan beberapa sel imun (misalnya makrofag). Terdapat beberapa sel adipose di dasar dari pars retikularis, bersama dengan serabut elastik kasar. Diantara serat-seratnya, terdapat pembuluh darah, serabut saraf, folikel rambut, kelenjar keringat (glandula sudorifera) dan kelenjar minyak (glandula sebacea) di pars retikularis. Jarang ditemukan sel-sel lain seperti halnya pada pars papillaris di bagian ini. Kombinasi adanya serat kolagen dan elastik pada lapisan ini membuatnya bersifat kuat, bisa meregang (*extensibility*) dan mampu kembali lagi ke bentuk asalnya (*elasticity*). Diantara kedua jenis serabut, terdapat proteoglikan yang kaya akan *dermatan sulfate*.

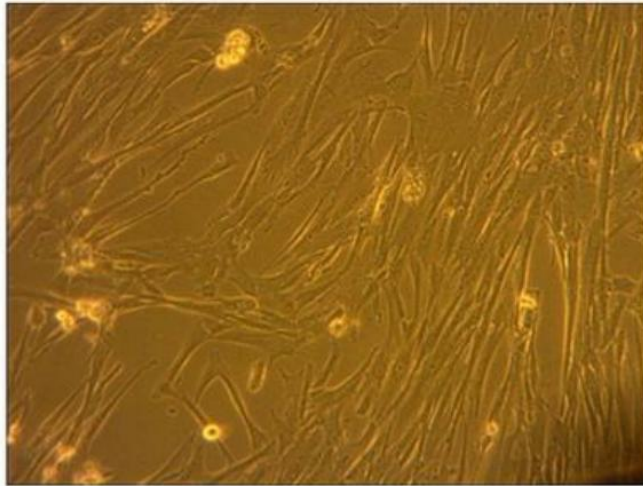
3. Jaringan Subkutan

Lapisan subkutan terdiri atas jaringan ikat longgar yang mengikat kulit secara longgar pada organ-organ dibawahnya, yang memungkinkan kulit bergeser dia atasnya. Lapisan tersebut yang juga disebut hipodermis atau fascia superficialis, sering mengandung sel-sel lemak yang jumlahnya bervariasi sesuai daerah tubuh dan ukuran yang bervariasi sesuai dengan status gizi. Suplai vaskular yang luas dilapisan subkutan meningkatkan ambilan insulin dan obat yang disuntikan.

2.5. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) Hipoksia

2.5.1 Definisi MSC

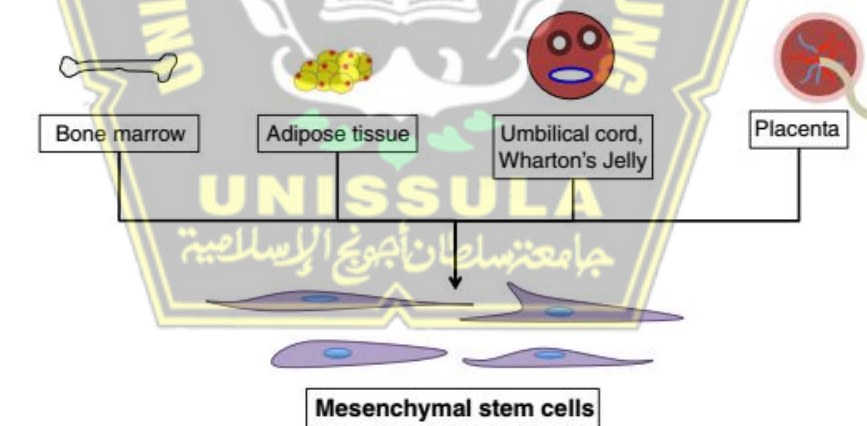
Mesenchymal stem cell (MSC) merupakan sel multipotensi yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti osteosit, adipositas, dan neurosit. Beberapa jaringan seperti adipose, folikel rambut, hingga wharton jelly dari tali pusat merupakan sumber MSC. Secara morfologi MSC memiliki bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum pental dan secara fenotipe, MSC mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44, CD73, CD90, dan CD 105 namun tidak mengekspresikan marker *hematopoetic stem cell* (Halim, 2010).



Gambar 2.8. Morfologi MSC yang memiliki bentuk seperti fibroblas (Putra, 2020)

2.5.2 Sumber MSC

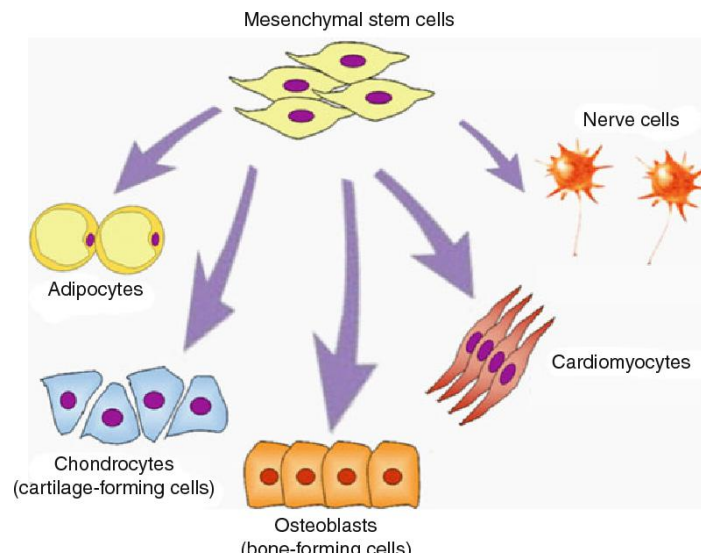
Beberapa jaringan yang dapat menjadi sumber MSC antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta (Lee *et al.*, 2016).



Gambar 2.9. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSC) (Lee *et al.*, 2016).

2.5.3 Karakteristik MSC

Mesenchymal stem cell mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, cardiomyocytes dan sel saraf (Hofmann *et al.*, 2014)



Gambar 2.10. MSC mampu diferensiasi menjadi adiposit, kondrosit, osteoblas, kardiomyosit dan sel saraf (Hofmann *et al.*, 2014)

2.5.4 Faktor-Faktor Yang Dikeluarkan MSC

MSC mampu mengeluarkan berbagai faktor - faktor yang berperan dalam regenerasi jaringan, seperti pada tabel berikut:

Tabel 2.1. Faktor-Faktor Parakrin yang Dihasilkan oleh MSC (Williams dan Hare, 2011)

Faktor yang Disekresi	Fungsi
Pro Angiogenesis	
FGF-2	Menginduksi sel endotelial dan proliferasi otot polos
FGF-7	Menginduksi proliferasi sel endotel
MCP-1	Menginduksi angiogenesis, merekrut monosit
PDGF	Proliferasi sel otot polos
PIGF	Mempromosikan angiogenesis
TGF- β	Pematangan pembuluh darah
VEGF	Proliferasi sel endotel, migrasi dan pembentukan pembuluh darah
Remodeling Matriks Ekstraseluler	
MMP-1	Meregangkan matriks dan pembentukan tubulus
MMP-2	Meregangkan matriks dan pembentukan tubulus
MMP-9	Meregangkan matriks
<i>Plasminogen activator</i>	Degradasi molekul matriks
TNF- α	Degradasi molekul matriks, proliferasi sel
Proliferasi <i>Stem Cell</i> , rekrutmen dan bertahan hidup	

bFGF	Meningkatkan proliferasi endotel dan sel otot polos
G-CSF	Meningkatkan proliferasi dan diferensiasi neutrofil
IGF-1	Mengatur pertumbuhan sel dan proliferasi; menghambat apoptosis
M-CSF	Meningkatkan proliferasi dan diferensiasi monosit
SDF	<i>Progenitor cell homing</i>
SFRP1	Meningkatkan perkembangan sel
Immunomodulasi	
HO-1	Menghambat proliferasi sel T
HGF	Menghambat proliferasi sel T CD4 +
IDO	Menghambat proliferasi sel imun bawaan dan adaptif
INOS	Menghambat peradangan
IL-6	Mengatur peradangan, Induksi VEGF
PGE-2	Menghambat peradangan

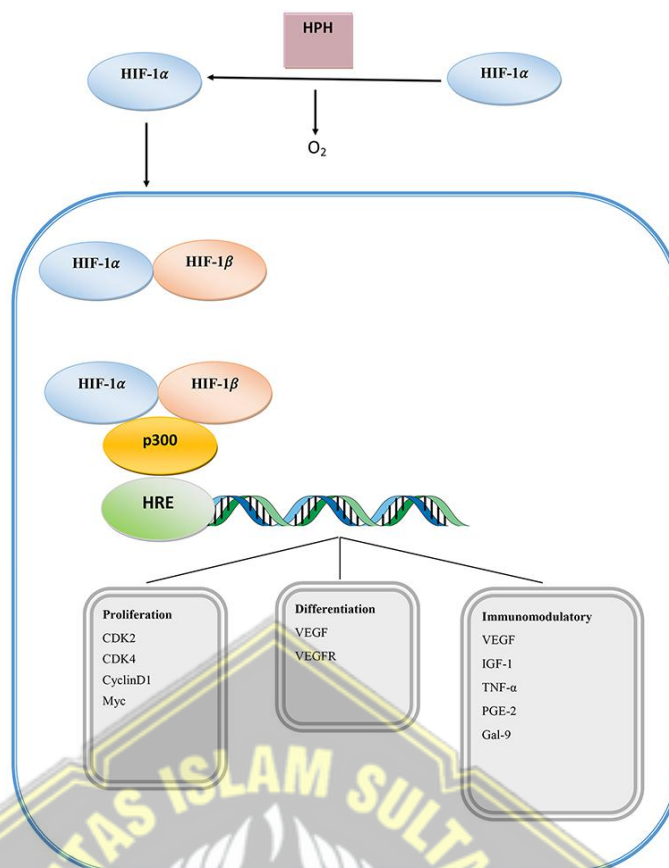
2.5.5 Kultur MSC

Kultur MSC dapat dilakukan dengan α -MEM (*alpha-modified essential medium*) yang merupakan medium pertumbuhan sel dan juga dapat menggunakan penambahan seperti *fetal bovine serum* (FBS), ampoterasin, steptomisin serta penisilin. Sel dapat diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO₂ 5% dalam waktu 24 jam. Untuk mengkultur dan mengisolasi MSC menggunakan Formulasi medium pertumbuhan antara lain α -MEM, BGjb, DMEM-F12, *Dullbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM), RPMI 1640 dan McCoy's 5A. Formulasi medium pada umumnya menggunakan 10% FBS sebagai campuran beberapa faktor pertumbuhan yang belum teridentifikasi (*Fedik, et al, 2014*).

2.5.6 Respon MSC Pada Lingkungan Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, self renewal, dan pelekatan MSC. Selain itu kondisi hipoksia memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSC (Madrigal *et al.*, 2014).

Hipoxic Induce Factor (terutama HIF-1) merupakan regulator utama respon seluler terhadap kondisi hipoksia. HIF-1a memainkan peranan penting selama dalam adaptasi MSC dalam kondisi hipoksia (Widowati *et al.*, 2017). Kondisi hipoksia dapat meningkatkan kualitas MSC dalam beberapa proses seluler seperti proliferasi, diferensiasi, kemampuan hidup dan senyawa aktif yang disekresikan (Lakatos *et al.*, 2015).



Gambar 2.11. Mekanisme hipoksia pada MSC (Widowati *et al.*, 2017)

2.6. Hubungan MSC Hipoksia Terhadap Kadar TGF- β Pada Penyembuhan Luka Fase Proliferasi Dan Remodeling

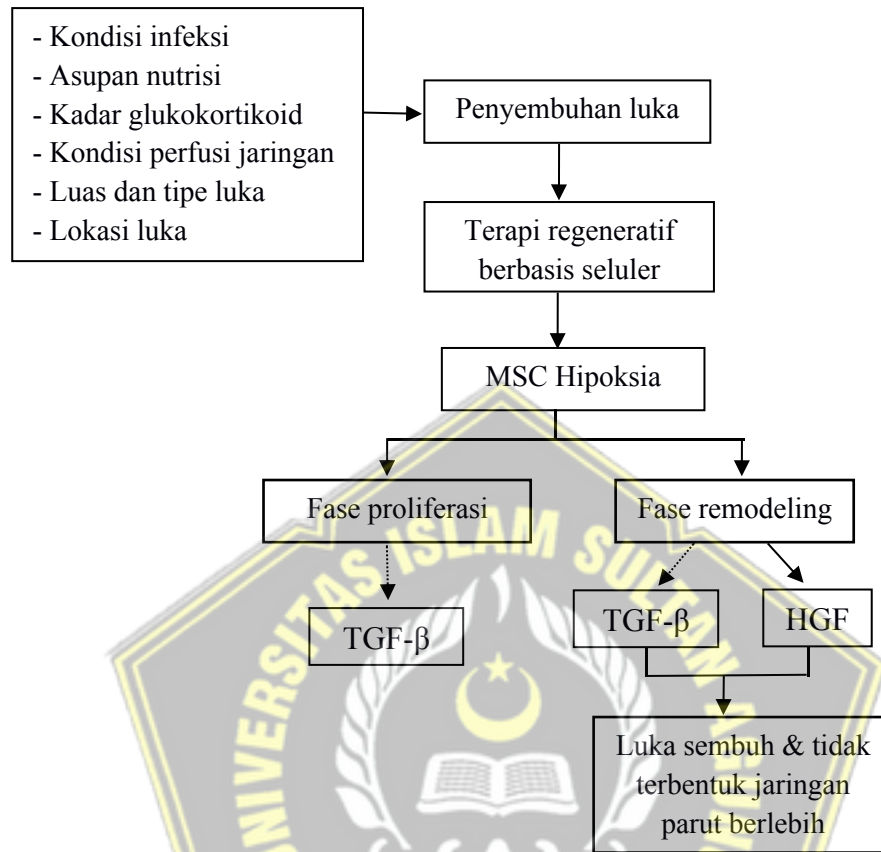
MSC secara alami hidup di lingkungan hipoksia dengan kadar O₂ 2 sampai 5%, tetapi proses kultur biasanya menggunakan kadar oksigen normal 19 sampai 20% (Lv *et al.*, 2017). Hipoksia mendifusikan oksigen yang tersedia dari sitosol ke dalam mitokondria, menciptakan lingkungan sitosol hipoksia. Ini menghambat aktivitas procollagen-hydroxylase, yang mengarah pada aktivasi hypoxia-inducing factor (HIF). Molekul HIF adalah heterodimer yang terdiri dari subunit (1 α dan 2 α) dan subunit. Studi sebelumnya telah mengidentifikasi peran subunit dalam proses yang meningkatkan angiogenesis, pembaruan diri, stabilitas, dan menghambat diferensiasi MSC (Mas-Bargues *et al.*, 2019). mengaktifkan jalur glikolitik

(Heikkinen et al., 2015). Stabilisasi HIF1 α mengurangi fosforilasi oksidatif, yang menghasilkan pembukaan saluran MitoKATP, menghasilkan aktivasi protein kinase C (PKC). PKC mengaktifkan transduksi sinyal faktor nuklir kappa beta (NF κ b) dan meningkatkan ekspresi protein antioksidan dan anti-apoptosis. NF κ b juga meningkatkan fungsi nutrisi dari produksi faktor pertumbuhan dan sitokin, yaitu sekresi PDGF, FGF, TGF, VEGF dan IL10 (Madrigal *et al.*, 2014; Sart *et al.*, 2014).

Salah satu peran MSC dalam penyembuhan luka proliferasif adalah menginduksi proliferasi dan migrasi fibroblas pada area luka melalui jalur TGF- β /SMAD2 (Camões *et al.*, 2020). Selama fase remodeling penyembuhan luka, MSC meningkatkan produksi faktor pertumbuhan HGF dan mengurangi kadar TGF β . Sekresi HGF dan VEGF oleh MSC menyeimbangkan kadar family TGF, yaitu TGF β 1 dan TGF β 3 (Cerqueira *et al.*, 2016).

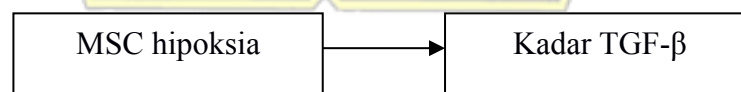


2.7. Kerangka Teori



Gambar 2.12. Kerangka teori

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 2.13. Kerangka konsep

2.9. Hipotesis

Terdapat pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan “*posttest only control group design*” dengan menggunakan hewan coba.

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini yaitu, MSC hipoksia.

3.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu, kadar TGF- β .

3.3. Definisi Operasional

3.3.1. MSC Hipoksia

Mesenchymal Stem Cell merupakan *stem cell* yang memiliki bentuk *spindle-shaped* yang dapat menempel pada wadah plastik.

MSC diisolasi dari tikus galur Wistar yang hamil 19 hari. Hipoksia merupakan kondisi terjadinya defisiensi oksigen. Hipoksia dilakukan dengan pengaliran CO₂ melalui selang yang terhubung ke chamber dan diamati dengan *oxygen* meter yang diletakkan didalam *chamber* sehingga kadar O₂ tetap berada pada kadar 1,5% - 5%.

Skala:Rasio

3.3.2. Kadar TGF- β

Transforming growth factor-beta (TGF- β) merupakan suatu protein yang dihasilkan oleh isolasi serum tikus luka eksisi pada kelompok perlakuan kelompok I (sham), kelompok II (kontrol), kelompok III (MSC normoksia) dan kelompok IV (MSC hipoksia) dan dianalisis dengan ELISA. Darah diambil dari vena orbital menggunakan tabung hematokrit dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum. Serum dikumpulkan selama fase pertumbuhan dan remodeling pada hari ke 12, 18 dan 24 setelah perlakuan. Pengukuran kadar TGF β dilakukan dengan mencampurkan antibodi monoklonal TGF kemudian diukur dengan menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan panjang gelombang 450 nm. Skala: Rasio.

3.4. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

3.4.1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus jantan galur Wistar.

3.4.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian adalah tikus putih jantan galur Wistar dengan memiliki kriteria sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

1. Umur 2-3 bulan
2. Tidak dalam kondisi sakit
3. Berat badan 200-250 gram

Kriteria eksklusi

1. Memiliki kelainan anatomis
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya

Kriteria *drop uut*

1. Mati selama penelitian

3.4.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *randomized sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dirandomisasi dan dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu:

1. Kelompok I (sham, tidak diberikan perlakuan).
2. Kelompok II (kontrol, pemberian *phospat buffer saline* /PBS).
3. Kelompok III (pemberian MSC normoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel).
4. Kelompok IV (pemberian MSC hipoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ sel).

3.4.4. Besar Sampel

Dengan berdasar pada kriteria WHO, besar sampel penelitian ini digunakan sejumlah 20 ekor tikus putih jantan galur wistar, masing-masing 5 ekor per-kelompok.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

1. *Micropipette with tip* (yellow tip, blue tip, pink tip)
2. *Pipette filler*
3. *Conical tube* (15 ml dan 50 ml)
4. *Cryotube* 1 ml
5. *Inverted microscope*
6. *Scissor*
7. Pinset
8. *Scalpel*
9. *Bisturi*
10. *Thermostirrer*
11. *Aluminium foil*
12. *Dish*
13. *Flask*
14. Tabung CO₂
15. *Biosafety Cabinet class 2*
16. CO₂ incubator
18. *Cell counter*
19. *24 well plate*
20. Pipet kapiler
21. *Sentrifuge tube*
22. *Freezer*
23. Kapas
24. *Punch biopsy* 6 mm
25. Timbangan digital
26. Pipet tetes
27. Mortir
28. Stemper
29. Kertas label
30. *Flow cytometry*
31. *Chamber hypoxic*
32. *Oxygen meter*
33. *Sentrifuge* (Sarvall MC 12 V)
34. *ELISA reader*

17. *Heparin tube*

3.5.2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. <i>Umbilical cord</i> | 9. Aquades |
| 2. NaCl 0,9% | 10. <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| 3. FBS | (FITC) |
| 4. PBS | 11. <i>Allophycocyanin</i> (APC) |
| 5. Medium dMEM | 12. <i>Phycoerythrin</i> (PE) |
| 6. Fungizon 0,5% | 13. Antibodi CD105, CD90, |
| 7. <i>Streptomisin-penicilin</i> 1%
(penstrep) | CD73; |
| 8. Tikus putih jantan galur
Wistar | 14. Ketamine 90% |
| | 15. <i>Xylazine</i> . |
| | 16. TGF- β ELISA kit |

3.6. Cara Penelitian

3.6.1. Pengajuan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

3.6.2. Teknik Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Seluruh proses dilakukan dalam lemari biosafety Kelas 2 yang dilengkapi dengan alat sterilisasi dan teknologi yang sangat steril.

1. Masukkan *umbilical cord* kedalam wadah yang berisi kan NaCl 0,9%.
2. Ambil *umbilical cord* dengan pinset dan letakan pada petri disk
3. Cuci bersih *umbilical cord* dengan PBS
4. Potong 3-5cm *Umbilical cord* dengan pisau steril dan pindahkan ke dalam *petri dish*.
5. Hancurkan potongan dengan bisturi sehingga ukuran *umbilical cord* menjadi 1mm
6. Ambil potongan kecil dengan pinset dan tempatkan di cawan kultur jaringan
7. Medium komplit dibersihkan
8. Inkubasi dengan CO₂ 5% pada suhu 37°C
9. Lakukan pengamatan setiap 24 jam (kira-kira selama 14hari sel akan keluar dari *explan*)
10. Tiap 2-3 hari sekali ganti medium. Gunakan micropipette untuk membuag sebagian medium dan diganti fresh medium dengan ukuran yang sama.
11. Medium komplit ditambahkan 5 ml apabila sel muncul dari explain.
12. Setelah 24 sampai 72 jam, sel yang mengapung dipindahkan ke cawan petri jaringan yang baru.

3.6.3. Kultur Sel

1. Ditanam pada cawan petri jaringan

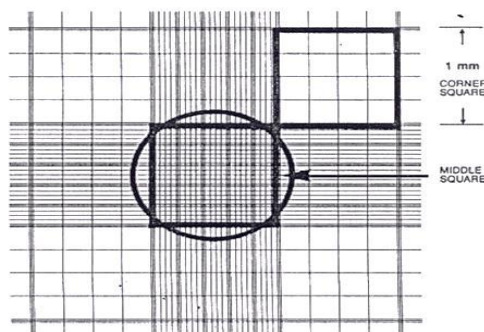
2. Inkubasi pada inkubator dengan CO₂ 5% pada suhu 37°C
3. Tiap 2 sampai 3 hari sekali ganti setengah medium sampai konfluens sel 80%

3.6.4. Proses Pemanenan Sel

1. Panen sel menggunakan panen sel ketiga yang dipindahkan ke *cover slip*.
2. Untuk memisahkan medium dan sel gunakan PBS 1ml dan tripsin 1ml
3. Inkubasi pada suhu 37°C selama 3 menit
4. Gunakan mikroskop untuk melihat sel yang sudah lepas
5. Ambil PBS dan tripsin dengan micropipette apabila sel dipastikan sudah lepas
6. Ganti menggunakan medium komplet.

3.6.5. Proses Penghitungan Sel

1. 10µl sel disiapkan dan di masukan ke *cryotube*
2. Menambahkan triptofan blue 90µl ke dalam *cryotube*
3. 10µL dipipetkan ke dalam bilik hitung yg sudah ditutup dengan *deck glass*
4. Diamati dengan mikroskop inverted pada 4 bilik hitung
5. Cara penghitungan:
 - Hitung sel pada 4 bilik hemositometer.
 - Sel yang hidup → bening terang.
 - Sel yang mati → biru gelap.



Gambar 3.1. Bilik Hitung

Gambar diatas menunjukan kotak pada *haemocytometer* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel yang digunakan adalah 4 kotak paling pojok (kiri, kanan, atas, dan bawah). Sedangkan kotak tengah tidak digunakan. Hitung jumlah sel dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\sum n1 + \sum n2 + \sum n3 + \sum n4}{4} \times 10^4 \times \text{pengenceran}$$

3.6.6. Pembacaan CD73, CD90 dan CD105 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM *accutaseTM cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel /ml di dalam BD PharmingenTM *Stain Buffer* (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS) *buffer*. Sel dapat dire suspensi pada kosentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.
2. Tabung falcon 5ml dan label sebagai berikut :

Tabel 3.1. Reagen yang digunakan dalam *Flow Cytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
--------	--------	------------------------

1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD90	5 μ l
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD44	5 μ l
3	<i>PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human</i> CD105	5 μ l
4	APC <i>Mouse anti-human</i> CD73	5 μ l
5	Kosong	-
6	<i>hMSC positive isotype control cocktail</i>	20 μ l
7	<i>hMSC negative isotype control cocktail</i>	20 μ l
	<i>hMSC positive cocktail</i>	20 μ l
	<i>PE hMSC negative cocktail</i>	20 μ l

3. Tabung ke 5 sampai 7 diulang untuk setiap penambahan sampel.
4. Ambil 100 μ l sampel, masukan kedalam masing-masing tabung.
5. *Tapping atau vortex.*
6. Inkubasi dalam ruang gelap dan pada suhu kamar selama 30 menit.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan PBS dan resuspensi dengan 300 sampai 500 μ l *stain bufer* PBS atau satu kali FBS.
8. Baca pada *flow cytometry*
9. Gunakan tabung 1 sampai 5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

3.6.7. Prosedur Hipoksia

1. *Chamber* disiapkan
2. *Well* yang berisi MSC dimasukkan kedalam *chamber*
3. *Oxygenmeter* diletakkan ke dalam *chamber*
4. Chamber dipastikan tertutup rapat
5. CO₂ dialirkan melalui selang yang sudah terhubung ke chamber
6. *Oxygenmeter* diamati sampai kadar O₂ 1,5-5%

7. Inkubasi selama 24jam
8. *Oxygen meter* tetap diamati agar kadar O₂ tetap 1,5% - 5%.

3.6.8. Pembuatan Luka Pada Hewan Coba

1. Selama tiga hari tikus diadaptasi.
2. Selanjutnya, 20 ekor tikus dirandomisasi dan dibagi jadi 4 kelompok.
3. Tikus dibuat sedasi, dengan cara injeksi xylazine 10% + 0.5cc ketamine 90% pada bagianperut kiri bawa tikus.
4. Apabila tikus sudah tertedasi, area perlukaan dilakukan pen cukuran.
5. Bersihkan dengan kasa dan povidine iodine di area perlukaan
6. Dengan punch biopsy 6 mm tikus dilukai sampai ke area dermis
7. Masukkan seluruh tikus sesuai kelompok pada kandang yang tersedia, kemudian dibiarkan tanpa perlakuan dan tetap diberi pakan standar selama 24 jam.

3.6.9. Perlakuan Pada Luka Hewan Coba

Masing-masing kelompok mendapatkan perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I : tikus luka tidak diberikan perlakuan (sham).

Kelompok II : tikus luka diberikan PBS (*Phospat Buffer Saline*) secara sub kutan (kontrol)

Kelompok III : tikus luka diberikan MSC normoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ dalam PBS secara sub kutan

Kelompok IV: tikus luka diberikan MSC hipoksia dengan dosis $1,5 \times 10^6$ dalam PBS secara sub kutan

1. Siapkan tikus sesuai kelompok (pasca 24 jam pembuatan luka pada hewan coba)
2. Siapkan sejumlah 15 spuit masing-masing berisi 1cc dosis untuk tiap kelompok II, II dan IV tersedia 5 spuit perkelompok
3. Sebelum penyuntikan, pada bagian penyuntikan diberi *alcohol swab*
4. Lakukan penyuntikan dengan teknik injeksi sub kutan di 4 sisi luka (kanan, kiri, atas dan bawah), dengan jarak 0.5 cm dari tepi luka.
5. Setelah perlakuan dihitung sebagai hari pertama.

3.6.10. Pengambilan Sampel Darah Tikus

1. Pengambilan menggunakan tabung hematokrit dan sampel darah diambil melalui vena orbita tikus.
2. Untuk mendapatkan serum lakukan sentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
3. Lakukan pengambilan serum pada hari ke 12, 18 dan 24

3.6.11. Perhitungan Kadar TGF- β

1. Menyampurkan standard dan dilusi standard menjadi konsentrasi 300, 150, 75, 37,5 , 18,7 , dan 0 pg/ml.
2. Siapkan sumur sampel, sumur standard dan sumur kosong.
3. Tambahkan 50 μ l cairan konjugasi ke dalam sumur standard.

4. Tambahkan 10 μ l sampel dan dilusi spesial 40 μ l
5. Tambahkan 50 μ l *horse radish peroxidase* pada tiap lubang
6. Inkubasi dengan suhu 37°C selama 60 menit.
7. Cairan dibuang dan tiap sumuran dikeringkan
8. Tambahkan cairan pencuci lalu kocok selama 30 menit, dan ulangi sebanyak lima kali lalu dikeringkan.
9. Pada tiap sumuran masukan 50 μ l chromogen solution A dan B . Aduk rata dan inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.
10. Tiap sumuran diberi larutan *Stopper* 50 μ l
11. Pembacaan menggunakan ELISA dengan panjang gelombang 450 nm.

3.7. Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* FK Unissula (SCCR) Semarang.

3.7.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2021.

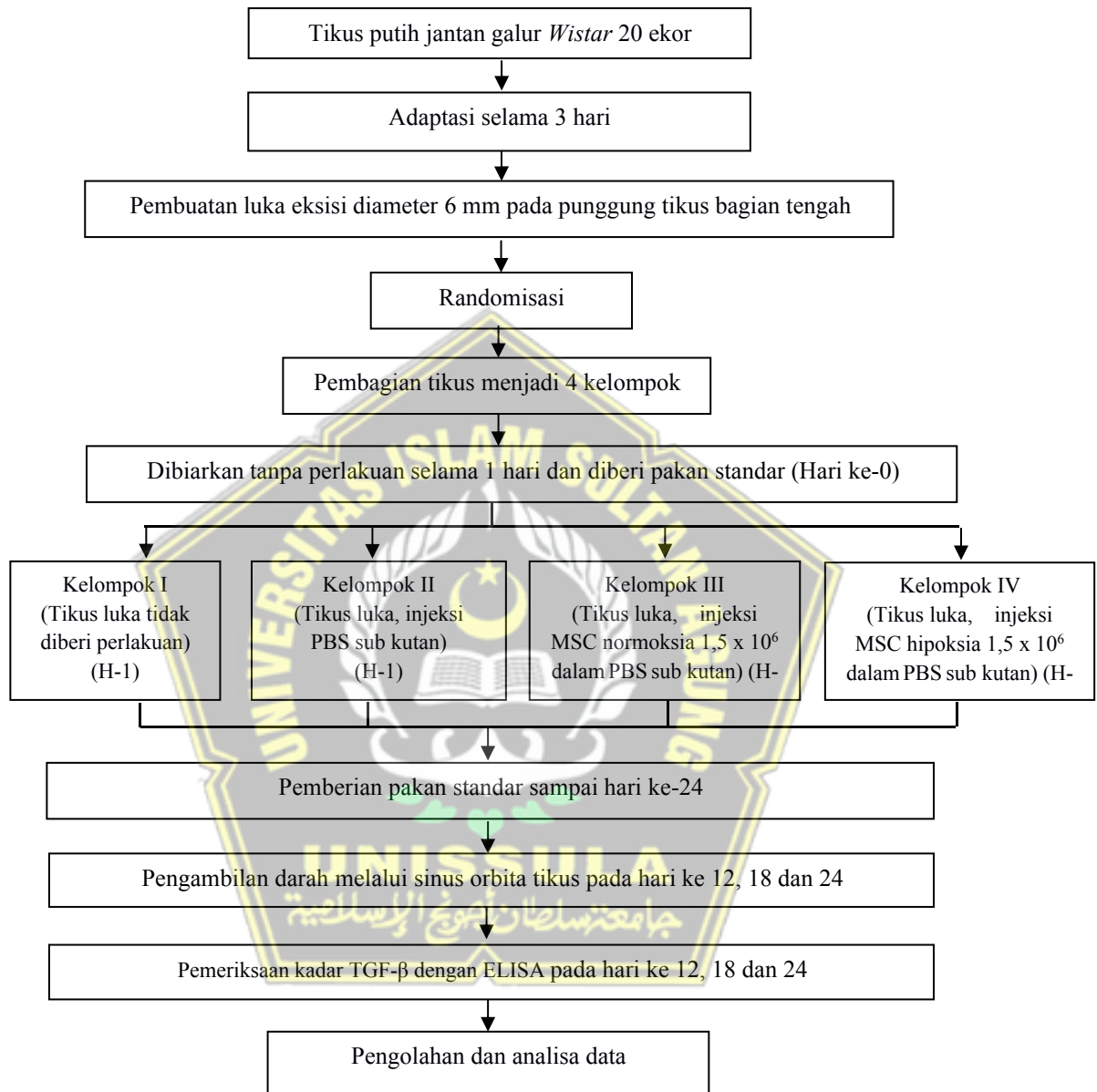
3.8. Analisa Data

Data penelitian ini kemudian ditabulasi, disunting dan disesuaikan. Kemudian dilakukan uji deskriptif yang meliputi variabel bebas (skala rasio) dan variabel tergantung (skala rasio). Selanjutnya dilakukan uji *Shapiro Wilk* untuk melakukan uji normalitas dan uji homogenitas dengan

menggunakan uji *levene*. Kemudian dilanjutkan dengan uji beda menggunakan *One Way Anova* apabila di dapatkan hasil varian data sama ($p > 0,05$) dan sebaran data normal ($p > 0,05$). Jika uji beda di dapatkan hasil ($p < 0,05$) maka akan di dengan uji beda dua kelompok dengan uji *Post Hoc Tamhane*. Dilanjutkan dengan *Uji kruskal walis* apabila didapatkan varian tidak sama ($p < 0,05$) dan sebaran data tidak normal ($p < 0,05$). Dilanjutkan dengan uji *mann whitney* apabila didapatkan hasil uji *kruskal walis* ($p < 0,05$). Analisa data penelitian dikelolah dengan SPSS 22.0 *for windows*.



3.9. Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur penelitian

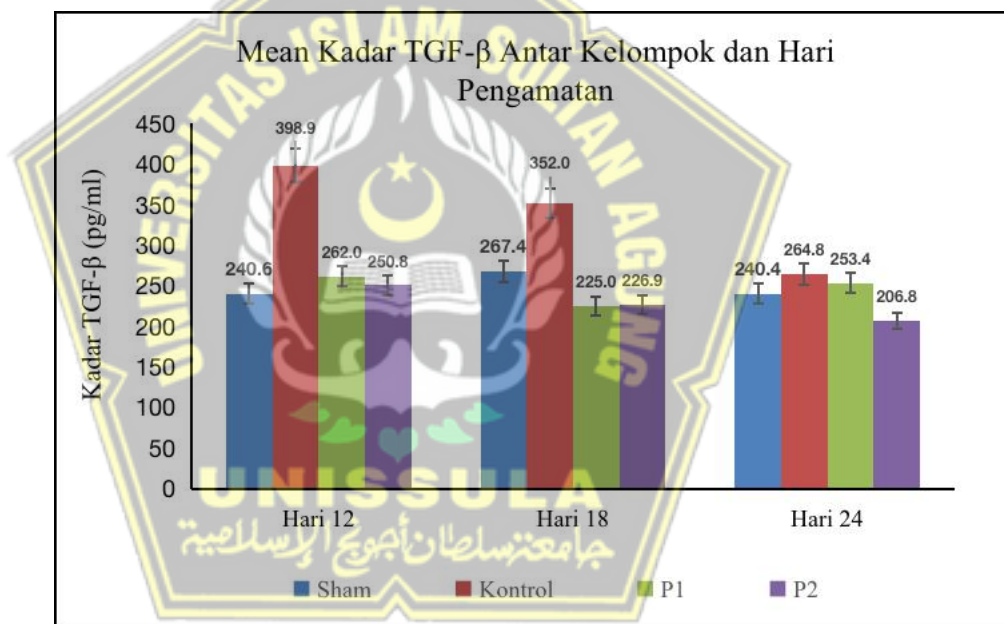
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1 Deskripsi data kadar *transforming growth factor-β*

Berdasarkan 3 (tiga) kali pengamatan yaitu pada hari ke-12, 18 dan 24 pada 4 (empat) kelompok uji diperoleh deskripsi/gambaran kadar TGF- β yang disajikan dalam bentuk nilai rerata sebagai berikut :



Gambar 4.1. Grafik mean kadar TGF- β antar kelompok dan hari pengamatan

Grafik bar di atas memperlihatkan bahwa kadar TGF- β pada ketiga hari pengamatan di kelompok kontrol adalah yang tertinggi dibandingkan dengan 3 (tiga) kelompok lainnya. Pada pengamatan hari ke-12, kadar TGF- β tersebut paling tinggi yaitu mencapai angka 398,9

pg/ml. Pada kelompok sham, kadar TGF- β hari ke-12 relatif sama dengan hari ke-24 (240,6 dan 240,4 pg/ml) dan lebih rendah daripada hari ke-18 (267,4 pg/ml). Pada kelompok P1, pengamatan hari ke-12 terlihat lebih tinggi (262 pg/ml), menurun pada hari ke-18 (225,0 pg/ml) dan kembali naik pada hari ke-24 (253,5 pg/ml). Pada kelompok P2, menunjukkan trend menurun dari hari ke-12 hingga hari ke-24.

4.1.2 Analisis perbedaan kadar TGF- β

Perbedaan kadar TGF- β dilakukan menggunakan analisis parametrik dengan uji *one way anova* pada tiap hari pengamatan. Analisis ini dilakukan karena data terbukti menyebar normal dan atau memiliki varian homogen. Hasil analisis secara rinci ditunjukkan sebagai berikut:

1. Pengamatan Hari Ke-12

Tabel 4.1 Normalitas sebaran data, homogenitas varian dan perbedaan TGF- β antar kelompok pada hari ke-12

No	Kelompok	p-value			Uji <i>One Way Anova</i>
		<i>Shapiro Wilk Test</i>	<i>Levene Test</i>		
		Data Aktual	Data Aktual	Hasil Transformasi ke log natural	
1	Sham	0,987*			
2	Kontrol	0,794*			
3	P1	0,341*	0,002	0,000	0,008 [^]
4	P2	0,542*			

Keterangan: * = distribusi normal, [^] = berbeda bermakna

Berdasarkan Tabel 4.1 tampak bahwa sebaran data TGF- β pada masing-masing kelompok normal ($p > 0,05$) namun tidak homogen ($p < 0,05$) meskipun juga sudah ditransformasi ke bentuk logaritma natural (Lampiran 3). Pengujian dengan *one way anova* didapatkan *p-value* lebih kecil dari 0,05 yaitu sebesar 0,008 artinya kadar TGF- β diantara empat kelompok memiliki beda signifikan. Beda signifikan tersebut selanjutnya diuji dengan *post hoc Tamhane test* terkait varian data yang tidak homogen (Dahlan, 2016). Hasil uji post hoc disajikan sebagai berikut:

Tabel 4.2 Analisis perbedaan kadar TGF- β tiap 2 (dua) kelompok pada pengamatan hari ke-12

Kelompok	Sham	Kontrol	P1	P2
Sham	-	0,009*	1,000	0,995
Kontrol		-	0,342	0,013*
P1			-	1,000
P2				-

Keterangan: * = ada beda bermakna

Perbedaan kadar TGF- β yang signifikan hanya terdapat pada kelompok sham dan kontrol, serta pada kelompok kontrol dan P2 (nilai p yang didapatkan masing-masing dibawah 0,05). Hasil ini memberikan makna bahwa pada model luka eksisi terjadi peningkatan kadar TGF- β , dan pemberian MSC hipoksia menurunkan kadar TGF- β tersebut.

2. Pengamatan Hari Ke-18

Tabel 4.3 Normalitas sebaran data, homogenitas varian dan perbedaan TGF- β antar kelompok pada hari ke-18

No	Kelompok	p-value			
		Shapiro Wilk		Levene <i>test</i>	Uji <i>One</i> <i>Way Anova</i>
		Data Aktual	Hasil Transformasi ke logaritma		
1	Sham	0,757*	0,678*		
2	Kontrol	0,378*	0,357*		
3	P1	0,378*	0,248*	0,083**	0,130
4	P2	0,030	0,176*		

Keterangan: * = distribusi normal, ** = varian homogen

Sebaran kadar TGF- β pada kelompok P2 tidak normal karena memiliki nilai p di bawah 0,05 yaitu sebesar 0,030, namun setelah ditransformasi ke logaritma dapat diperoleh sebaran data normal ($p = 0,176$). Varian data TGF- β di hari ke-18 ini juga homogen sehingga perbedaannya dianalisis menggunakan uji one way anova dan didapatkan *p-value* diatas 0,05 yaitu senilai 0,130 sehingga dinyatakan bahwa kadar TGF- β antar keempat kelompok pada hari ke-18 tidak signifikan sehingga tidak ada uji lanjutan.

3. Pengamatan Hari Ke-24

Tabel 4.4 Normalitas sebaran data, homogenitas varian dan perbedaan TGF- β antar kelompok pada hari ke-24

No	Kelompok	p-value		
		Shapiro Wilk	<i>Levene test</i>	Uji <i>One Way Anova</i>
1	Sham	0,767*		
2	Kontrol	0,147*	0,295**	0,689
3	P1	0,136*		
4	P2	0,691*		

Keterangan: * = distribusi normal, ** = varian homogen

Syarat asumsi untuk uji beda parametrik kadar TGF- β hari ke-24 semua terpenuhi yaitu distribusi tiap kelompok uji normal dan varian data homogen. Berdasarkan uji *one way anova* didapatkan p-value di atas 0,05 yaitu senilai 0,689 sehingga dinyatakan bahwa kadar TGF- β antar keempat kelompok pada hari ke-24 juga tidak berbeda signifikan dan tidak ada uji lanjutan. Hasil analisis kadar TGF- β pada hari ke-18 dan 24 menunjukkan bahwa MSC hipoksia yang diberikan sudah tidak memengaruhi kadar TGF- β pada model luka eksisi.

4.2. Pembahasan

Kadar TGF- β tertinggi yang ditunjukkan oleh kelompok kontrol pada hari ke-12 mencirikan peran TGF- β dalam menstimulasi mitogenik serta

kemotaktik dalam mengaktivasi migrasi keratinosit ke daerah luka dan menginisiasi pembentukan epitel hingga terjadi angiogenesis (Nauta *et al.*, 2011). Hari ke-12 termasuk dalam fase proliferasi penyembuhan luka secara fisiologis dimana pada fase ini kadar TGF- β biasanya tinggi (Al-Shaibani *et al.*, 2016).

Kadar TGF- β yang tinggi tersebut menurun melalui pemberian MSC hipoksia dalam dosis $1,5 \times 10^6$ sel, menandakan bahwa telah terjadi percepatan fase proliferasi dalam proses penyembuhan luka, karena umumnya fase proliferasi berlangsung hingga hari ke-14. Menurut penelitian terdahulu, penurunan kadar TGF- β berkaitan dengan peningkatan HGF yang umum ditemukan pada fase *remodelling* dari proses penyembuhan luka secara normal (Cerqueira *et al.*, 2016).

Percepatan fase proliferasi yang terjadi ini merupakan efek dari stimulasi lingkungan hipoksia yang dapat membantu MSC berproliferasi, berdiferensiasi dan meningkatkan survival serta mensekresi zat-zat aktif yang memiliki peran dalam mempercepat tahap-tahap pemulihan cedera/luka (Lakatos *et al.*, 2015). Kondisi hipoksia mengaktifkan faktor transkripsi HIF-1 α (Madrigal *et al.*, 2014) yang dibutuhkan untuk menginisiasi proses ekspresi gen yang responsif terhadap hipoksia misalnya faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) (Zainuri & Rif'ati, 2014) dan bFGF (Chen *et al.*, 2014) yang merupakan faktor-faktor pertumbuhan yang memiliki peran menstimuli angiogenesis (Razban *et al.*, 2012). Peran tersebut terjadi karena adanya mediasi HIF-1 α yang berdimerisasi dengan HIF- β untuk

membentuk HIF-1 dan kemudian mengikatkan diri pada elemen-elemen perespon hipoksia dalam gen promotor (Zainuri & Rif'ati, 2014).

Peran MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada pengamatan hari ke-18 dan 24 tidak terbukti. Terdapat dugaan bahwa MSC hipoksia mempengaruhi *marker* lain, karena pada hari ke-18 sudah memasuki fase *remodelling* pada proses normal penyembuhan luka. Pada hari ke-18 dan 24 ini juga sudah terlihat adanya penutupan luka, menandakan bahwa luka sudah mulai sembuh. Pada penelitian sebelumnya bahkan melaporkan bahwa penutupan luka sudah mulai terjadi di hari ke-11 hingga ke-14 setelah luka pada mencit diobati dengan MSC hipoksia secara topikal. Penutupan luka tersebut lebih cepat daripada yang ditunjukkan pada kelompok perlakuan MSC normoksia dan sham (Chen *et al.*, 2014). Pada hari ke-18 dan 24 ini terdapat kemungkinan bahwa pemberian MSC hipoksia mempengaruhi *marker-marker* seperti FGF2, MMP, PDGF, TIMPs, kolagen dan *marker-marker* lain yang umumnya muncul pada fase maturasi dan *remodelling* (Sun *et al.*, 2014).

Berdasarkan penelitian terdahulu dilaporkan bahwa MSC hipoksia meningkatkan proliferasi diri, dan meningkatkan pengaturan ekspresi bFGF, IGF-1, IL-6, IL-8 dan IL-1 β , mRNA, isoform TGF- β 2 dan 3, dan VEGF-A secara *in vitro*. bFGF dan VEGF-A adalah faktor pertumbuhan yang terkait dengan angiogenesis, perpindahan sel ke daerah luka, proliferasi, dan sebagainya. Proliferasi MSC meningkatkan efek mitogenik, kemoatraktif dan angiogenik sehingga dapat mempercepat proses penutupan luka. MSC

hipoksia menstimuli vaskularisasi baru dan meningkatkan perekrutan makrofag inflamasi, juga menurunkan kolagen I dan III untuk meningkatkan kualitas pemulihan luka (Chen *et al.*, 2014).

Hasil penelitian ini memunculkan ide baru untuk meneliti pengaruh pemberian MSC hipoksia terhadap kadar HGF dan VEGF-A pada hari ke-18 dan 24 pada tikus model luka eksisi. Penelitian ini namun demikian masih memiliki beberapa keterbatasan yaitu kondisi hipoksia dilakukan pada kadar oksigen 1,5 – 5% sedangkan penelitian lain menggunakan kadar oksigen 2%. Keterbatasan berikutnya yaitu tidak secara spesifik mengidentifikasi isoform dari TGF- β yang berkaitan dalam proses penyembuhan luka misalnya TGF- β 1 hingga TGF- β 3 mengingat isoform-isoform tersebut memiliki peran berbeda. TGF- β 1 dan TGF- β 2 selain menstimuli reepitelisasi dan angiogenesis serta deposisi matriks ekstraseluler, tetapi TGF- β 3 berperan sebaliknya yaitu menghambat deposisi. Pada tahap *remodelling*, TGF- β 3 menghambat proses transisi fibroblas menjadi miofibroblas sehingga menghasilkan kesembuhan luka tanpa jaringan parut, tetapi TGF- β 1 dan 2 menstimulasi proses tersebut sehingga menghasilkan kesembuhan luka dengan jaringan parut (Gilbert *et al.*, 2016).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian dinyatakan bahwa:

- 5.1.1 Hasil pengamatan hari ke 12 ($p < 0,05$), nilai p menunjukkan bahwa kadar TGF- β pada keempat kelompok berbeda bermakna, hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian MSC hipoksia menurunkan kadar TGF- β . Pada hari pengamatan 18 & 24 di dapatkan ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa kadar TGF- β tidak berbeda bermakna, yang menunjukkan bahwa MSC hipoksia yang diberikan sudah tidak memengaruhi kadar TGF- β .
- 5.1.2 Kadar TGF- β di kelompok sham pada hari ke-12, 18 dan 24 secara berturut-turut yaitu 240,6; 267,4; dan 240,4 pg/ml.
- 5.1.3. Kadar TGF- β di kelompok kontrol pada hari ke-12, 18 dan 24 secara berturut-turut yaitu 398,9; 352,0; dan 264,84 pg/ml.
- 5.1.4. Kadar TGF- β di kelompok MSC normoksia (P1) pada hari ke-12, 18 dan 24 secara berturut-turut yaitu 262,0; 225,0; dan 253,4 pg/ml.
- 5.1.5. Kadar TGF- β di kelompok MSC hipoksia (P2) pada hari ke-12, 18 dan 24 secara berturut-turut yaitu 250,8; 226,9; dan 206,8 pg/ml

5.2 Saran

Mengacu pada keterbatasan penelitian ini, maka pada penelitian mendatang perlu untuk:

- 5.2.1. Meneliti efek MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β 1, TGF- β 2 atau TGF- β 3 pada fase proliferasi dan remodelling di tikus Wistar model luka eksisi.
- 5.2.2. Meneliti efek MSC hipoksia terhadap kadar HGF dan VEGF-A pada fase proliferasi dan remodelling di tikus Wistar model luka eksisi.
- 5.2.3. Meneliti perbandingan efek MSC hipoksia pada kadar oksigen yang beragam terhadap kadar TGF- β di fase proliferasi dan remodelling di tikus Wistar model luka eksisi.



DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shaibani, M. B. H., Wang, X., Lovat, P. E., & Dickinson, A. M. (2016). Cellular Therapy for Wounds: Applications of Mesenchymal Stem Cells in Wound Healing. In *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*.
- Augustin M, Brocatti LK, Rustenbach SJ, Schäfer I, Herberger K. 2014. Cost-of-illness of leg ulcers in the community. *Int Wound J*. 11:283-292.
- Aydemir I., Öztürk S., Sönmez P.K., Tuglu M.I., 2016, Mesenchymal stem cells in skin wound healing, *Anatomy* 10(3): 228-234.
- Balitbang Kemenkes RI, 2013, *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*, Balitbang Kemenkes RI, Jakarta.
- Borthwick LA, Barron L, Hart KM, et al. 2016. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13- dependent lung inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol*. 9(1):38-55.
- Breit SN, Wahl SM. 2013. TGF- β and Related Cytokines in Inflammation. Springer, Switzerland.
- Caliari-Oliveira C, Yaochite JNU, Ramalho LNZ, Palma PVB, Carlos D, de Queiróz Cunha F, De Souza DA, Frade MAC, Covas DT, Malmegrim KCR, et al. 2016. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model. *Cell Transplant*. 25:201–215.
- Camões SP, Santos JM, Carvalho F, Miranda JP. 2020. Mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Concepts and Applications of Stem Cell Biology Learning Materials in Biosciences*. 247-267.
- Cerqueira CT, Pirraco RP, Marques AP. 2016. Stem Cells in Skin Wound Healing: Are We There Yet? *Advances In Wound Care*. 5(4).
- Cerqueira MT, Pirraco RP, Marques AP. 2016. Stem cells in skin wound healing: are we there yet? *Advances In Wound Care*. 5(4):164-175.
- Chen, L., Xu, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Yang, R., Xie, J., ... Qi, S. (2014). Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS ONE*, 9(4).
- Dahlan, M. S. (2016). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Ding D, Shyu W, Lin S. 2011. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 20(1):5-14.

- El Ayadi A, Jay JW, Prasai A. 2020. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1105.
- Fedik AR., Ferdiansyah, Purwati. 2014. *Stem Cell, Mesenchymal, Hematopoetik dan Model Aplikasi*. Edisi Kedua. Airlangga University Press, Surabaya.
- Gilbert RWD, Vickaryous MK, Vilorio-Petit AM. 2016. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J. Dev. Biol.* 4(2).
- Gonzalez-King H, García NA, Ontoria-Oviedo I, Ciria M, Montero JA, Sepúlveda P. 2017. Hypoxia inducible factor-1 α potentiates jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Stem Cells.* 35(7):1747–59.
- Guerrero PA, McCarty JH. 2017. TGF- β activation and signaling in angiogenesis, physiologic and pathologic angiogenesis - signaling mechanisms and targeted therapy. *IntechOpen*.
- Heikkinen P, Yliopisto T. 2015. Modulation of TGF- β Signaling by Hypoxia. Dissertation, University of Turku.
- Junqueira, L. C., 2010, Histologi Dasar, Edisi 12, EGC, Jakarta, hh. 309-317.
- Hofmann M. 2014. Stem cells and nanomaterials. *Adv Exp Med Biol.* 811:255-75.
- Halim D, Murti H, Sandra F, Boediono A, Djuwantono T, Setiawan B. 2010. *Stem Cell Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*. Jakarta : Erlangga.
- Hu MS, Borrelli MR, Lorenz HP, Longaker MT, Wan DC. 2018. Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: A comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential.
- Hu MS, Maan ZN, Wu JC, Rennert RC, Hong WX, Lai TS, Cheung ATM, Walmsley GG, Chung MT, McArdle A, Longaker MT, Lorenz HP. 2014. Tissue engineering and regenerative repair in wound healing. *Annals of Biomedical Engineering.* 42(7):1494–1507.
- Kanji S, Das H. 2017. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017:1-14.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. 2018. *Robbins Basic Pathology 10 ed.* Philadelphia: Elsevier.
- Lakatos K, Kalomoiris S, Merkely B, Nolta JA, Fierro FA. 2016. Mesenchymal stem cells respond to hypoxia by increasing diacylglycerols. *J Cell Biochem.* 117(2):300-7.

- Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. 2016. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Research & Therapy*. 7(37).
- Li Y, Wang M, Carra C, Cucinotta FA. 2012. Modularized Smad-regulated TGF β signaling pathway. *Mathematical Biosciences*. 240(2):187–200.
- Lindholm C, Searle R. 2016. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J*. 13 Suppl 2:5-15.
- Lu Z, Chen W, Li Y, Li L, Zhang H, Pang Y, Xiao Z, ,Xiao H, Xiao Y. 2016. TNF- α enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells via the NF- κ B, ERK and JNK signaling pathways, *Mol Med Rep*. 14(1): 643–648.
- Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K.M., Leung V.Y., 2014, Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32, 1408–1419.
- Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H., 2014, A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine* 2014, 12:260.
- Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, Inglés M, Gimeno-Mallench L, El Alami M, Viña-Almunia J, Gambini J, Viña J, Borrás C. 2019. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 20:1-27.
- Massague J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13(10):616–30.
- Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-miagkova A, Leroux MA. 2012. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Translational Medicine*. 1:142–149.
- Nauta, A., Larson, B., Longaker, M. T., & Peter Lorenz, H. (2011). Scarless Wound Healing. *Principles of Regenerative Medicine*, 2(2), 40–43.
- Oshimori N, Fuchs E. 2012. The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell Stem Cell*. 11(6):751-64.
- Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. 2013. Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2(5): 215–224.
- Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. 2015. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in

- regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015: 137823.
- Putra A, Wirastuti K, Sadyah NAC, et al. 2020. Mesenchymal stem cells suppress $\text{tgf-}\beta$ release to decrease α -sma expression in ameliorating ccl4-induced liver fibrosis. *Research Square*.
- Ramirez H, Patel SB, Pastar I. 2014. The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. *Advances In Wound Care.* 3(7).
- Razban, V., Lotfi, A. S., Soleimani, M., Ahmadi, H., Massumi, M., Khajeh, S., ... Khoshdel, A. (2012). HIF-1 α overexpression induces angiogenesis in mesenchymal stem cells. *BioResearch Open Access, 1*(4), 174–183.
- Saller MM, Prall WC, Docheva D, Schönitzer V, Popov T, Anz D, et al. 2012. Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 423(2):379–85.
- Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. 2017. Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res.* 58:81-94.
- Sun BK, Siphshvili Z, Khavari PA. 2014. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science.* 346(6212): 941-945.
- Wang L, Hu L, Zhou, X, et al. 2017. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Sci Rep.* 7:13321.
- Widowati W, Rihibiha DD, Khiong K, M. Widodo A, Sumitro SB, Bachtiar I. 2017. Hypoxia in mesenchymal stem cell, hypoxia and human diseases. *IntechOpen*.
- Williams AR, Hare JM. 2011. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease, *Circ Res.* 109(8): 923–940.
- Yolanda M, Maria A, Amaia F, Marcos PB, Silvia PL, Dolores E, Jesús O. 2014. Adult stem cell therapy in chronic wound healing. *J Stem Cell Res Ther* 4:1.
- Zainuri, M., & Rif'ati, L. (2014). Kajian Peran Manganese-Containing Super Oxide Dismutase (Mnsod) Dalam Regulasi Ekspresi Hypoxia Inducible Factor-1A (Hif-1A) Pada Keadaan Hipoksia. *Media of Health Research and Development, 23*(4), 143–148.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian

Hasil Analisis Deskripsi Kadar TGF- β Hari 12, 18 dan 24 (D12, D18 dan D24)

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Kadar TGF- β D12	sham	5	240.600	29.0826	13.0062	204.489	276.711	203.0	280.0
	kontrol	5	398.850	57.0350	25.5068	328.032	469.668	337.3	478.0
	P1	5	262.000	122.8800	54.9536	109.424	414.576	131.0	412.0
	P2	5	250.800	28.7524	12.8585	215.099	286.501	208.0	278.0
	Total	20	288.063	92.6429	20.7156	244.704	331.421	131.0	478.0
Kadar TGF- β D18	sham	5	267.400	30.3859	13.5890	229.671	305.129	229.0	303.0
	kontrol	5	351.950	108.2680	48.4189	217.518	486.382	208.5	453.0
	P1	5	224.950	108.2680	48.4189	90.518	359.382	81.5	326.0
	P2	5	226.900	89.5654	40.0549	115.690	338.110	159.0	383.5
	Total	20	267.800	98.0086	21.9154	221.931	313.669	81.5	453.0
Kadar TGF- β D24	sham	5	240.400	51.2669	22.9273	176.744	304.056	180.0	310.0
	kontrol	5	264.800	105.7300	47.2839	133.519	396.081	184.0	434.5
	P1	5	253.400	60.3854	27.0052	178.422	328.378	204.8	355.0
	P2	5	206.800	88.7789	39.7031	96.566	317.034	104.0	325.0
	Total	20	241.350	76.3611	17.0749	205.612	277.088	104.0	434.5

Hasil Analisis Normalitas Data Kadar TGF- β Hari 12, 18 dan 24 (D12, D18 dan D24)

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
	Group	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar TGF- β D12	sham	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	kontrol	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Kadar TGF- β D18	sham	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	kontrol	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
Kadar TGF- β D24	sham	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	kontrol	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Group	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar TGF- β D12	sham	.163	5	.200*	.992	5	.987
	kontrol	.189	5	.200*	.958	5	.794
	P1	.242	5	.200*	.887	5	.341
	P2	.199	5	.200*	.922	5	.542
Kadar TGF- β D18	sham	.199	5	.200*	.953	5	.757
	kontrol	.213	5	.200*	.894	5	.378
	P1	.213	5	.200*	.894	5	.378

	P2	.367	5	.026	.751	5	.030
Kadar TGF- β D24	sham	.197	5	.200*	.954	5	.767
	kontrol	.286	5	.200*	.833	5	.147
	P1	.263	5	.200*	.829	5	.136
	P2	.207	5	.200*	.944	5	.691

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil Homogenitas Varian Kadar TGF- β Hari 12 dan 18 (D12 dan D18)

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar TGF- β D12	7.953	3	16	.002
Kadar TGF- β D18	2.662	3	16	.083
Kadar TGF- β D24	1.344	3	16	.295

Hasil Analisis Normalitas Data Kadar TGF- β Hari 12, 18 dan 24 (D12, D18 dan D24) Setelah Transformasi

Case Processing Summary

	Group	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
log_D12	sham	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	kontrol	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
log_D18	sham	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	kontrol	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

log_D24	sham	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	kontrol	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P1	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	P2	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

Tests of Normality

	Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
log_D12	sham	.175	5	.200*	.987	5	.966
	kontrol	.186	5	.200*	.965	5	.840
	P1	.283	5	.200*	.841	5	.169
	P2	.201	5	.200*	.881	5	.314
log_D18	sham	.211	5	.200*	.942	5	.678
	kontrol	.233	5	.200*	.890	5	.357
	P1	.253	5	.200*	.865	5	.248
	P2	.311	5	.128	.844	5	.176
log_D24	sham	.224	5	.200*	.956	5	.782
	kontrol	.264	5	.200*	.880	5	.308
	P1	.248	5	.200*	.885	5	.334
	P2	.256	5	.200*	.935	5	.629

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil Analisis Homogenitas Varian Data Kadar TGF- β Hari 12, 18 dan 24 (D12, D18 dan D24) Setelah Transformasi

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
log_D12	17.088	3	16	.000
log_D18	3.960	3	16	.027
log_D24	2.568	3	16	.091

Hasil Analisis Perbedaan Kadar TGF- β Hari 12, 18 dan 24 (D12, D18 dan D24) dengan Uji One Way Anova

Oneway

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kadar TGF- β D12	Between Groups	82971.534	3	27657.178	5.525	.008
	Within Groups	80099.950	16	5006.247		
	Total	163071.484	19			
Kadar TGF- β D18	Between Groups	52951.575	3	17650.525	2.180	.130
	Within Groups	129556.625	16	8097.289		
	Total	182508.200	19			
Kadar TGF- β D24	Between Groups	9448.550	3	3149.517	.497	.689
	Within Groups	101340.875	16	6333.805		
	Total	110789.425	19			

Hasil Analisis Perbedaan Kadar TGF- β Hari 12 (D12) dengan Uji Post Hoc Tamhane

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar TGF- β D12

Tamhane

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
sham	kontrol	-158.2500*	28.6314	.009	-268.740	-47.760
	P1	-21.4000	56.4718	1.000	-275.099	232.299
	P2	-10.2000	18.2893	.995	-73.564	53.164
kontrol	sham	158.2500*	28.6314	.009	47.760	268.740
	P1	136.8500	60.5846	.342	-102.453	376.153
	P2	148.0500*	28.5646	.013	37.505	258.595
P1	sham	21.4000	56.4718	1.000	-232.299	275.099
	kontrol	-136.8500	60.5846	.342	-376.153	102.453
	P2	11.2000	56.4379	1.000	-242.705	265.105
P2	sham	10.2000	18.2893	.995	-53.164	73.564
	kontrol	-148.0500*	28.5646	.013	-258.595	-37.505
	P1	-11.2000	56.4379	1.000	-265.105	242.705

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 2. Ethical Clearance

**KOMISI BIOETIKA PENELITIAN KEDOKTERAN/KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG SEMARANG**

Sekretariat : Gedung C Lantai I Fakultas Kedokteran Unissula
Jl. Raya Kaligawe Km 4 Semarang, Telp. 024-6583584, Fax 024-6594366

Ethical Clearance

No. 196/VII/2021/Komisi Bioetik

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, setelah melakukan pengkajian atas usulan penelitian yang berjudul :

**PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA
PENYEMBUHAN LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING
(Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi
pada hari ke 12, 18 dan 24)**

Peneliti Utama : Elytia Mutia Rizkiyani
Pembimbing : Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si, Med.
dr. Azizah Retno K, Sp.A, M.Biomed
Tempat Penelitian : Laboratorium stem cell & cancer research FK Unissula

dengan ini menyatakan bahwa usulan penelitian diatas telah memenuhi prasyarat etik penelitian. Oleh karena itu Komisi Bioetika merekomendasikan agar penelitian ini dapat dilaksanakan dengan mempertimbangkan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki dan panduan yang tertuang dalam Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI tahun 2004.

Semarang, 30 Juli 2021

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan
Fakultas Kedokteran Unissula

Ketua,



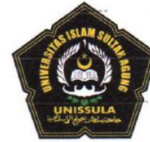
(dr. Sofwan Dahlan, Sp.F(K))

Lampiran 3. Surat Selesai Penelitian



Stem Cell and Cancer Research

Kaligawe raya Km 4, IBL Building, Unissula, Semarang 50112
Telp. (024) 6583584 Extension Laboratorium 600 Extension SCCR 125
www.sccr.id | info@sccr.id



SURAT KETERANGAN

No. 001/SK/SCCR/XI/2021

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med.
NIK : 210199050
Jabatan : Kepala Bagian Patologi Anatomi & SCCR FK UNISSULA Semarang

Menerangkan bahwa mahasiswa yang bernama :

Nama : Elytia Mutia Rizkiyani
NIM : 30101507438
Fakultas : Kedokteran Umum
Universitas : UNISSULA Semarang
Judul Skripsi : *Pengaruh MSC Hipoksia Terhadap Kadar TGF-B pada Penyembuhan Luka Fase Proliferasi dan Remodeling (Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Galur Wistar Jantan yang Dieksisi pada Hari ke 12, 18, 24)*

Benar-benar telah selesai melakukan penelitian di Laboratorium SCCR Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang pada bulan Agustus - Oktober 2021, dengan demikian dinyatakan **bebas laboratorium**.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan seperlunya.

Semarang, 23 November 2021

Mengetahui,

Kepala Bag. PA dan SCCR
Fakultas Kedokteran UNISSULA



Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med.
NIK. 210199050

Lampiran 4. Surat Undangan Ujian Hasil Skripsi

	FAKULTAS KEDOKTERAN	No. Dokumen	FORM-SA-K-KTI-011
	UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG	Tgl Berlaku	01 Oktober 2021
	Jl. Raya Kaligawe Km. 4, Semarang 50112, Jawa Tengah	No. Revisi	01
	Form Pengantar Ujian Hasil	Halaman	1 dari 1
Penelitian Skripsi			

No : 027/Skripsi-UH/FK/XII/2021
 Hal : Pengantar Ujian Hasil Penelitian Skripsi
 Lamp : 1 lembar

Kepada Yth. 1. dr. Eko Setiawan Sp.B (Ketua)
 2. dr. Kamilia Dwi Utami M.Biomed (Anggota)
 3. Assoc.Prof. Dr.dr.Agung Putra ,M.Si.Med (Anggota)
 4. dr. Azizah Retno Kustiyah Sp.A. (Anggota)

Penguji Skripsi FK UNISSULA
 di
 Semarang

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Dengan hormat,
 Bersama ini kami hadapkan mahasiswa sesuai yang tercantum di bawah ini :

Nama : ELYTIA MUTIA RIZKIYANI
 NIM : 30101507438
 Judul Skripsi : PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA
 PENYEMBUHAN LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING

Untuk dapat diuji pada waktu yang telah disepakati oleh mahasiswa ybs dengan ketiga/keempat Penguji.
 Adapun untuk memperlancar pelaksanaan ujian, para penguji dimohon untuk dapat hadir tepat waktu.

Demikian, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.



Semarang, 13 Desember 2021
 Ka. Unit Skripsi,


 Dr. Rita Kartika Sari, SKM, MKes

	FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG Jl. Raya Kaligawe Km. 4, Semarang 50112, Jawa Tengah	No. Dokumen	FORM-SA-K-KTI-012
		Tgl Berlaku	01 Oktober 2021
	Surat Keterangan Pelaksanaan Ujian Hasil Penelitian Skripsi	No. Revisi	01
		Halaman	1 dari 1

No. HP Mahasiswa : 081341558092

Yang bertanda tangan di bawah ini, adalah Tim Penguji Skripsi untuk mahasiswa :

Nama	: ELYTIA MUTIA RIZKIYANI
NIM	: 30101507438
Judul Skripsi	: PENGARUH MSC HIPOKSIA TERHADAP KADAR TGF- β PADA PENYEMBUHAN LUKA FASE PROLIFERASI DAN REMODELING

Menyatakan persetujuan untuk menguji mahasiswa tersebut, pada :

Hari / Tgl	: Selasa, 14 Desember 2021
Pukul	: 15.30 WIB
Tempat	: Zoom Meeting

TIM PENGUJI

1	dr. Eko Setiawan Sp.B
2	dr. Kamilia Dwi Utami M.Biomed
3	Assoc. Prof. Dr.dr.Agung Putra,M.Si.Med
4	dr. Azizah Retno Kustiyah Sp.A.

Catatan :

1 lembar surat keterangan ini (yang sudah ditandatangani seluruh penguji) diserahkan ke sekretariat pada saat melaporkan waktu ujian yang sudah disepakati (paling lambat 2 hari sebelum ujian). Tanpa itu, ujian bagi mahasiswa ybs **tidak akan dipersiapkan**.

Lampiran 5. Gambar Penelitian

