

**PENGARUH *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL*
TERHADAP EKSPRESI GEN *KERATINOCYTE*
GROWTH FACTOR (KGF) DAN *PLATELET DERIVED*
*GROWTH FACTOR (PDGF)***

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur
Wistar dengan Luka Bakar Derajat Dua)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Dewi Atika Putri

MBK.23.22.010400

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2025**

TESIS

**PENGARUH *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL*
TERHADAP EKSPRESI GEN *KERATINOCYTE*
GROWTH FACTOR (KGF) DAN *PLATELET DERIVED*
GROWTH FACTOR (PDGF)**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur
Wistar dengan Luka Bakar Derajat Dua)**

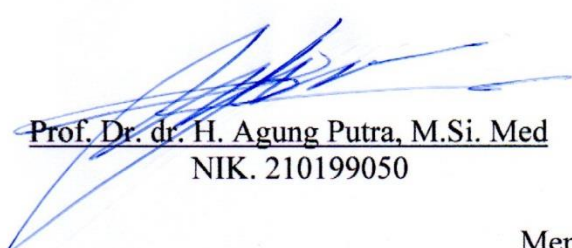
Disusun oleh :
Dewi Atika Putri
MBK.23.22.010400

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji
20 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II

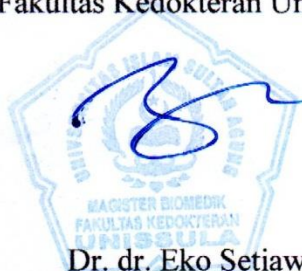


Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210199050



Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M. Kes
NIK. 220.198.045

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, SpB.FINACS
NIK. 210113160

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 11 Februari 2025



Dewi Atika Putri

KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI GEN *KERATINOCYTE GROWTH FACTOR* (KGF) DAN *PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR* (PDGF) (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan Luka Bakar Derajat Dua)**". Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Prof Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
6. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak. Aamiin yaa rabbal alamin.

Semarang, 25 September 2024

Penulis,



Dewi Atika Putri

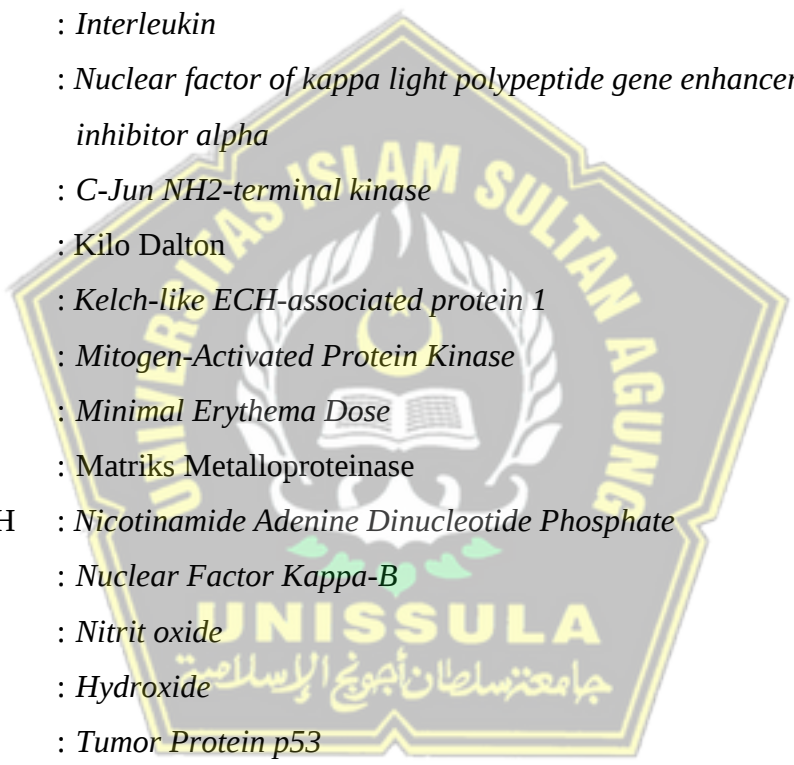
DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
ABSTRAK.....	xiii
ABSTRACT.....	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. Originalitas Penelitian.....	3
1.5. Manfaat penelitian.....	6
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.5.2. Manfaat Praktis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Keratinocyte Growth Factor (KGF).....	7
2.1.1. Definisi	7
2.1.2. Jalur Produksi dan Aktivasi KGF	7
2.2. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	9

2.2.1. Definisi	9
2.2.2. Struktur dan Mekanisme Aksi PDGF	10
2.2.3. Peran PDGF dalam Luka Bakar	10
2.3. Exosome Mesenchymal Stem Cell.....	13
2.3.1. Definisi	13
2.3.2. Fungsi dan Aplikasi Exosome MSC.....	14
2.4. Luka Bakar Derajat Dua.....	15
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	19
3.1. Kerangka Teori.....	19
3.2. Kerangka konsep.....	22
3.3. Hipotesis.....	22
BAB IV METODE PENELITIAN	23
4.1. Jenis Penelitian.....	23
4.2. Variabel Penelitian.....	24
4.2.1. Variabel Bebas.....	24
4.2.2. Variabel Terikat.....	24
4.3. Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	24
4.3.1. E-MSC	24
4.3.2. Ekspresi Gen Keratinocyte Growth Factor (KGF)	25
4.3.3. Platelet Derived Growth Factor	25
4.3.4. Subjek Penelitian	25
4.4. Sampel Penelitian.....	26
4.5. Besar Sampel.....	26
4.6. Teknik Sampling	27
4.7. Alat dan Bahan Penelitian.....	27
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian	28
4.9. Cara Kerja	28
4.9.1. Isolasi MSC	28
4.9.2. Isolasi Exosome MSC.....	29
4.9.3. Aklimatisasi Hewan Uji.....	31

4.9.4. Randomisasi Hewan Uji	31
4.9.5. Pembuatan Luka Bakar.....	31
4.9.6. Pemberian Treatment.....	32
4.10. Koleksi Sampel dan Analisis RT-PCR	33
4.10.1. Koleksi dan Homogenisasi Sampel	33
4.10.2. Pembacaan Ekspresi Gen KGF dan PDGF dengan RT-PCR ...	35
4.11. Analisis Data	35
4.12. Alur Penelitian	37
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
5.1 Hasil Penelitian	39
5.1.1. Validasi E-MSC.....	39
5.1.2. Validasi Luka bakar derajat 2 (LBD 2)	42
5.1.3. Hasil analisis ekspresi gen KGF.....	44
5.1.4. Hasil analisis ekspresi gen PDGF.....	46
5.2 Pembahasan Hasil Penelitian	48
SIMPULAN DAN SARAN	52
6.1 Kesimpulan	52
6.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	58
1. Keterangan penelitian dan hasil analisis	58
2. Surat izin etik penelitian.....	61
3. Lampiran kegiatan penelitian	62
4. Lampiran analisis statistik KGF.....	63
5. Lampiran analisis statistik PDGF	64

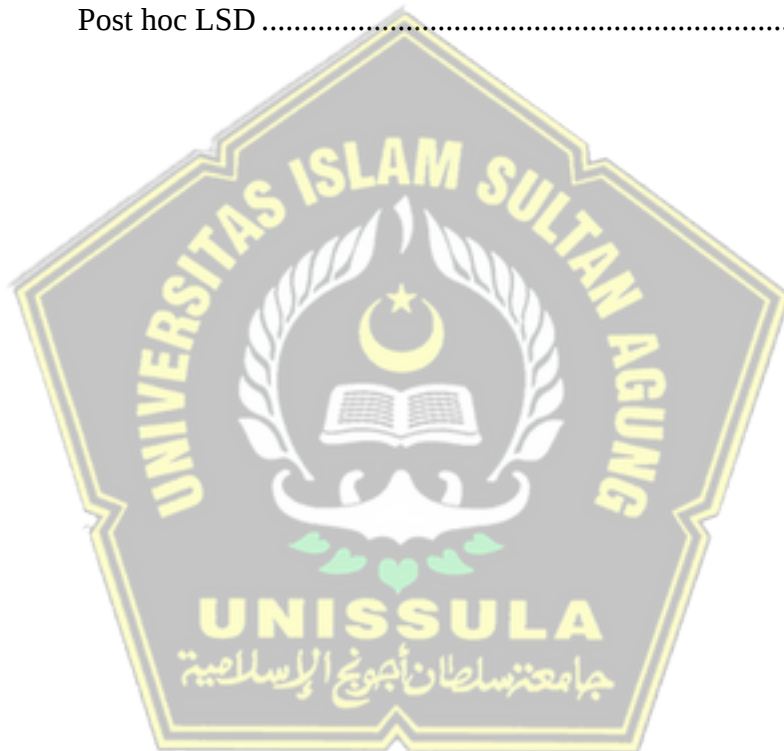
DAFTAR SINGKATAN



AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase-2 Inhibitor</i>
DAMP	: <i>Damage Associate Molecular Pattern</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen peroksida</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
I κ B α	: <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha</i>
JNK	: <i>C-Jun NH₂-terminal kinase</i>
kDA	: <i>Kilo Dalton</i>
Keap1	: <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NO	: <i>Nitrit oxide</i>
OH	: <i>Hydroxide</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen Associate Molecular Pattern</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMPS	: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRPV	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 5.1.	Data analisis rerata ekspresi gen KGF pada setiap kelompok.....	44
Tabel 5.2.	Perbedaan rerata ekspresi gen KGF antar dua kelompok dengan Uji Post hoc LSD	45
Tabel 5.3.	Data analisis rerata ekspresi gen PDGF pada setiap kelompok.....	46
Tabel 5.4.	Perbedaan rerata ekspresi PDGF antar dua kelompok dengan uji Post hoc LSD	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Gambaran Histologi Luka Bakar Derajat Dua.....	15
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian.....	23
Gambar 4.2.	Gambaran Histologi Luka Bakar derajat dua.....	32
Gambar 4.3.	Alur Penelitian	37
Gambar 5.1.	(A) Sel terisolasi berbentuk spindle-like pada perbesaran 100x. (B) Droplet Lipid terlihat sebagai warna vmerah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x. (C) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red.....	40
Gambar 5.2.	Analisis flow cytometry terhadap marker penanda MSC CD90, CD29, CD45, dan CD31.....	41
Gambar 5.3.	Validasi exosome terhadap ekspresi marker CD81, CD63 dan CD9.	42
Gambar 5.4.	Validasi Luka Bakar Derajat 2. (A) Tikus kelompok sehat, (B) Tikus kelompok Luka bakar, (C) Histopatologi Tikus Sehat menunjukkan struktur lapisan epidermis dan dermis tampak utuh serta tidak ada kerusakan atau nekrosis, (D) Histopatologi Tikus model luka bakar derajat 2 menunjukkan hilangnya lapisan epidermis, kerusakan bagian dermis dan nekrosis di bagian epidermal.....	43
Gambar 5.5.	Ekspresi gen PDGF lebih tinggi pada dosis lebih besar dengan injeksi sub cutan exosome terhadap model luka bakar derajat 2	47

ABSTRAK

Latar Belakang: Luka bakar Derajat Dua ditandai dengan rusaknya struktur dan fungsi kulit, serta hilangnya populasi sel progenitor yang penting untuk regenerasi dan pemulihan struktur kulit, kajian mengenai *exosome mesenchymal stem cell* (E-MSC) banyak dikaji karena memiliki kemampuan regeneratif terutama dalam memicu produksi protein-protein yang berperan dalam proses penyembuhan kulit terutama *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh E-MSC terhadap Ekspresi Gen KGF dan PDGF pada tikus dengan luka bakar Derajat Dua

Metode: Penelitian eksperimental ini dilakukan secara *in vivo* dengan desain *Post-test Only Control Group*. subjek menggunakan 28 ekor tikus, dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu (K1) tikus sehat, (K2) tikus dengan luka bakar derajat 2 (LBD2) diberikan injeksi NaCl, (K3) LBD 2 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 100 uL, dan (K4) dengan injeksi sub cutan exosome dosis 200 uL, ekspresi gen KGF dan PDGF dianalisis dengan metode RT-PCR, dan pengambilan kesimpulan dengan uji statistik *One Way Anova*

Hasil: Hasil rerata ekspresi gen KGF berbeda secara signifikan ($P < 0,05$), pada kelompok K2 $0,32 \pm 0,09$, K3 $0,65 \pm 0,03$, dan K4 $0,92 \pm 0,08$. Kelompok K2 menunjukkan ekspresi gen KGF paling rendah, diikuti oleh kelompok K3, dan paling tinggi pada kelompok K4. Hasil analisis ekspresi gen PDGF berbeda secara signifikan $p = 0,000$ ($p < 0,05$), didapatkan nilai pada kelompok K2 $0,66 \pm 0,08$, K3 $1,08 \pm 0,24$, dan K4 $1,49 \pm 0,19$. Kelompok K4 menunjukkan ekspresi gen KGF paling tinggi, diikuti oleh kelompok K3, dan paling rendah pada kelompok K2,

Kesimpulan: Pemberian E-MSC berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen KGF dan PDGF pada Tikus Jantan Galur Wistar model luka bakar Derajat Dua

Kata Kunci: luka bakar Derajat Dua, E-MSC, ekspresi KGF, PDGF

ABSTRACT

Background: Second Degree Burns are characterized by damage to the structure and function of the skin, as well as the loss of the progenitor cell population which is important for the regeneration and restoration of the skin structure, studies on exosome mesenchymal stem cells (E-MSC) have been widely studied because they have regenerative abilities, especially in triggering the production of proteins that play a role in the skin healing process, especially Keratinocyte Growth Factor (KGF) and Platelet Derived Growth Factor (PDGF). The purpose of this study was to determine the effect of E-MSC on KGF and PDGF Gene Expression in mice with Second Degree Burns.

Methods: This experimental was conducted in vivo with a Post-test Only Control Group design. subjects using 28 mice, divided into 4 treatment groups, namely (K1) healthy mice, (K2) mice with 2nd degree burns (LBD2) given NaCl injection, (K3) LBD 2 given subcutaneous exosome injection treatment at a dose of 100 μ L, and (K4) with subcutaneous exosome injection at a dose of 200 μ L, KGF and PDGF gene expression were analyzed by the RT-PCR method, and conclusions were drawn using the One Way Anova statistical test.

Results: The average results of KGF gene expression were significantly different ($P < 0.05$), in group K2 0.32 ± 0.09 , K3 0.65 ± 0.03 , and K4 0.92 ± 0.08 . Group K2 showed the lowest KGF gene expression, followed by group K3, and the highest in group K4. The results of the PDGF gene expression analysis were significantly different $p < 0.000$ ($p < 0.05$), the values obtained in group K2 were 0.66 ± 0.08 , K3 1.08 ± 0.24 , and K4 1.49 ± 0.19 . Group K4 showed the highest KGF gene expression, followed by group K3, and the lowest in group K2.

Conclusion: Administration of E-MSC has an effect on increasing the expression of KGF and PDGF genes in male Wistar rats with a second-degree burn model.

Keywords: Second Degree Burns, E-MSC, KGF expression, PDGF

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka bakar Derajat Dua ditandai dengan rusaknya struktur dan fungsi kulit, serta hilangnya populasi sel progenitor yang penting untuk regenerasi dan pemulihan struktur kulit yang menyebabkan terapi terbatas pada pencangkokan kulit autologous seperti *split-thickness grafts* dan *full-thickness graft*.^{1,2} Namun demikian, efektivitas metode tersebut masih terbatas karena kurangnya kulit donor, terutama pada pasien dengan luka bakar yang luas.² Hal ini menyebabkan kajian mengenai *exosome mesenchymal stem cell* (E-MSC) banyak dikaji karena memiliki kemampuan regeneratif terutama dalam memicu produksi protein-protein yang berperan dalam proses penyembuhan kulit terutama *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). Beberapa penelitian terdahulu melaporkan bahwa KGF dan PDGF yang penting dalam penyembuhan luka bakar Derajat Dua ditingkatkan oleh pemberian E-MSC sehingga mendukung proliferasi dan migrasi sel keratinosit serta fibroblast sehingga mempercepat penutupan luka dan re-epitelisasi.³⁻⁷ Namun demikian, peran E-MSC terhadap Ekspresi Gen KGF dan PDGF pada luka bakar derajat dua belum dikaji.

Khususnya di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah, luka bakar menyebabkan sekitar 180.000 kematian setiap tahun. Tingkat kematian akibat luka bakar sangat tinggi di Asia Tenggara (11,6 kematian per 100.000 penduduk per tahun) dibandingkan dengan tingkat yang jauh lebih rendah yaitu 1,0 kematian per 100.000 penduduk per tahun di negara-negara berpenghasilan tinggi. Di banyak

negara berpenghasilan tinggi, tingkat kematian akibat luka bakar telah menurun. Angka kejadian luka bakar per tahun adalah $141,8 \pm 26,761$. Kelompok usia dengan insiden tertinggi adalah 16-35 tahun (269 pasien), dengan usia rata-rata 29 ± 19 tahun. Penyebab utama luka bakar adalah ledakan kompor gas dengan 253 kasus (35,7%), diikuti oleh api dengan 189 kasus (26,7%). Tingkat kematian di unit luka bakar Ciptomangunkusumo adalah 25,8% (183 pasien), dengan jumlah kematian tertinggi pada pasien dengan luas area bakar total $>40\%$ (136 pasien).⁸

Exosome yang dihasilkan oleh E-MSC mengandung berbagai biomolekul yang berperan penting dalam penyembuhan luka.^{9,10} Beberapa komponen utama termasuk microRNA (miRNA) seperti miRNA-21, yang meningkatkan proliferasi dan migrasi sel serta mengurangi apoptosis, dan miRNA-126, yang meningkatkan angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru.¹¹ Exosome ini juga mengandung protein dan peptida seperti growth factors (VEGF, TGF- β , dan FGF) yang merangsang pertumbuhan sel, pembentukan pembuluh darah baru, dan regenerasi jaringan, serta cytokines seperti IL-10 dan IL-6 yang mengurangi inflamasi dan memodulasi respon imun.¹²

Selain itu, exosome MSCs mengandung phospholipids yang membantu komunikasi antar sel dan penyampaian sinyal untuk proses penyembuhan. Messenger RNA (mRNA) dalam exosome berfungsi sebagai template untuk sintesis protein yang diperlukan dalam proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan. Molekul lain yang terkandung termasuk adhesion molecules seperti integrins dan cadherins, yang membantu dalam interaksi dan migrasi sel ke area luka, serta komponen extracellular matrix (ECM) seperti hyaluronic acid dan

fibronectin yang menyediakan kerangka kerja untuk regenerasi jaringan. Namun demikian, peran E-MSC terhadap Ekspresi Gen KGF dan PDGF pada tikus model luka Derajat Dua masih belum dikaji.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat peningkatan ekspresi gen KGF dan PDGF pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan luka bakar Derajat Dua pasca pemberian pemberian E-MSC?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian E-MSC terhadap Ekspresi Gen KGF dan PDGF pada Tikus Jantan Galur Wistar model luka bakar Derajat Dua.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Untuk membuktikan pengaruh E-MSC dosis 100 uL dan 200 uL terhadap peningkatan Ekspresi Gen KGF pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan luka bakar Derajat Dua.
- b. Untuk membuktikan pengaruh E-MSC dosis 100 uL dan 200 uL terhadap peningkatan Ekspresi Gen PDGF pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan luka bakar Derajat Dua.

1.4. Originalitas Penelitian

Berdasarkan review literatur mengenai penggunaan E-MCS sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan, beberapa studi terkait telah diidentifikasi dan akan ditampilkan dalam Tabel 1 :

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Aryan, Arefeh Bayat, Mohammad Bonakdar, Shahin Taheri, Soudabeh Haghparsat, Newsha Bagheri, Mohammad Piryaei, Abbas Abdollahifar, Mohammad Amin ¹³	Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Wound Healing in Deep Second- Degree Burns in Male Rats	In vivo pada tikus	Conditioned Media MSC meningkatkan proliferasi dan produksi kolagens
Gangadaran, Prakash Oh, Eun Jung Rajendran, Ramya Lakshmi Oh, Ji Min Kim, Hyun Mi Kwak, Suin Chung, Ho Yun Lee, Jaetae Ahn, Byeong Cheol Hong, Chae Moon ¹⁴	Three- dimensional culture conditioned bone marrow MSC secretome accelerates wound healing in a burn injury mouse model	In vivo pada mencit	Secretome MSC mampu meningkatkan angiogenesis luka bakar
Aryan, Arefeh Bayat, Mohammad Bonakdar, Shahin Taheri, Soudabeh Haghparsat, Newsha Bagheri, Mohammad Piryaei, Mohammad Amin ¹⁵	Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Wound Healing in Deep Second- Degree Burns in Male Rats	In vivo pada tikus	hBM-MSC-CM mendukung penyembuhan luka kulit dengan meningkatkan proliferasi sel, mengatur sintesis kolagen kolagen, serta merangsang angiogenesis di lokasi cedera.
Padeta, Irma Nugroho, Dwi Lilie Fibrianto, Yuda Heru	Mesenchymal Stem Cell- conditioned Medium Promote the Recovery of	In vivo pada tikus	Peningkatan sel imunoreaktif bFGF pada kelompok MSC- CM menunjukkan peran penting bFGF

Budipitojo, Teguh ¹⁶	Skin Wound	Burn	dalam regenerasi luka bakar kulit.
Hu L, et.al. 2016 ¹⁷	Exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts.	HASC media kultur dan eksosom secara in vivo pada tikus	Hasil eksperimen in vivo menunjukkan ASCs-Exos dapat direkrut ke area luka jaringan lunak dalam model sayatan kulit tikus dan penyembuhan luka kulit secara signifikan

Penelitian terdahulu telah banyak dilakukan mengenai conditioned medium (CM) dari MSC, namun penelitian-penelitian tersebut masih terbatas pada penggunaan CM secara keseluruhan, yang mengandung berbagai komponen aktif, seperti protein, eksosom, dan molekul bioaktif lainnya. Hal ini membuat sulit untuk menentukan peran spesifik dari setiap komponen, terutama eksosom, dalam efek terapeutik yang diamati. Eksosom, sebagai vesikel kecil yang diproduksi oleh MSC, diketahui memiliki peran penting dalam komunikasi antar sel dan membawa berbagai molekul bioaktif, seperti miRNA dan protein. Oleh karena itu, penelitian yang akan dilakukan bertujuan untuk memisahkan eksosom dari CM MSC dan menggunakan eksosom murni yang telah diisolasi. Pendekatan ini memungkinkan analisis lebih mendalam mengenai kontribusi spesifik eksosom terhadap potensi terapeutik MSC, sehingga memberikan pemahaman yang lebih jelas tentang mekanisme kerja eksosom secara spesifik.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini memperluas wawasan biologi seluler dan molekuler terkait regenerasi jaringan kulit akibat luka bakar, dengan menyoroti peran exosome dari mesenchymal stem cell (MSC) dalam mempercepat penyembuhan melalui modulasi ekspresi gen KGF dan PDGF. Temuan ini diharapkan menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan terapi regeneratif berbasis exosome yang lebih efektif.

1.5.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini mendukung pengembangan terapi exosome MSC sebagai alternatif non-invasif untuk luka bakar serta mendorong inovasi farmasi dan bioteknologi medis guna menciptakan produk yang aman, efektif, dan mudah diakses.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Keratinocyte Growth Factor (KGF)

2.1.1. Definisi

Keratinocyte Growth Factor (KGF), juga dikenal sebagai fibroblast growth factor 7 (FGF7), adalah anggota dari keluarga fibroblast growth factor (FGF), yang terdiri dari protein-protein yang terlibat dalam berbagai proses biologis seperti perkembangan embrio, penyembuhan luka, pertumbuhan sel, dan diferensiasi sel.¹⁸ KGF memiliki berat molekul sekitar 28 kDa (kilodalton). Protein ini dikodekan oleh gen FGF7 yang terletak pada kromosom manusia 15q21.2, di mana gen tersebut menghasilkan mRNA yang kemudian ditranslasi menjadi protein KGF. Reseptor utama untuk KGF adalah Fibroblast Growth Factor Receptor 2b (FGFR2b), yang merupakan isoform dari FGFR2 dan terletak pada permukaan sel, terutama sel epitel.¹⁸ Protein FGFR2b mengikat KGF untuk memulai sinyal transduksi yang mendorong proliferasi dan migrasi sel-sel epitel. KGF memainkan peran penting dalam proses penyembuhan luka dengan merangsang pertumbuhan dan migrasi keratinosit, sel-sel utama yang membentuk lapisan epidermis, menjadikannya penting dalam terapi regeneratif.¹⁸

2.1.2. Jalur Produksi dan Aktivasi KGF

Proses sekresi KGF pada luka melibatkan serangkaian kompleks interaksi antara faktor sitokin, faktor pertumbuhan, jalur transkripsi, dan

regulasi genetik untuk mengoordinasikan penyembuhan. Ketika terjadi cedera pada jaringan, faktor sitokin seperti Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) dan Interleukin-1 (IL-1) dilepaskan oleh sel-sel inflamasi dan stroma di sekitar luka.¹⁹ TGF- β memicu kaskade sinyal yang melibatkan protein Smad, yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen-gen kunci seperti COL1A1 (kolagen tipe I alpha 1) dan FN1 (fibronectin). Kolagen dan fibronectin ini penting dalam membentuk matriks ekstraseluler yang mendukung penyembuhan luka.¹⁹

Selain itu, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) juga berperan penting dengan mengaktifkan jalur sinyal PI3K/Akt dan MAPK. Jalur ini mengatur ekspresi gen-gen yang mendukung proliferasi sel fibroblas dan angiogenesis, proses pembentukan pembuluh darah baru yang esensial untuk memperbaiki aliran darah ke area luka. Faktor transkripsi seperti NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) dan AP-1 (Activator Protein-1) diaktifkan oleh IL-1 untuk mengatur ekspresi gen inflamasi dan faktor pertumbuhan tambahan.¹⁹ KGF sendiri diproduksi oleh sel stroma di sekitar luka sebagai respons terhadap stimulasi oleh faktor-faktor pertumbuhan dan sitokin tersebut. KGF berikatan dengan reseptor FGFR2b pada sel-sel epitel, memulai jalur sinyal yang mengaktifkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel-sel epitel.¹⁹

Jalur aktivasi KGF dalam penyembuhan luka dimulai ketika KGF berinteraksi dengan reseptor utamanya, FGFR2b, yang umumnya terdapat pada permukaan sel-sel epitel. Interaksi ini memicu aktivasi berbagai jalur

sinyal intraseluler, termasuk jalur MAPK (mitogen-activated protein kinase) dan PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/Akt).¹⁹ Aktivasi jalur MAPK mengarah pada proliferasi sel dan migrasi keratinosit, yang penting untuk regenerasi epidermis. Sementara itu, jalur PI3K/Akt berkontribusi pada proses anti-apoptosis dan mempromosikan pertumbuhan sel. Selain itu, KGF juga dapat merangsang produksi faktor-faktor pertumbuhan lainnya seperti VKGF (Vascular Endothelial Growth Factor),²⁰ yang mempromosikan angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru, memperbaiki aliran darah ke area luka. Dengan cara ini, aktivasi jalur KGF memainkan peran krusial dalam memfasilitasi proses penyembuhan luka, mengoptimalkan regenerasi jaringan, dan mengurangi risiko komplikasi seperti jaringan parut.

2.2. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

2.2.1. Definisi

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) adalah sejenis protein yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan. PDGF termasuk dalam kelompok protein mitogenik yang dapat merangsang pertumbuhan dan proliferasi sel, khususnya sel fibroblas, otot polos, dan sel mesenkimal.^{21,22} PDGF terdiri dari beberapa isoform yang dibentuk oleh kombinasi rantai polipeptida berbeda, yaitu PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, dan PDGF-DD. Ukuran molekul PDGF bervariasi tergantung pada isoformnya, namun umumnya berkisar antara 30 hingga 35 kDa. Gen yang mentranskripsikan PDGF adalah PDGFA, PDGFB, PDGFC,

dan PDGFD, yang masing-masing mengkodekan rantai polipeptida spesifik yang kemudian membentuk dimer aktif melalui ikatan disulfida.²³

2.2.2. Struktur dan Mekanisme Aksi PDGF

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) memulai mekanisme transkripsinya dengan mengikat reseptor PDGF (PDGFR) pada permukaan sel target. PDGFR terdiri dari dua jenis, yaitu PDGFR- α dan PDGFR- β , yang dapat membentuk homodimer atau heterodimer ketika teraktivasi oleh PDGF. Pengikatan PDGF menyebabkan dimerisasi dan autofosforilasi PDGFR pada residu tirosin, yang mengaktifkan serangkaian jalur pensinyalan intraseluler. Jalur utama yang teraktivasi termasuk Jalur PI3K-Akt, Jalur Ras-MAPK, dan Jalur PLC γ .²⁴

Aktivasi Jalur PI3K-Akt berperan dalam proliferasi sel, kelangsungan hidup sel, dan pertumbuhan sel. Sementara itu, Jalur Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase) menginduksi ekspresi gen yang mendukung proliferasi dan diferensiasi sel. Jalur PLC γ (phospholipase C gamma) menghasilkan inositol trisfosfat (IP3) dan diasilgliserol (DAG), yang memicu pelepasan kalsium intraseluler dan aktivasi protein kinase C (PKC), berperan dalam regulasi siklus sel dan motilitas sel.²⁵

2.2.3. Peran PDGF dalam Luka Bakar

Platelet-Derived Growth Factor memainkan peran penting dalam penyembuhan luka bakar dengan mengatur berbagai tahap penyembuhan, mulai dari peradangan hingga remodeling jaringan. PDGF dilepaskan terutama oleh trombosit yang teraktivasi setelah cedera, namun makrofag,

fibroblas, dan sel endotel juga berkontribusi dalam pelepasan PDGF selama proses penyembuhan.²⁶

Tahap awal penyembuhan luka bakar dimulai segera setelah cedera terjadi. Trombosit yang teraktivasi di tempat cedera melepaskan PDGF sebagai bagian dari proses degranulasi mereka. PDGF kemudian mengikat reseptor PDGFR pada permukaan sel target, seperti fibroblas, sel endotel, dan makrofag. Pengikatan ini menyebabkan dimerisasi dan autofosforilasi reseptor, yang mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler seperti PI3K-Akt, Ras-MAPK, dan PLC γ . Jalur-jalur ini mengatur berbagai proses seluler yang penting untuk penyembuhan luka, termasuk proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel.²⁴

Selama tahap peradangan, PDGF berfungsi sebagai kemotaktik kuat yang menarik neutrofil dan makrofag ke lokasi cedera. Neutrofil adalah sel pertama yang tiba dan mereka berperan dalam membersihkan jaringan mati dan patogen melalui fagositosis. Kemudian, makrofag yang diaktifkan oleh PDGF melanjutkan proses fagositosis dan melepaskan lebih banyak faktor pertumbuhan, termasuk PDGF itu sendiri, yang memperkuat sinyal kemotaktik dan mendukung peradangan yang terkontrol. Makrofag juga mengeluarkan sitokin dan faktor pertumbuhan lain yang menginisiasi fase proliferasi.²⁷

Pada tahap proliferasi, PDGF merangsang proliferasi dan migrasi fibroblas ke lokasi luka. Fibroblas adalah sel utama yang bertanggung jawab untuk sintesis dan deposisi matriks ekstraseluler (ECM), terutama kolagen,

yang membentuk jaringan granula. Jaringan granula ini menyediakan kerangka kerja untuk regenerasi jaringan dan membantu mengisi ruang yang rusak akibat luka bakar. PDGF juga berperan dalam angiogenesis, yaitu pembentukan pembuluh darah baru. Ini dicapai dengan merangsang proliferasi dan migrasi sel endotel, yang membentuk lapisan dalam pembuluh darah. Pembentukan pembuluh darah baru sangat penting untuk menyediakan oksigen dan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan penyembuhan jaringan.^{28,29}

Selain itu, PDGF meningkatkan kontraktilitas fibroblas, yang berkontribusi pada penutupan luka. Fibroblas yang teraktivasi oleh PDGF berubah menjadi miofibroblas, yang memiliki kemampuan kontraktile mirip dengan sel otot halus. Miofibroblas ini membantu menarik tepi luka bersama-sama, mempercepat proses penutupan luka.^{28,29}

Pada tahap remodeling, PDGF terus memainkan peran penting dalam mengatur remodeling ECM. Proses ini melibatkan keseimbangan antara sintesis komponen ECM baru dan degradasi komponen ECM lama. PDGF mengatur aktivitas enzim-enzim seperti matrix metalloproteinases (MMPs) yang memecah ECM lama, memungkinkan pembentukan jaringan baru yang lebih terorganisir dan kuat. Remodeling ECM ini penting untuk membentuk jaringan parut yang kuat dan fungsional, serta untuk mengembalikan integritas dan fungsi kulit.^{28,29}

PDGF juga berinteraksi dengan faktor pertumbuhan lain, seperti Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), untuk mengkoordinasikan

penyembuhan luka yang lebih efektif. TGF- β bekerja bersama dengan PDGF untuk merangsang sintesis kolagen oleh fibroblas dan mengatur diferensiasi sel. Kombinasi sinyal dari PDGF dan TGF- β memastikan bahwa proses penyembuhan berjalan dengan lancar dan efisien.^{28,29}

2.3. *Exosome Mesenchymal Stem Cell*

2.3.1. Definisi

Exosome Mesenchymal Stem Cell (MSC) adalah vesikel kecil yang dikeluarkan oleh sel punca mesenkimal (MSC) dan berperan penting dalam komunikasi antar sel. Exosome MSC memiliki ukuran sekitar 30-150 nm dan mengandung berbagai molekul bioaktif, termasuk protein, lipid, mRNA, miRNA, dan DNA. Exosome ini berfungsi sebagai pembawa informasi genetik dan protein yang dapat mempengaruhi fungsi sel target.³⁰

Karakteristik dan Komponen Exosome MSC antara lain adalah sebagai berikut³⁰ :

a. Ukuran dan Struktur:

- Ukuran : 30-150 nm.
- Struktur : Membran lipid bilayer yang mengelilingi komponen internal.

b. Komponen Bioaktif:

- Protein : Termasuk faktor pertumbuhan, sitokin, dan enzim.
- Lipid : Membran exosome kaya akan lipid tertentu yang berperan dalam stabilitas dan fusi dengan sel target.

- RNA : mRNA dan miRNA yang dapat mempengaruhi ekspresi gen pada sel penerima.
- DNA : Fragmen DNA yang dapat berperan dalam regulasi gen.

2.3.2. Fungsi dan Aplikasi Exosome MSC

Exosome Mesenchymal Stem Cells (MSC) memiliki berbagai manfaat terapeutik. Dalam regenerasi jaringan dan penyembuhan luka, mereka mengandung faktor pertumbuhan dan molekul bioaktif yang mendukung proliferasi, diferensiasi sel, dan angiogenesis, mempercepat proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan yang rusak.³¹

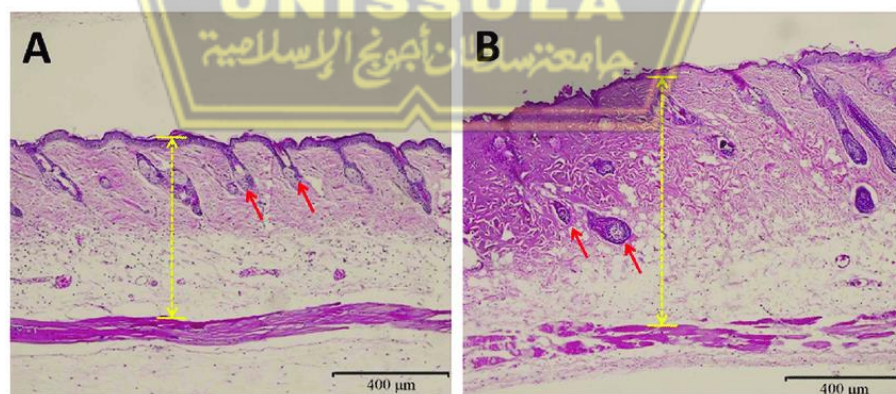
Dalam modulasi imun, exosome MSC memiliki sifat anti-inflamasi dan imunomodulator, membantu mengurangi respon inflamasi berlebihan dan meningkatkan toleransi imun, sehingga berpotensi dalam pengobatan penyakit autoimun dan inflamasi kronis. Selain itu, exosome MSC dapat digunakan sebagai sistem penghantaran obat yang efisien, mengantarkan molekul terapeutik langsung ke sel target, yang dapat meningkatkan efikasi obat dan mengurangi efek samping.³²

Dalam kardioproteksi, exosome MSC berperan dalam melindungi dan meregenerasi jaringan jantung setelah cedera iskemik, dengan kandungan molekul yang membantu angiogenesis dan perbaikan jaringan jantung. Terakhir, dalam neuroproteksi, exosome MSC memiliki potensi dalam pengobatan penyakit neurodegeneratif dengan mempromosikan kelangsungan hidup neuron dan mengurangi inflamasi di sistem saraf pusat.^{33,34}

2.4. Luka Bakar Derajat Dua

Luka bakar derajat dua adalah luka yang mempengaruhi epidermis dan sebagian dermis, lapisan di bawah epidermis. Luka ini biasanya lebih parah dibandingkan luka bakar derajat satu dan memerlukan perhatian medis segera. Luka bakar ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor, termasuk panas, bahan kimia, listrik, atau radiasi. Pada luka bakar derajat dua, kulit bisa terlihat merah, melepuh, bengkak, dan sangat nyeri.

Karakteristik utama luka bakar derajat dua adalah kerusakan yang mencapai dermis. Kulit yang terkena luka bakar derajat dua biasanya menampilkan lepuhan yang berisi cairan, yang merupakan tanda khas dari cedera pada lapisan dermis. Kulit di sekitar luka mungkin berwarna merah terang atau bahkan keputihan. Sensitivitas terhadap sentuhan dan suhu juga meningkat, karena ujung saraf di dermis yang terpengaruh. Karakteristik morfologi luka bakar derajat dua dapat terlihat di gambar 2.1



Gambar 2. 1. Gambaran Histologi Luka Bakar Derajat Dua³⁵

Ketika luka bakar terjadi, kerusakan langsung pada kulit memicu serangkaian respons biologis kompleks yang bertujuan untuk menyembuhkan jaringan yang rusak. Proses ini dapat dibagi menjadi beberapa fase:

1. Fase Inflamasi (Inflammatory Phase):

Pada fase awal ini, kerusakan pada jaringan memicu pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, bradikinin, sitokin (termasuk $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, dan IL-6). Mediator ini meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, menyebabkan pembengkakan (edema) dan kemerahan di sekitar area yang terbakar. Sel-sel seperti neutrofil dan makrofag direkrut ke area luka untuk memfagositosis debris dan bakteri, jika ada.

Selain itu selama proses inflamasi disekresikan kemokin seperti C5a dan leukotrien. Kedua protein ini merupakan mediator penting dalam proses inflamasi. C5a, yang dihasilkan dari aktivasi komplemen, berfungsi sebagai kemotaktik yang menarik sel-sel imun ke lokasi inflamasi. Ia juga meningkatkan permeabilitas vaskular, memfasilitasi masuknya sel-sel imun dan protein ke jaringan yang terinflamasi. Leukotrien, yang diproduksi oleh sel-sel imun seperti mast sel dan makrofag, berperan dalam memperpanjang respons inflamasi dengan merangsang kontraksi otot polos, meningkatkan permeabilitas kapiler, dan menarik lebih banyak sel inflamasi. Bersama-sama, C5a dan leukotrien meningkatkan intensitas dan durasi respon inflamasi, yang dapat berkontribusi pada penyembuhan atau patologi.

2. Fase Proliferaif (Proliferative Phase):

Setelah fase inflamasi, proses proliferasi dimulai, di mana fibroblas memainkan peran kunci. Fibroblas berperan dalam sintesis kolagen, protein utama yang diperlukan untuk membentuk jaringan parut. Selain itu, faktor pertumbuhan seperti TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) dan PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) menginduksi angiogenesis, yaitu pembentukan pembuluh darah baru untuk mendukung jaringan yang sedang pulih.

3. Fase Remodeling (Remodeling Phase):

Pada fase ini, jaringan yang baru terbentuk mengalami remodeling untuk mendapatkan kekuatan dan fungsionalitas optimal. Kolagen tipe III yang awalnya disintesis digantikan oleh kolagen tipe I yang lebih kuat dan terorganisir. MMP (Matrix Metalloproteinases) adalah enzim yang berperan dalam degradasi kolagen lama dan membantu proses remodeling jaringan. Sementara itu, TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) mengatur aktivitas MMP agar remodeling berjalan secara terkendali.

Beberapa protein penting terlibat dalam proses penyembuhan luka bakar derajat dua:

Kolagen: Kolagen tipe III dan tipe I adalah protein struktural utama yang memberikan kekuatan pada jaringan kulit selama proses penyembuhan dan remodeling.

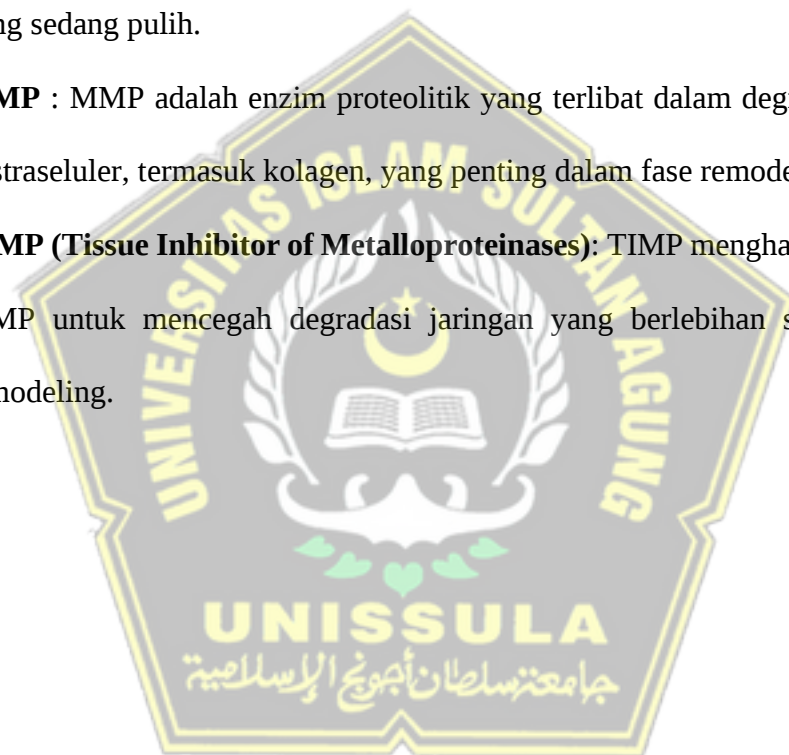
Fibrin: Fibrin terbentuk dari fibrinogen selama fase inflamasi dan membantu membentuk bekuan darah, yang berfungsi sebagai kerangka sementara untuk migrasi sel.

TGF- β : Protein ini adalah faktor pertumbuhan yang memodulasi berbagai aspek penyembuhan luka, termasuk proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen.

VEGF: VEGF mendorong angiogenesis, penting untuk suplai darah ke jaringan yang sedang pulih.

MMP : MMP adalah enzim proteolitik yang terlibat dalam degradasi matriks ekstraseluler, termasuk kolagen, yang penting dalam fase remodeling.

TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases): TIMP menghambat aktivitas MMP untuk mencegah degradasi jaringan yang berlebihan selama proses remodeling.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

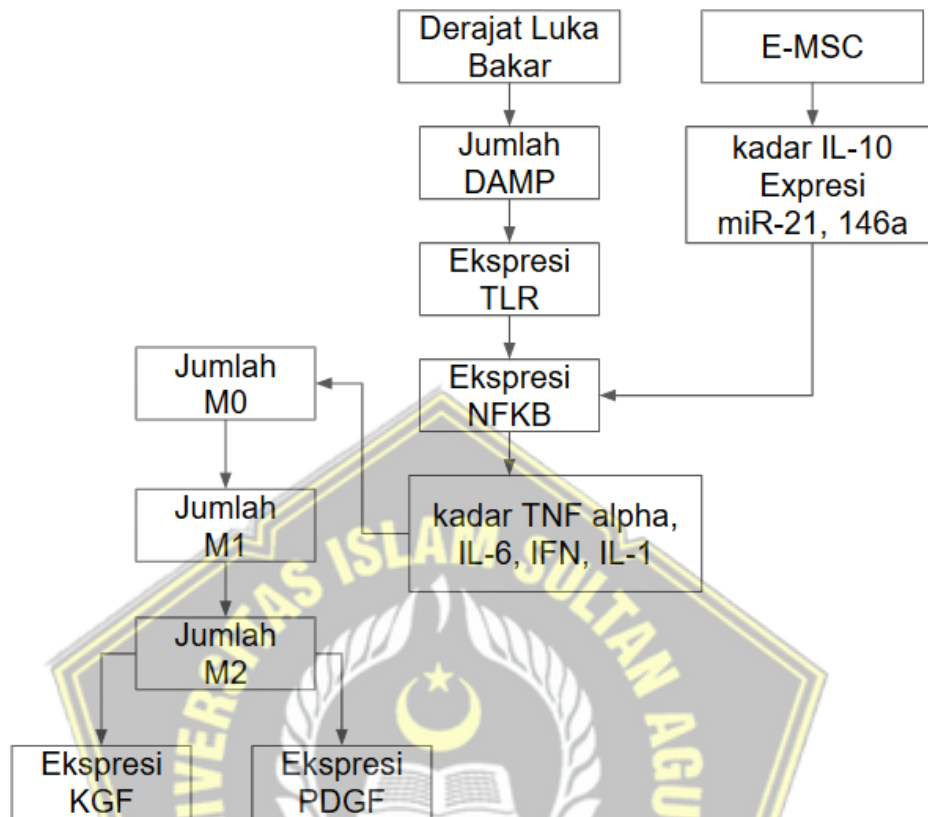
Luka bakar menyebabkan kerusakan langsung pada jaringan kulit dan jaringan di bawahnya, memicu serangkaian respons inflamasi kompleks dalam sistem imun. Kerusakan jaringan ini memicu pelepasan berbagai mediator inflamasi, termasuk sitokin seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α , serta prostaglandin dan histamin dari sel-sel yang rusak dan sel-sel imun seperti makrofag dan neutrofil. Protein-protein ini berperan penting dalam memicu vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler, yang memungkinkan lebih banyak sel-sel imun untuk bermigrasi ke lokasi luka.³⁶

Selain itu, faktor-faktor kemotaktik menarik neutrofil ke lokasi luka, di mana mereka mulai melakukan fagositosis terhadap patogen dan jaringan yang rusak. Neutrofil melepaskan enzim proteolitik seperti elastase dan zat oksidatif seperti superoksida yang dapat menghancurkan patogen, tetapi juga dapat merusak jaringan sehat di sekitarnya. Makrofag, selain melakukan fagositosis, juga melepaskan lebih banyak sitokin seperti IL-10 yang memiliki efek antiinflamasi, dan TGF- β yang berperan dalam aktivasi sel fibroblast sehingga berujung pada proliferasi sel dan produksi matriks ekstraseluler.³⁶⁻³⁸

Fibroblast yang teraktivasi mensekresikan berbagai protein termasuk KGF yang mendorong proliferasi dan migrasi keratinosit, yang penting untuk re-epitelisasi kulit. Selain itu disisi lain makrofag pada akhir fase inflamasi bersama dengan sel endotel dan platelet mensekresikan PDGF yang berperan dalam

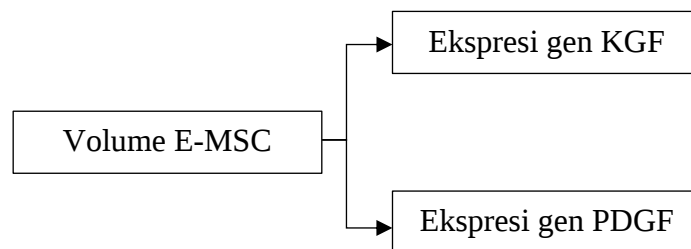
menarik fibroblast dan sel otot polos ke area luka dan merangsang sintesis matriks ekstraseluler, yang penting untuk pembentukan jaringan granulas. PDGF juga meningkatkan produksi kolagen oleh fibroblast, memperkuat struktur jaringan yang baru terbentuk.^{6,39,40}

Eksosom dari Mesenchymal Stem Cells (MSC) mengandung berbagai komponen seperti IL-10, TGF-beta, miRNA 21, dan miRNA 146a, yang berperan penting dalam mempercepat penyembuhan luka bakar.^{41,42} Sitokin seperti IL-1 β dan TNF- α , yang dilepaskan selama respon inflamasi awal setelah luka bakar, dapat dimodulasi oleh eksosom MSC melalui penurunan aktivasi NF- κ B dan pengurangan ekspresi sitokin pro-inflamasi. Hal ini akan menyebabkan berpindahnya fase inflamasi menjadi fase proliferasi yang ditandai dengan beralihnya makrofag menjadi makrofag tipe 2 yang mensekresikan TGF- β yang mengaktifasi sel fibroblast yang berujung pada produksi KGF.^{43,44} Selain itu makrofag juga mensekresikan PDGF yang berperan pada proliferasi dan penutupan luka. Dengan demikian, eksosom MSC memberikan pendekatan terapeutik yang komprehensif untuk memfasilitasi penyembuhan luka bakar dengan mempengaruhi berbagai jalur molekuler yang terlibat. Adapun hubungan antar variable tersebut digambarkan dalam Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh ekspresi gen KGF dan PDGF pasca pemberian E-MSK pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan luka bakar Derajat Dua.

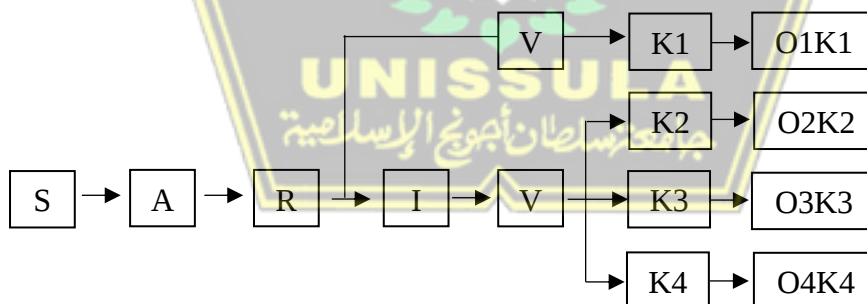


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian studi eksperimental ini dilakukan secara *in vivo* dengan desain *Post-test Only Control Group* dan menggunakan metode rancangan acak lengkap untuk setiap perlakuan. Desain ini memungkinkan peneliti mengukur efek perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkannya dengan kelompok kontrol. Pengambilan sampel dilakukan berdasarkan prinsip *non-probability sampling* secara *consecutive sampling*, dan terdapat kontrol pembanding. Sampel yang digunakan adalah kulit luka bakar dari tikus model dengan luka bakar Derajat Dua. Berikut merupakan rancangan penelitian yang akan dilakukan



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

S = Sampel

A = Aklimatisasi

R = Random

- I = Induksi LBD 3
- V = Validasi menggunakan pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (H&E)
- K1 = tikus sehat tanpa luka bakar tanpa perlakuan
- K2 = LBD 2 dengan perlakuan pemberian injeksi NaCl
- K3 = LBD 2 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 100 uL
- K4 = LBD 2 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 200 uL
- O1K1 = Observasi KGF dan Ekspresi Gen PDGF K1
- O2K2 = Observasi KGF dan Ekspresi Gen PDGF K2
- O3K3 = Observasi KGF dan Ekspresi Gen PDGF K3
- O4K4 = Observasi KGF dan Ekspresi Gen PDGF K4

4.2. Variabel Penelitian

4.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah injeksi E-MSC

4.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Ekspresi Gen KGF dan PDGF

4.3. Definisi Operasional Variabel Penelitian

4.3.1. E-MSC

Eksosom MSC berukuran 30-150 nm, memiliki marker permukaan CD63, CD81, dan CD9, serta mengandung protein, mRNA, dan miRNA. Isolasi eksosom menggunakan Tangential Flow Filtration (TFF) dengan cut-off membran 100 kDa untuk memisahkan partikel kecil. Exosome hipoksia *mesenchymal stem cell* diinjeksi secara subcutan di area LBD 3 dengan dosis 100 uL dan 200 uL.

Satuan : mL

Skala : rasio

4.3.2. *Ekspresi Gen Keratinocyte Growth Factor (KGF)*

Ekspresi gen KGF merupakan ekspresi gen KGF dari jaringan kulit dengan LBD 2 pada hari ke-7 setelah pemberian E-MSC.yang diukur menggunakan metode RT PCR.

Satuan : fold change

Skala : rasio

4.3.3. *Platelet Derived Growth Factor*

Ekspresi gen PDGF merupakan ekspresi gen PDGF dari jaringan kulit dengan LBD 2 pada hari ke-7 setelah pemberian E-MSC.yang diukur menggunakan metode RT PCR.

Satuan : fold change

Skala : rasio

4.3.4. **Subjek Penelitian**

4.3.4.1. Kriteria inklusi

- a) Tidak ada kelainan anatomis
- b) Bergerak secara aktif

4.3.4.2. Kriteria Eksklusi

- a) Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.4.3. Kriteria *Drop Out*

- a) Tikus mengalami infeksi atau

b) Tikus mati selama penelitian.

4.4. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur wistar Dewasa dengan berat badan $250-300 \text{ gram} \pm 10 \text{ gr}$ ($cv = 5\%$) yang termasuk kriteria inklusi. Semua sampel tikus yang digunakan dinyatakan sehat dan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia.

4.5. Besar Sampel

Pada penelitian ini besar sampel dihitung menggunakan rumus Federer untuk data homogen, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana t adalah banyaknya kelompok perlakuan dan n adalah jumlah sampel tiap kelompok Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan yang terdiri dari : tikus sehat tanpa luka bakar derajat dua (K1), luka bakar dengan perlakuan pemberian injeksi *Water for Injection* (K2), luka bakar yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 100 uL (K3) dan 200 uL (K4) sebanyak satu kali sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} (t-1)(n-1) &\geq 15 \\ (4-1)(n-1) &\geq 15 \\ 3(n-1) &\geq 15 \\ 3n-3 &\geq 15 \\ 3n &\geq 18 \\ n &\geq 6 \end{aligned}$$

Berdasarkan rumus tersebut, jumlah minimal sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok perlakuan pada penelitian ini adalah 6 ekor tikus dan kemudian untuk mengantisipasi adanya *drop out* saat penelitian dilakukan maka

ditambahkan 1 ekor tiap kelompok sebagai cadangan ke dalam jumlah minimal sampel sehingga jumlah sampel minimal yang dibutuhkan untuk 6 perlakuan adalah 28 ekor tikus

4.6. Teknik Sampling

Sampling adalah strategi yang digunakan untuk memilih elemen dari populasi untuk diteliti. Pada penelitian ini pengambilan sampel dari populasi dilakukan dengan teknik *probability sampling* dimana semua anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk dijadikan sampel. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling* dimana pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana karena anggota populasi tikus putih jantan disediakan dengan cara yang sama dan memiliki karakteristik yang homogen.

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini mencakup kandang, spuit sekali pakai, alat metal penginduksi luka bakar, tabung conical 10 mL, kaca objek, kaca penutup, ruang pewarnaan, dan ruang kelembaban. Selain itu, digunakan mesin RT PCR , alat elektroforesis, tabung Erlenmeyer, nanodrop, gel doc, mikropipet, freezer dengan suhu -80°C , -20°C , dan -4°C , sarung tangan, masker, timbangan analitik, timbangan digital, aplikasi ImageJ, laptop, pensil, dan buku untuk analisis data.

Untuk pemeliharaan hewan coba, digunakan kandang tikus plastik berukuran 50 cm x 30 cm x 20 cm dengan tutup kawat dan alas sekam, serta dilengkapi tempat pakan dan botol air minum. Alat untuk perlakuan pada tikus meliputi timbangan digital, sarung tangan, dan masker. Untuk induksi luka bakar digunakan spuit,

sarung tangan, logam, termometer, stopwatch, alat penekan, meja operasi, dan safety box. Dekapitasi hewan coba dilakukan dengan gunting bedah, pinset, sarung tangan, jarum pentul, papan nekropsi, pompa perfusi, spuit, dan *safety box*.

Preparasi dan penyimpanan sampel jaringan memerlukan spuit, ice pack, cool box, dan pinset. Analisis Ekspresi Gen protein KGF dan PDGF dilakukan dengan pinset, scalpel, pastel rotor, sentrifuge, pippet tips (biru, kuning, putih), mikropipet, vortex, water bath, ultra sonicator, dan RT-PCR

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September - November 2024. Perlakuan dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research (SCCR)* Indonesia dan Animal Model Research Center SCCR Indonesia selama 14 hari.

4.9. Cara Kerja

4.9.1. Isolasi MSC

Langkah-langkah isolasi Mesenchymal Stem Cells dari umbilical cord tikus dilakukan sebagai berikut:

1. Kumpulkan tali pusat segera setelah persalinan dengan persetujuan tertulis dari ibu.
2. Simpan tali pusat dalam medium transportasi dengan FBS 2% dan simpan pada suhu 4°C.
3. Cuci tali pusat beberapa kali dengan PBS (phosphate-buffered saline) yang mengandung antibiotik-antimycotic untuk menghilangkan darah dan kontaminan.
4. Potong tali pusat menjadi segmen-segmen kecil (1-2 cm).

5. Buang pembuluh darah dari segmen tali pusat untuk memperoleh Wharton's Jelly.
6. Wharton's Jelly dipisahkan dari membran luar dan dibagi menjadi potongan-potongan kecil.
7. Inkubasi potongan Wharton's Jelly dalam larutan enzim kolagenase tipe I (0,1%-0,2%) dan dispase (0,1%) pada suhu 37°C selama 30-60 menit dengan pengadukan lembut.
8. Setelah inkubasi, tambahkan medium kultur untuk menghentikan aktivitas enzim.
9. Resuspensi pellet sel dalam medium kultur MSC (seperti DMEM dengan 10-20% FBS).
10. Tanam sel dalam flask T75 kultur dan inkubasi pada 37°C dengan 5% CO₂.
11. Ganti medium setiap 2-3 hari sekali.
12. Sel MSC biasanya menempel pada permukaan cawan dalam 7-14 hari dan membentuk koloni fibroblastoid.
13. Setelah mencapai konfluensi 70-80%, sel dapat dipanen dengan tripsinisasi untuk subkultur atau karakterisasi lebih lanjut.
14. Uji ekspresi penanda permukaan spesifik MSC seperti CD73, CD90, dan CD105 dengan *flow cytometry*.

4.9.2. Isolasi Exosome MSC

Isolasi E-MSC menggunakan metode tangential flow filtration (TFF) adalah sebagai berikut :

1. Kultur sel MSC hingga mencapai 70-80% konfluensi dalam media kultur yang sesuai.
2. Ganti media dengan serum-free media untuk menghindari kontaminasi eksosom dari serum hewan.
3. Inkubasi sel MSC dengan serum-free media selama 48-72 jam untuk menghasilkan eksosom.
4. Kumpulkan media yang telah dikondisikan oleh MSC untuk proses filtrasi.
5. Lakukan sentrifugasi media kondisioning pada 300 g selama 10 menit untuk menghilangkan sel-sel yang tersisa.
6. Sentrifugasi supernatan pada 2000 g selama 20 menit untuk menghilangkan debris seluler dan apoptotic bodies.
7. Gunakan filtrasi dengan ukuran pori 0,22 μm untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dari eksosom.
8. Siapkan sistem TFF dengan filter 200-500 kDa.
9. Transfer media yang telah difiltrasi mikro ke dalam sistem TFF.
10. Jalankan media melalui filter TFF untuk memusatkan eksosom dengan ukuran 200-500 kDa.
11. Kumpulkan retentat (yang mengandung eksosom) dan buang filtrat.
12. Tambahkan buffer PBS atau saline ke dalam retentat dan lakukan proses TFF kembali untuk membersihkan eksosom dari komponen media.
13. Konsentrasikan eksosom hingga volume yang diinginkan menggunakan TFF.

14. Aliquot eksosom yang telah dikumpulkan dan simpan pada suhu -80°C hingga digunakan.
15. Lakukan analisis eksosom flow cytometry menggunakan CD9, CD63 dan CD81 untuk verifikasi kualitas dan kuantitas eksosom.

4.9.3. Aklimatisasi Hewan Uji

Aklimatisasi adalah suatu proses penyesuaian diri dengan iklim, lingkungan, kondisi, atau suasana baru. Sebelum diberi perlakuan pada tikus percobaan, dilakukan pengadaptasian pada semua tikus SCCR selama satu minggu. Tikus diadaptasikan dengan tempat tinggal baru, lingkungan baru, serta makanan dan minuman yang sesuai dengan standar kebutuhannya.

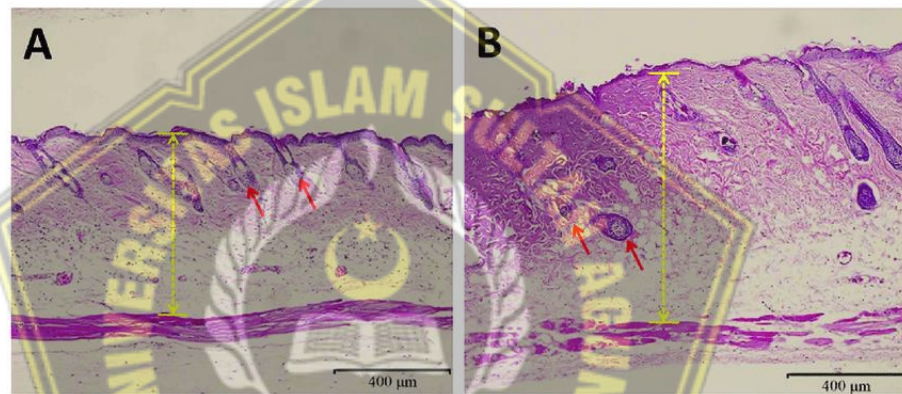
4.9.4. Randomisasi Hewan Uji

Randomisasi hewan uji bertujuan untuk mengelompokkan hewan uji sesuai kelompok perlakuan. Selanjutnya pada bagian punggung dari masing-masing hewan uji akan diberi nomor yang berbeda. Hal ini bertujuan untuk menghindari kesalahan pengukuran pada setiap hewan uji.

4.9.5. Pembuatan Luka Bakar

Sebelum pembuatan luka bakar pada tikus dilakukan, daerah yang akan dibuat perlukaan dibebaskan terlebih dahulu dari bulu menggunakan pisau cukur. Setelah itu, lakukan anestesi dengan menggunakan ketamin dengan dosis 7 mg/kgBB subkutan untuk mengurangi rasa sakit pada tikus dan menghindari gerakan tikus yang berlebihan. Setelah itu lakukan prosedur antiseptik dengan mengoleskan *polyvinylpyrrolidone iodine 1%*

pada area yang akan dibuat perlakuan yaitu bagian proksimal punggung tikus. Luka bakar dibuat menggunakan batang logam aluminium dengan diameter 6 mm. Plat logam tembaga dengan tebal 3 mm dipanaskan hingga menyala lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 5 detik. Luka bakar derajat dua akan memiliki penampakan histologi seperti gambar 4.2.



Gambar 4. 2. Gambaran Histologi Luka Bakar derajat dua³⁵

4.9.6. Pemberian Treatment

Setelah luka bakar selesai dibuat pada bagian dorsar tikus, selanjutnya perawatan luka bakar disesuaikan dengan kelompok perlakuan yang sudah ditentukan., Luka bakar dengan injeksi WFI 100 uL secara subcutan (K2), luka bakar dengan injeksi 100 uL (K3) dan 200 uL (K4) diberikan sebanyak 1 kali. Tikus diterminasi pada hari ke-7 setelah penyuntikan perlakuan.

4.10. Koleksi Sampel dan Analisis RT-PCR

4.10.1. Koleksi dan Homogenisasi Sampel

Koleksi sampel diambil pada hari ke-7, tikus diterminasi dan diambil biopsi jaringan kulit yang mengalami luka bakar Derajat Dua untuk pemeriksaan RT-PCR dan dihomogenisasi dengan cara berikut :

- a. Diseksi jaringan yang diinginkan menggunakan peralatan yang steril, di atas es jika memungkinkan, dan segera setelahnya untuk mencegah kerusakan oleh protease.
- b. Masukkan jaringan ke dalam tabung mikrofuge berbentuk bulat dan rendam dalam nitrogen cair untuk melakukan "snap freeze" untuk mengawetkan protein karena tidak langsung dianalisis.
- c. Simpan sampel pada suhu -80 derajat Celcius untuk digunakan nanti atau di atas es untuk homogenisasi segera.
- d. Sampel kulit sebanyak 50 mg kemudian dimasukan ke dalam tube berisi 1µL Trizol, kemudian dilakukan proses homogenisasi menggunakan ultrasonikator dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.
- e. Sampel kemudian ditambahkan dengan 0.2µL kloroform dan diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu ruang.
- f. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000xg selama 15 menit dengan suhu 4 °C.
- g. Sampel akan membentuk tiga lapis larutan, sisi bawah berwarna merah muda berisi protein, sisi tengah berwarna putih asap
- h. berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (aqueous phase).

- i. Pisahkan aqueous phase di sisi atas ke tube yang berbeda.
- j. Sampel aqueous phase kemudian ditambahkan 0.5µL isopropanol, kemudian diresuspensi, diinkubasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000xg pada suhu 4 °C selama 10 menit.
- k. Supernatant kemudian dibuang dan pellet ditambahkan dengan 1µL 75% ethanol lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7500 xg di suhu 4 °C selama 5 menit.
- l. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan dengan 50µL Nuclease-Free Water (NFW).
- m. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan udrop microplate reader.
- n. Sampel RNA sebanyak 0,1µg dalam 1µL kemudian ditambahkan 5µL NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit menggunakan thermal cycler.
- o. Sampel RNA kemudian ditambahkan 2µL 4x DN Master Mix dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit menggunakan thermal cycler.
- p. Proses reverse transcription kemudian dilakukan dengan menambahkan 2µL 5x RT Master Mix dan diinkubasi pada 37 °C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit dan 98 °C selama 5 menit menggunakan thermal cycler.
- q. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20OC.

4.10.2. Pembacaan Ekspresi Gen KGF dan PDGF dengan RT-PCR

1. Ekspresi gen dari KGF dan PDGF dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR).
2. Campuran dari 1 μ L cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No- ROX Mix sebanyak 10 μ L, forward primer 0,8 μ L, reverse primer 0,8 μ L dan NFW 7,4 μ L.
3. Primer KGF yang digunakan adalah F: 5'-ACC TGA GGT GTC AGG ACC -3' dan R: 5'- CCG TCG AGC ATG AGC CAA-3'. Primer PDGF yang digunakan adalah F: 5'- CCT TTG CTG GGC AAC CTG GA -3' dan R: 5'- GCC TTG CAC AAC CCT CCC TT -3'.
4. Proses qRT-PCR dilakukan menggunakan suhu 95°C selama 2 menit, 95°C selama 5 detik dan 56°C selama 20 detik sebanyak 50 siklus. Proses qRT-PCR dilakukan dengan menganalisis probeterhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
5. Kuantifikasi data qRT-PCR dilakukan menggunakan SoftwareEcoStudy

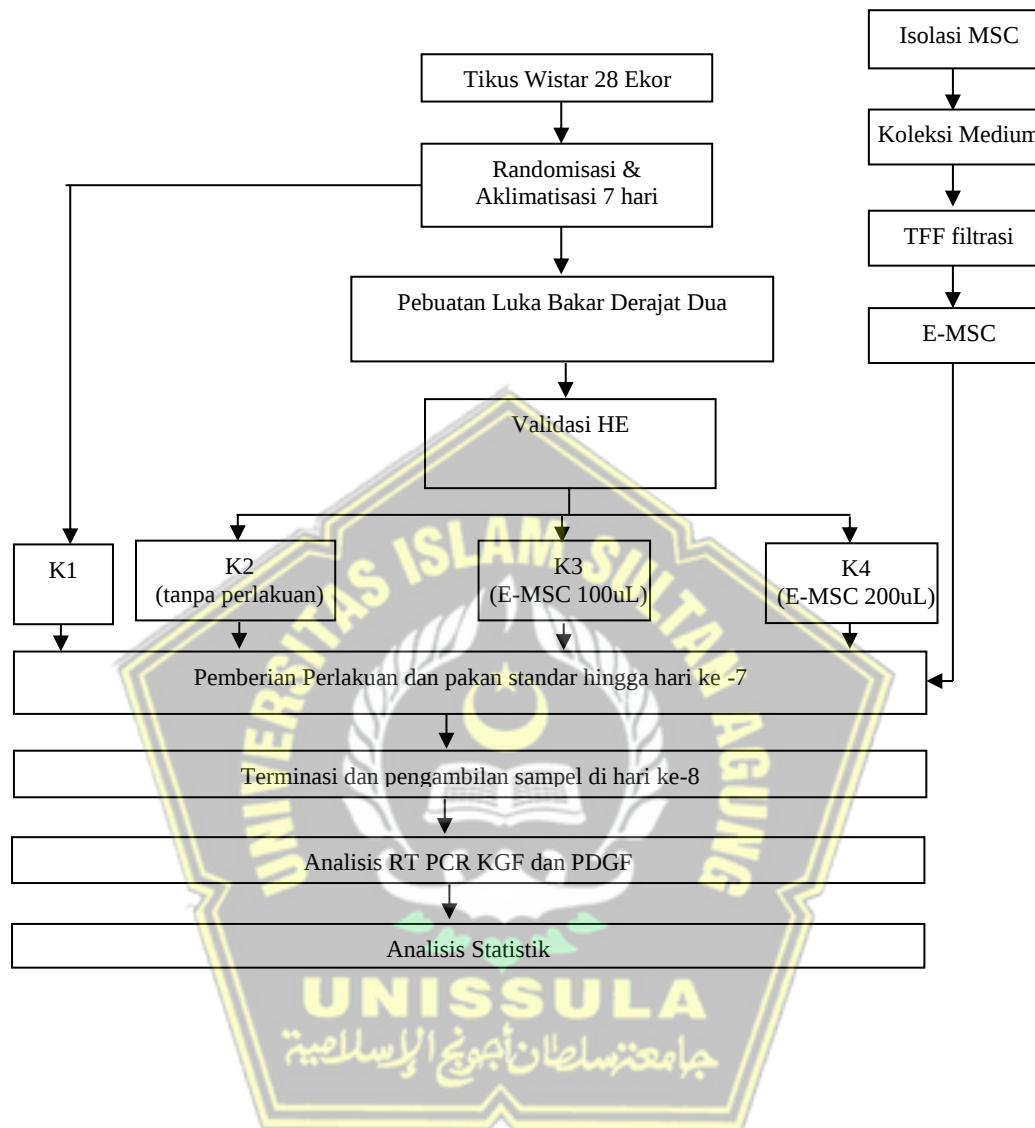
4.11. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan software SPSS, menggunakan uji deskriptif untuk mengukur Ekspresi Gen KGF dan PDGF pada Tikus Wistar. Data diukur pada skala rasio. Uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene test* digunakan untuk menguji normalitas dan homogenitas data. Hasil data ekspresi gen KGF dan PDGF berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), sehingga dilakukan uji *One-Way ANOVA* ($p < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan antar semua kelompok, diikuti dengan uji *Post Hoc LSD* ($p < 0,05$) untuk

mengetahui perbedaan signifikan antar dua kelompok terhadap ekspresi gen KGF dan PDGF.



4.12. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian E-MSc terhadap ekspresi gen KGF dan PDGF pada tikus jantan galur Wistar model luka bakar derajat dua. Studi eksperimental ini dilakukan secara *in vivo* dengan desain *Post-test Only Control Group* dilakukan selama bulan Oktober-Desember 2024 di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Semarang.

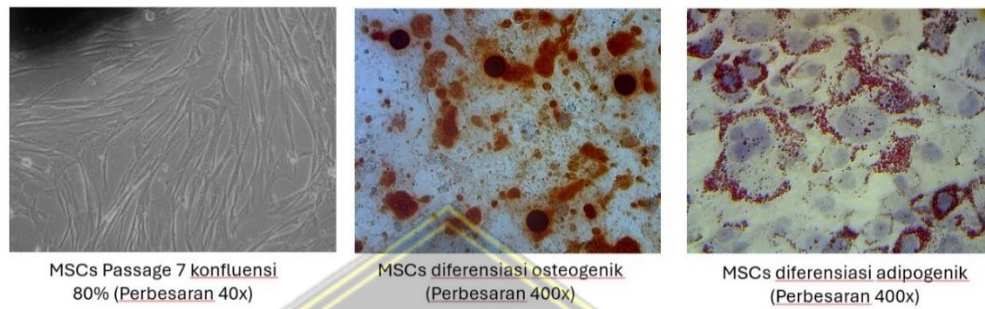
Penelitian dengan subjek tikus jantan sebanyak 28 ekor dengan model luka luka bakar derajat 2 (LBD 2) dengan kriteria tikus sehat, Usia berkisar 2-3 bulan, dan berat badan 200-250 gram. tikus jantan yang sesuai kriteria dicukur sebelum pembuatan luka bakar lakukan anestesi dengan menggunakan ketamin dengan dosis 7 mg/kgBB subkutan. Luka bakar dibuat menggunakan batang logam aluminium dengan diameter 6 mm. Plat logam tembaga dengan tebal 3 mm dipanaskan hingga menyala lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 5 detik. Tikus yang telah diberi luka kemudian randomisasi dan dibagi 3 kelompok, yaitu LBD 2 dengan perlakuan pemberian injeksi NaCl (K2), LBD 2 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 100 uL (K3), LBD 2 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 200 uL (K4).

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1. Validasi E-MSc

Hasil Isolasi MSC dari tali pusat tikus yang sedang bunting 21 hari dilakukan. Setelah diisolasi, hasilnya ditempatkan dalam kultur pada flask

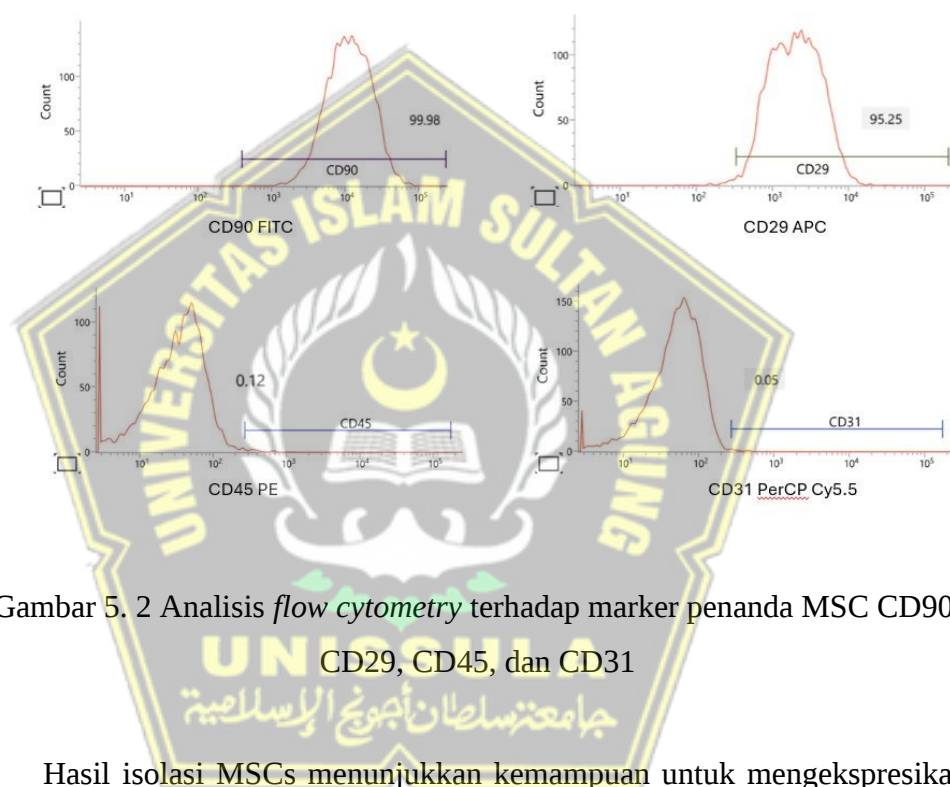
T75 yang steril, menggunakan medium khusus yang lengkap. MSCs yang melekat dan mencapai konfluensi lebih dari 80% menunjukkan morfologi sel berbentuk *spindle-like* saat diamati di bawah mikroskop (Gambar 5.1.A).



Gambar 5.1 (A) Sel terisolasi berbentuk spindle-like pada perbesaran 100x. (B) Droplet Lipid terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x. (C) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red

MSCs berkarakteristik dapat diferensiasi menjadi sel matur, termasuk osteosit dan adipogenik. Karakteristik ini dapat diamati setelah MSC diinkubasi dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik yang kemudian masing-masing diwarnai menggunakan Alizarin red untuk melihat deposisi kalsium dan Oil Red O untuk melihat droplet lipid yang terbentuk. Berdasarkan hasil pewarnaan, diketahui bahwa MSC mampu berdiferensiasi menjadi sel osteosit dan adipogenik (Gambar 5.1.B dan 5.1.C). Dengan hasil pengamatan ini, sel yang dihasilkan dari isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca, yaitu kemampuan untuk mengalami diferensiasi menjadi jenis sel lain serta memiliki potensi multipotensi.

Hasil isolasi sel yang diisolasi divalidasi menggunakan metode flowcytometry untuk menunjukan marker penanda MSC. Hasil analisis menemukan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,5%), CD29 (95,3%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,6%) dan CD31 (0,0%) (Gambar 5.2)



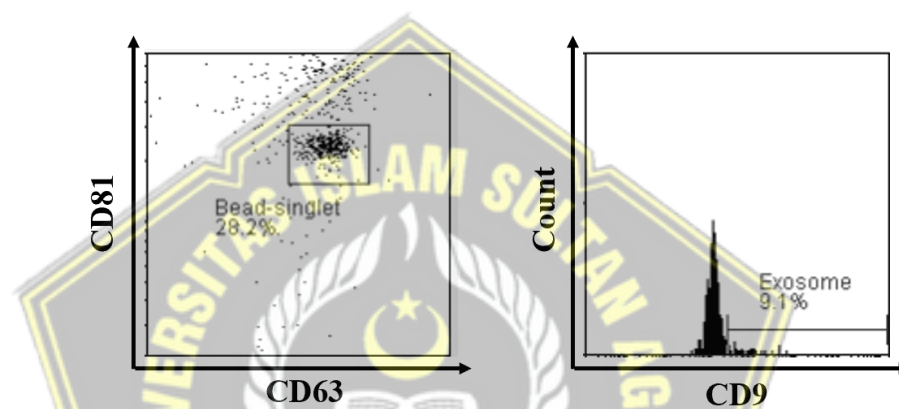
Gambar 5. 2 Analisis *flow cytometry* terhadap marker penanda MSC CD90, CD29, CD45, dan CD31

Hasil isolasi MSCs menunjukkan kemampuan untuk mengekspresikan berbagai penanda permukaan khusus, yang dikonfirmasi oleh *flow cytometry*. MSC mengekspresikan CD90 (99,98%), CD29 (95,25%), CD45 (0,12%), dan CD31 (0,05%).

Penelitian ini melakukan isolasi terhadap MSCs untuk mendapatkan MSCs murni menggunakan sekretom yang diisolasi dari MSCs menggunakan Tangential flow filtrasi (TFF), berdasarkan molecular *weight cut-off*, maka

molekul berukuran 100-500 kDa didapatkan mengandung exosome 0.75 ug/100 uL= 7.5 ug/mL

. E-MSCs tervalidasi dengan menggunakan flowcytometry untuk melihat kandungan marker exosome yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasilnya, jumlah exosome yang terbaca positif menggunakan marker CD81, CD63 28,2%, dan CD9 9,1%.



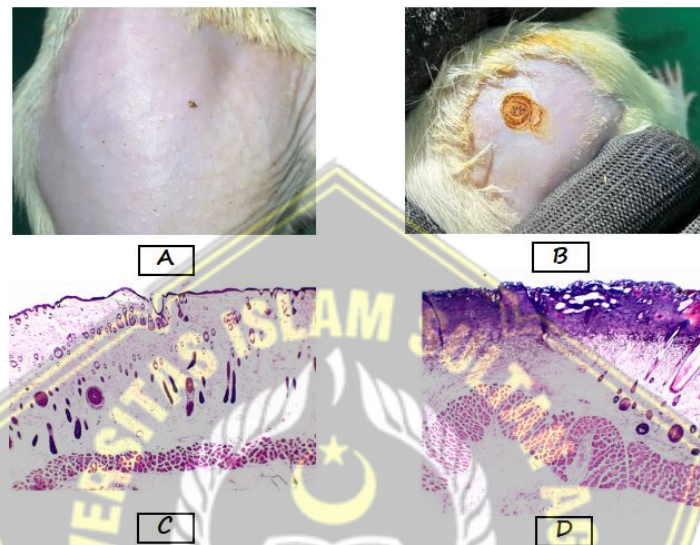
Gambar 5. 3 Validasi exosome terhadap ekspresi marker CD81, CD63 dan CD9.

5.1.2. Validasi Luka bakar derajat 2 (LBD 2)

Luka bakar dibuat menggunakan batang logam aluminium dengan diameter 6 mm. Plat logam tembaga dengan tebal 3 mL dipanaskan hingga menyala lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 5 detik. Luka bakar derajat dua akan memiliki penampakan makroskopis dan histologi seperti gambar 5.2.

Validasi luka bakar derajat 2 menggunakan pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (H&E) adalah pendekatan histopatologi yang umum untuk mengevaluasi kerusakan jaringan. Dengan pewarnaan H&E, struktur jaringan kulit yang rusak dapat diamati secara detail, termasuk perbedaan

antara epidermis dan dermis. Hematoxylin mewarnai inti sel menjadi biru/ungu, sedangkan eosin mewarnai sitoplasma dan matriks ekstraseluler menjadi merah muda.



Gambar 5.4 Validasi Luka Bakar Derajat 2. (A) Tikus kelompok sehat, (B) Tikus kelompok Luka bakar, (C) Histopatologi Tikus Sehat menunjukkan struktur lapisan epidermis dan dermis tampak utuh serta tidak ada kerusakan atau nekrosis, (D) Histopatologi Tikus model luka bakar derajat 2 menunjukkan hilangnya lapisan epidermis, kerusakan bagian dermis dan nekrosis di bagian epidermal.

Pewarnaan H&E menunjukkan tanda-tanda kerusakan epidermis dan dermis seperti yang dijelaskan di atas, maka model luka bakar derajat 2 dapat dianggap berhasil. Validasi ini memberikan bukti bahwa metode induksi luka bakar telah menciptakan luka dengan karakteristik yang sesuai dengan luka bakar derajat 2.

5.1.3. Hasil analisis ekspresi gen KGF

Hasil analisis ekspresi gen KGF didapatkan nilai pada kelompok K1 $1,03 \pm 0,02$, K2 $0,32 \pm 0,088$, K3 $0,65 \pm 0,034$, dan K4 $0,92 \pm 0,084$. Kelompok K2 menunjukkan ekspresi gen KGF paling rendah, diikuti oleh kelompok K3, dan paling tinggi pada kelompok K4, ditampilkan pada tabel 5.1 dan gambar 5.3.

Tabel 5.1 Data analisis rerata ekspresi gen KGF pada setiap kelompok

VARIABEL	Kelompok			p
	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	
Ekspresi gen KGF	0,32 $\pm$ 0,088	0,65 $\pm$ 0,034	0,92 $\pm$ 0,084	
<i>Shapiro wilk</i>	0,069	0,822	0,662	
<i>Lavene test</i>				0,051
<i>One Way Anova</i>				0,000

Keterangan:

Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

Levene's Test ($p > 0,05$ = homogen)

Oneway Anova ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Hasil uji normalitas data dengan uji *Shapiro wilk* untuk mengevaluasi sebaran normalitas data dalam masing-masing kelompok terhadap ekspresi gen KGF didapatkan sebaran data dalam keempat kelompok tersebut normal ($P > 0,05$). Selain itu uji sebaran variasi homogenitas dianalisis menggunakan data *Levene test* dan menunjukkan nilai p lebih besar dari 0,05 didapatkan data dalam keempat kelompok tersebut homogen p 0,051 ($P > 0,05$).

Berdasarkan data yang bersifat normal dan homogen, uji parametrik *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata ekspresi gen KGF di antara 4 kelompok. Hasil uji tersebut menemukan bahwa data

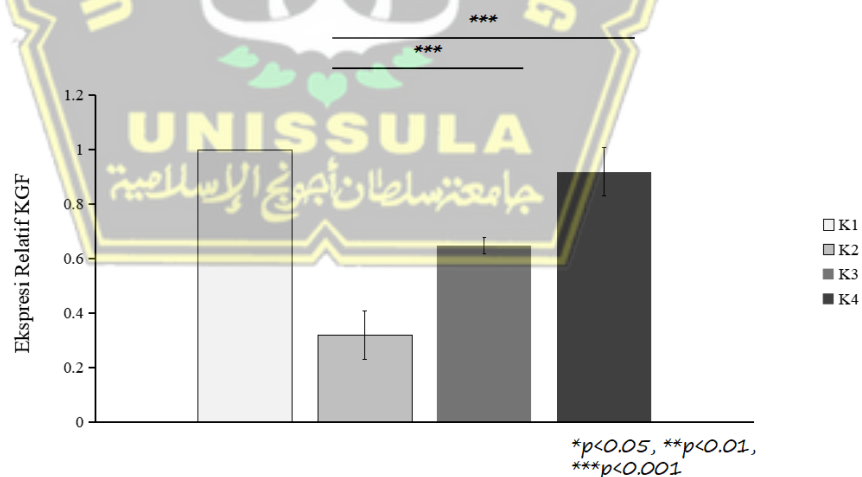
ekspresi gen KGF berbeda secara signifikan ($P < 0,05$), hal ini menunjukkan adanya perbedaan signifikan ekspresi gen KGF pada setidaknya satu kelompok. Hubungan data antar kelompok diuji menggunakan uji *Post hoc LSD*, dan didapatkan data seperti yang ditampilkan pada tabel 5.2.

Tabel 5. 2 Perbedaan rerata ekspresi gen KGF antar dua kelompok dengan Uji *Post hoc LSD*

Kelompok Perbandingan	K2	K3	K4
K2	-	0,000	0,000
K3	0,000	-	0,001
K4	0,000	0,000	-

Post hoc LSD ($p < 0,05$) = bermakna

Hasil analisis menunjukkan bahwa K2 berbeda bermakna dengan K3 ($P > 0,05$), dan berbeda bermakna dibanding K4 ($P < 0,05$). Terdapat tren nilai lebih tinggi terhadap ekspresi gen KGF seiring dengan peningkatan injeksi sub cutan exosome yang ditunjukkan oleh Gambar 5.3



Gambar 5.3. Ekspresi gen KGF lebih tinggi pada dosis lebih besar dengan injeksi sub cutan exosome terhadap model luka bakar derajat 2

5.1.4. Hasil analisis ekspresi gen PDGF

Hasil analisis ekspresi gen PDGF didapatkan nilai pada kelompok K1 $1,03 \pm 0,02$, K2 $0,32 \pm 0,04$, K3 $0,64 \pm 0,11$, dan K4 $0,95 \pm 0,07$. Kelompok K4 menunjukkan ekspresi gen KGF paling tinggi, diikuti oleh kelompok K3, dan paling rendah pada kelompok K2, ditampilkan pada tabel 5.1 dan gambar 5.3.

Tabel 5.3 Data analisis rerata ekspresi gen PDGF pada setiap kelompok

VARIABEL	Kelompok			p
	K2	K3	K4	
	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	Rerata $\pm$ SD	
Ekspresi gen PDGF	$0,32 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,11$	$0,95 \pm 0,07$	
<i>Shapiro wilk</i>	0,572	0,768	0,684	
<i>Lavene test</i>				0,054
<i>One Way Anova</i>				0,000

Keterangan:

Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

Levene's Test ($p > 0,05$ = homogen)

Oneway Anova ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Hasil uji normalitas data dengan uji *Shapiro wilk* untuk mengevaluasi sebaran normalitas data dalam masing-masing kelompok terhadap ekspresi gen PDGF didapatkan sebaran data dalam keempat kelompok tersebut normal ($P > 0,05$). Selain itu uji sebaran variasi homogenitas dianalisis menggunakan data *Levene test* dan menunjukkan nilai p lebih besar dari 0,054 didapatkan data dalam keempat kelompok tersebut homogen $p > 0,054$ ($P > 0,05$).

Berdasarkan data yang bersifat normal dan homogen, uji parametrik *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata ekspresi

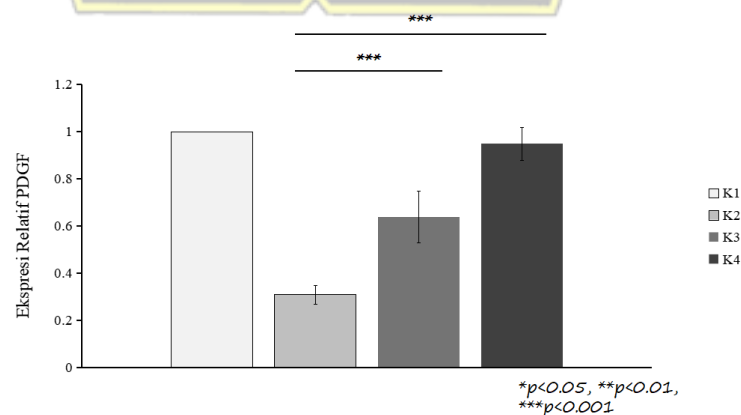
gen PDGF di antara 4 kelompok. Hasil uji tersebut menemukan bahwa data ekspresi gen PDGF berbeda secara signifikan $p < 0,000$ ($p < 0,05$), hal ini menunjukkan adanya perbedaan signifikan ekspresi gen PDGF pada setidaknya satu kelompok. Hubungan data antar kelompok diuji menggunakan uji *Post hoc LSD*, dan didapatkan data seperti yang ditampilkan pada tabel 5.5 sebagai berikut:

Tabel 5.4 Perbedaan rerata ekspresi PDGF antar dua kelompok dengan uji *Post hoc LSD*

Kelompok Perbandingan	K2	K3	K4
K2	-	0,000	0,000
K3	0,000	-	0,000
K4	0,000	0,000	-

Post hoc LSD ($p < 0,05$) = bermakna

Hasil uji *Post hoc LSD* terhadap ekspresi PDGF ditemukan bahwa kelompok K2 berbeda bermakna dibandingkan dengan K3, dan berbeda bermakna dibandingkan dengan K4, Berdasarkan gambar 5.4 dapat dilihat bahwa terdapat tren nilai lebih tinggi terhadap ekspresi PDGF dengan peningkatan injeksi sub cutan exosome.



Gambar 5. 5 Ekspresi gen PDGF lebih tinggi pada dosis lebih besar dengan injeksi sub cutan exosome terhadap model luka bakar derajat 2

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian terhadap ekspresi gen KGF dan PDGF pada Tikus Jantan Galur Wistar model luka bakar derajat dua yang diberikan injeksi exosome E-MSC menunjukkan hasil lebih tinggi pada dosis 200 uL yang berbeda bermakna jika dibandingkan dengan dosis exosome MSC 100 uL (K3) maupun dengan kelompok injeksi NaCl (K2). Relefan dengan penelitian yudhi *et al*, 2022 dengan pemberian gel sekretom hipoksia MSC pada dosis 200 μ L efektif meningkatkan ekspresi gen TGF- β dan menurunkan ekspresi gen IL-6. Eksosom MSC diketahui menekan inhibitor KGF atau mengaktifkan jalur yang meningkatkan ekspresi KGF, membawa protein dan lipid yang dapat mempengaruhi jalur pensinyalan intraseluler, mendorong peningkatan ekspresi KGF. Eksosom MSC mengaktifkan jalur PI3K/Akt dan MAPK/ERK, yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel, serta dapat meningkatkan ekspresi KGF, sifat anti-inflamasi pada eksosome mengurangi sitokin pro-inflamasi, menciptakan lingkungan yang kondusif untuk ekspresi KGF. Eksosom dapat mendorong aktivitas fibroblas dan keratinosit, yang pada gilirannya meningkatkan produksi KGF untuk mempercepat re-epitelisasi.

Eksosom MSC mengeluarkan banyak mediator perbaikan jaringan yang dikenal termasuk faktor pertumbuhan, sitokin, dan kemokin, khususnya VEGF, PDGF, bFGF, EGF, faktor pertumbuhan keratinosit (KGF), dan TGF- β .⁴⁵ eksosom MSC dapat meningkatkan penyembuhan luka melalui dua mekanisme utama yaitu dengan memberikan isyarat yang diperlukan untuk penyembuhan luka melalui pelepasan mediator inflamasi, bersama-sama dengan sitokin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*), selanjutnya melalui eksosom MSC sendiri

berpartisipasi dalam proses penyembuhan luka.⁴⁶ eksosom MSC berkomunikasi dengan sel lain dalam tubuh manusia dan mengalami proses *homing* ke daerah cedera sebagai upaya untuk menanggapi sinyal dari kerusakan sel, yang dikenal sebagai sinyal *homing*. Keadaan *homing* terjadi apabila terdapat mediator pro-inflamasi keluar ketika jaringan mengalami kerusakan sehingga bermigrasi ke jaringan yang rusak tersebut.⁴⁷

E-MSC mengandung berbagai komponen seperti IL-10, TGF- β , miRNA 21, dan miRNA 146a, yang berperan penting dalam mempercepat penyembuhan luka bakar.^{41,42} Sitokin yang dilepaskan selama respon inflamasi awal setelah luka bakar, dapat dimodulasi oleh eksosom MSC melalui penurunan aktivasi NF- κ B dan pengurangan ekspresi sitokin pro-inflamasi. Hal ini akan menyebabkan berpindahnya fase inflamasi menjadi fase proliferasi yang ditandai dengan beralihnya makrofag menjadi makrofag tipe 2 yang mensekresikan TGF- β yang mengaktivasi sel fibroblast yang berujung pada produksi KGF.^{43,44}

Penyembuhan luka bakar melibatkan serangkaian tahap fisiologis yang kompleks, termasuk peradangan, proliferasi, dan remodelling, yang bertujuan untuk memulihkan integritas kulit dan fungsi tubuh yang terganggu.⁴⁸ Tingkat kesembuhan luka bakar dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti tingkat keparahan dan proses fisiologis yang ada pada tubuh.^{49,50}

Salah satu penanda proliferasi adalah terjadi peningkatan growth factor regenerasi, termasuk PDGF. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang menemukan adanya peningkatan ekspresi PDGF pada pemberian gel sekretom MSC dosis 20%. Salah satu kandungan protein yang berperan dalam meningkatkan

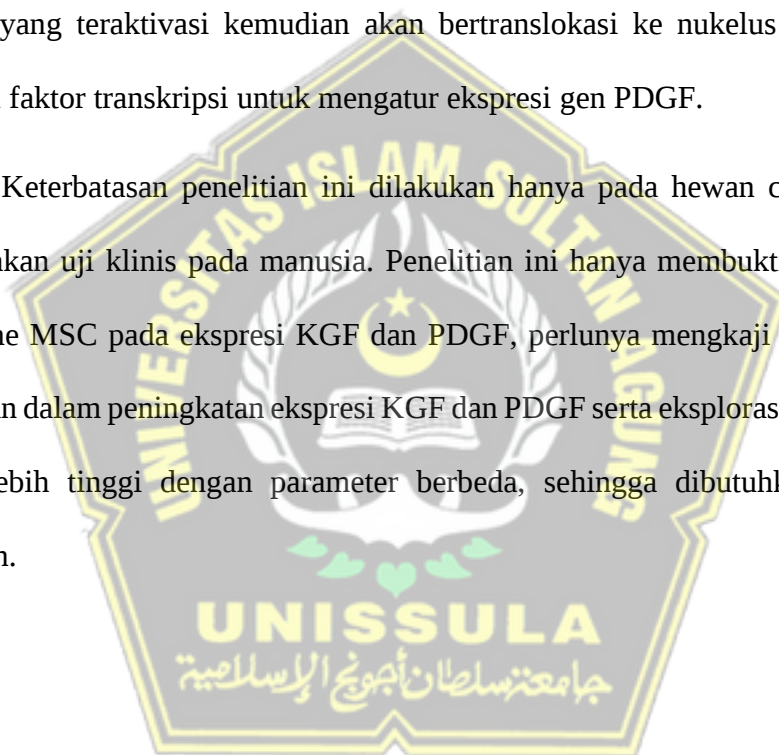
ekspresi PDGF adalah hepatocyte growth factor (HGF), yang terkandung dalam sekretom MSC.⁵¹ Protein HGF telah terbukti meningkatkan produksi PDGF oleh sel fibroblas, yang dapat mempercepat proliferasi sel-sel fibroblas dan pembentukan jaringan granulasi.⁵²

Selain HGF, faktor pertumbuhan lain yang terkandung dalam sekretom MSC, seperti fibroblast growth factor-2 (FGF-2) dan VEGF, juga dapat berkontribusi pada peningkatan PDGF pada hari ke-14 penyembuhan luka bakar.⁵³ Protein FGF-2 telah terbukti memperkuat sekresi PDGF yang berperan dalam proliferasi dan migrasi sel-sel fibroblas dalam pembentukan jaringan granulasi. Sementara itu, VEGF memiliki peran penting dalam angiogenesis, yang dapat meningkatkan pasokan darah ke area luka dan sehingga membantu metabolisme pembentukan PDGF.⁵⁴

Protein-protein seperti HGF, FGF-2, dan vascular endothelial VEGF dalam sekretom MSC dapat mengaktifkan pathway dan transduksi sinyal yang mempromosikan transkripsi gen PDGF. Salah satu jalur transduksi sinyal yang terlibat adalah mitogen-activated protein kinase (MAPK), yang dapat diaktivasi HGF dan FGF-2.⁵⁵⁻⁵⁸ Aktivasi MAPK kemudian memicu kaskade reaksi yang melibatkan fosforilasi berbagai protein sinyal, termasuk faktor transkripsi aktivator protein 1 (AP-1), yang pada akhirnya mengarah pada peningkatan transkripsi gen PDGF.⁵⁹ Selain itu, faktor pertumbuhan seperti VEGF juga dapat mengaktifkan jalur phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, yang secara positif meregulasi transkripsi gen PDGF melalui berbagai mekanisme, termasuk stabilisasi faktor transkripsi yang terlibat dalam transkripsi ekspresi gen.⁶⁰

Selain pathway MAPK dan PI3K/Akt, beberapa faktor pertumbuhan dalam sekretom MSC juga dapat meregulasi jalur *janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) dalam meningkatkan transkripsi gen PDGF.^{61,62} Melalui aktivasi reseptor seperti reseptor tyrosine kinase, HGF, FGF-2, dan VEGF dapat mengaktivasi jalur JAK-STAT yang melibatkan fosforilasi dan aktivasi protein *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT). Protein STAT yang teraktivasi kemudian akan bertranslokasi ke nukelus dan berperan sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen PDGF.

Keterbatasan penelitian ini dilakukan hanya pada hewan coba, sehingga dibutuhkan uji klinis pada manusia. Penelitian ini hanya membuktikan pengaruh exosome MSC pada ekspresi KGF dan PDGF, perlunya mengkaji pathway yang berperan dalam peningkatan ekspresi KGF dan PDGF serta eksplorasi dosis E-MSC yang lebih tinggi dengan parameter berbeda, sehingga dibutuhkan penelitian lanjutan.



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh pemberian E-MSC dosis 100 uL dan 200 uL terhadap peningkatan Ekspresi Gen KGF pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan luka bakar Derajat Dua.
2. Terdapat pengaruh pemberian E-MSC dosis 100 uL dan 200 uL terhadap peningkatan Ekspresi Gen PDGF pada Tikus Jantan Galur Wistar dengan luka bakar Derajat Dua.

6.2 Saran

- 6.2.1 Studi yang akan datang diharapkan untuk mengkaji pathway yang berperan dalam peningkatan ekspresi KGF dan PDGF serta eksplorasi dosis E-MSC yang lebih tinggi dengan parameter berbeda.
- 6.2.2 Penelitian selanjutnya dapat melakukan uji klinis pada manusia

DAFTAR PUSTAKA

1. Warby R, Maani C V. *Burns Classification.*; 2019.
2. Żwierello W, Piorun K, Skórka-Majewicz M, Maruszewska A, Antoniewski J, Gutowska I. Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4). doi:10.3390/ijms24043749
3. Peng Y, Wu S, Tang Q, Li S, Peng C. KGF-1 accelerates wound contraction through the TGF- β 1/ Smad signaling pathway in a double-paracrine manner. *Journal of Biological Chemistry.* 2019;294(21):8361-8370. doi:10.1074/jbc.RA118.006189
4. Paramasivam T, Maiti SK, Palakkara S, et al. Effect of PDGF-B Gene-Activated Acellular Matrix and Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Full Thickness Skin Burn Wound in Rat Model. *Tissue Eng Regen Med.* 2021;18(2):235-251. doi:10.1007/s13770-020-00302-3
5. Ergen SK, Subasi S, Rencber SF, Duruksu G, Yazir Y. Evaluation of clinical and histological effects of KGF-2 and NGF on corneal wound healing in an experimental alkali burn rabbit model. *Exp Eye Res.* 2022;223. doi:10.1016/j.exer.2022.109190
6. Zhao Q, Zhang J, Chen L, Xing Y. Research Progress of PDGF Promoting Wound Repair. *Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital.* 2023;14(6):1289-1295. doi:10.12290/xhyxzz.2023-0223
7. Thalakiriyawa DS, Jayasooriya PR, Dissanayaka WL. Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Curr Mol Med.* 2021;22(2):98-119. doi:10.2174/1566524021666210211114453
8. Wardhana A, Winarno GA. Epidemiology And Mortality Of Burn Injury In Ciptomangunkusumo Hospital, Jakarta: A 5 Year Retrospective Study. *Jurnal Plastik Rekonstruksi.* 2020;6(1):234-242. doi:10.14228/jpr.v6i1.270
9. Wu P, Zhang B, Shi H, Qian H, Xu W. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. *Cytotherapy.* 2018;20(3):291-301. doi:10.1016/j.jcyt.2017.11.002
10. Hu P, Yang Q, Wang Q, et al. Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration. *Burns Trauma.* 2019;7:1-10. doi:10.1186/s41038-019-0178-8
11. Bi Y, Qiao X, Liu Q, et al. Systemic proteomics and miRNA profile analysis of exosomes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1). doi:10.1186/s13287-022-03142-1
12. Hou Y, Li J, Guan S, Witte F. The therapeutic potential of MSC-EVs as a bioactive material for wound healing. *Engineered Regeneration.* 2021;2:182-194. doi:10.1016/j.engreg.2021.11.003
13. Aryan A, Bayat M, Bonakdar S, et al. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Wound Healing in Deep Second-Degree Burns in Male Rats. *Cells Tissues Organs.* 2019;206(6):317-329. doi:10.1159/000501651
14. Gangadaran P, Oh EJ, Rajendran RL, et al. Three-dimensional culture conditioned bone marrow MSC secretome accelerates wound healing in a

- burn injury mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;673:87-95. doi:10.1016/j.bbrc.2023.05.088
15. Aryan A, Bayat M, Bonakdar S, et al. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Wound Healing in Deep Second-Degree Burns in Male Rats. *Cells Tissues Organs*. 2019;206(6):317-329. doi:10.1159/000501651
 16. Padeta I, Nugroho WS, Kusindarta DL, Fibrianto YH, Budipitojo T. Mesenchymal Stem Cell-conditioned Medium Promote the Recovery of Skin Burn Wound. *Asian J Anim Vet Adv*. 2017;12(3):132-141. doi:10.3923/ajava.2017.132.141
 17. Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep32993
 18. Bártolo I, Reis RL, Marques AP, Cerqueira MT. Keratinocyte Growth Factor-Based Strategies for Wound Re-Epithelialization. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022;28(3):665-676. doi:10.1089/ten.teb.2021.0030
 19. Raziyeve K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*. Published online 2021. doi:10.3390/biom11050700
 20. Monazzah Harsini S, Oryan A. Growth Factor of Platelet-Rich Plasma and its Application in Trauma and Orthopedic Surgery. *EC Orthop*. 2018;9(3):139-146.
 21. Liu Q, Zhou Y, Li Z. PDGF-BB promotes the differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells through the Src/JAK2 signaling pathway. *Mol Med Rep*. Published online 2018. doi:10.3892/mmr.2018.9351
 22. Gouveia L, Betsholtz C, Andrae J. PDGF-A signaling is required for secondary alveolar septation and controls epithelial proliferation in the developing lung. *Development (Cambridge)*. Published online 2018. doi:10.1242/dev.161976
 23. Jian K, Yang C, Li T, et al. PDGF-BB-derived supramolecular hydrogel for promoting skin wound healing. *J Nanobiotechnology*. 2022;20(1). doi:10.1186/s12951-022-01390-0
 24. Li Y, Li D, You L, et al. dCas9-Based PDGFR- β Activation ADSCs Accelerate Wound Healing in Diabetic Mice through Angiogenesis and ECM Remodeling. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6). doi:10.3390/ijms24065949
 25. Wu LW, Chen WL, Huang SM, Chan JYH. Platelet-derived growth factor-AA is a substantial factor in the ability of adipose-derived stem cells and endothelial progenitor cells to enhance wound healing. *FASEB Journal*. 2019;33(2):2388-2395. doi:10.1096/fj.201800658R
 26. Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care*. 2016;25(1):46-55. doi:10.12968/jowc.2016.25.1.46
 27. Shiromoto Y, Niki Y, Kikuchi T, et al. Increased migratory activity and cartilage regeneration by superficial-zone chondrocytes in enzymatically

- treated cartilage explants. *BMC Musculoskelet Disord.* 2022;23(1). doi:10.1186/s12891-022-05210-2
28. Lesmana FL, Rizqiawan A, Mulyawan I, et al. The Effect of the Application of (*Garcinia mangostana* L.) towards PDGF-B Expression on Human Gingival Fibroblast Cell Culture After Wound Healing Scratch Test Assay (In-Vitro Study). *Journal of International Dental and Medical Research.* 2021;14(4):1413-1418.
 29. Wang CQ, Lin CY, Huang YL, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes PDGF-dependent endothelial progenitor cell angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Aging.* 2019;11(23):11040-11053. doi:10.18632/aging.102508
 30. Safari B, Aghazadeh M, Davaran S, Roshangar L. Exosome-loaded hydrogels: A new cell-free therapeutic approach for skin regeneration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2022;171:50-59. doi:10.1016/j.ejpb.2021.11.002
 31. Marofi F, Kozlitina IA, Margiana R, et al. MSCs and their exosomes: a rapidly evolving approach in the context of cutaneous wounds therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-021-02662-6
 32. Du Y mo, Zhuansun Y xun, Chen R, Lin L, Lin Y, Li J guo. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma. *Exp Cell Res.* 2018;363(1):114-120. doi:10.1016/j.yexcr.2017.12.021
 33. Wang X, Gu H, Qin D, et al. Exosomal MIR-223 Contributes to Mesenchymal Stem Cell-Elicited Cardioprotection in Polymicrobial Sepsis. *Sci Rep.* 2015;5. doi:10.1038/srep13721
 34. Li D, Gong Y. A Promising Strategy for Non-Arteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy: Intravitreal Mesenchymal Stem Cell Exosome. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020;16(2):109-114. doi:10.2174/1574888x15666200814121849
 35. Zhang Y, Bai X, Wang Y, et al. Role for heat shock protein 90 α in the proliferation and migration of HaCaT cells and in the deep second-degree burn wound healing in mice. *PLoS One.* 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0103723
 36. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2018;7(7):209-231. doi:10.1089/wound.2017.0761
 37. Piipponen M, Li D, Landén NX. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):1-26. doi:10.3390/ijms21228790
 38. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(2):65-78. doi:10.1089/wound.2014.0608
 39. Peng Y, Wu S, Tang Q, Li S, Peng C. KGF-1 accelerates wound contraction through the TGF- β 1/ Smad signaling pathway in a double-paracrine manner. *Journal of Biological Chemistry.* 2019;294(21):8361-8370. doi:10.1074/jbc.RA118.006189

40. Bártolo I, Reis RL, Marques AP, Cerqueira MT. Keratinocyte Growth Factor-Based Strategies for Wound Re-Epithelialization. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022;28(3):665-676. doi:10.1089/ten.teb.2021.0030
41. Hou Y, Li J, Guan S, Witte F. The therapeutic potential of MSC-EVs as a bioactive material for wound healing. *Engineered Regeneration.* 2021;2:182-194. doi:10.1016/j.engreg.2021.11.003
42. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, et al. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling. *Stem Cells.* 2016;34(3):601-613. doi:10.1002/stem.2298
43. Kim HY, Bhang SH. Stem cell-engineered nanovesicles exert proangiogenic and neuroprotective effects. *Materials.* 2021;14(5):1-10. doi:10.3390/ma14051078
44. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(12):1620-1630. doi:10.5966/sctm.2015-0285
45. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(2):142-149. doi:10.5966/sctm.2011-0018
46. Isakson M, De Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJP. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/831095
47. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: Strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells Int.* Published online 2012. doi:10.1155/2012/342968
48. Kim H, Shin S, Han D. Review of History of Basic Principles of Burn Wound Management. *Medicina (Lithuania).* Published online 2022. doi:10.3390/medicina58030400
49. Kim H, Shin S, Han D. Review of History of Basic Principles of Burn Wound Management. *Medicina (Lithuania).* Published online 2022. doi:10.3390/medicina58030400
50. Tiwari VK. Burn wound: How it differs from other wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery.* Published online 2012. doi:10.4103/0970-0358.101319
51. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *Journal of Controlled Release.* Published online 2016. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.018
52. Panganiban RAM, Day RM. Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacol Sin.* Published online 2011. doi:10.1038/aps.2010.90
53. McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron.* Published online 1990. doi:10.1016/0896-6273(90)90215-2
54. Certelli A, Valente P, Uccelli A, et al. Robust Angiogenesis and Arteriogenesis in the Skin of Diabetic Mice by Transient Delivery of

- Engineered VEGF and PDGF-BB Proteins in Fibrin Hydrogels. *Front Bioeng Biotechnol*. Published online 2021. doi:10.3389/fbioe.2021.688467
55. Stuhlmiller TJ, García-Castro MI. FGF/MAPK signaling is required in the gastrula epiblast for avian neural crest induction. *Development*. Published online 2012. doi:10.1242/dev.070276
 56. Gantner CW, Hunt CPJ, Niclis JC, et al. FGF-MAPK signaling regulates human deep-layer corticogenesis. *Stem Cell Reports*. Published online 2021. doi:10.1016/j.stemcr.2021.03.014
 57. Schröter C, Rué P, Mackenzie JP, Arias AM. FGF/MAPK signaling sets the switching threshold of a bistable circuit controlling cell fate decisions in embryonic stem cells. *Development (Cambridge)*. Published online 2015. doi:10.1242/dev.127530
 58. McBain VA, Forrester J V., McCaig CD. HGF, MAPK, and a small physiological electric field interact during corneal epithelial cell migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Published online 2003. doi:10.1167/iovs.02-0570
 59. Yan T, Huang L, Yan Y, Zhong Y, Xie H, Wang X. MAPK/AP-1 Signaling Pathway Is Involved in the Protection Mechanism of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes against Ultraviolet-Induced Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol*. Published online 2023. doi:10.1159/000529551
 60. Halevy O, Cantley LC. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. *Exp Cell Res*. Published online 2004. doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.024
 61. Simon AR, Takahashi S, Severgnini M, Fanburg BL, Cochran BH. Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Published online 2002. doi:10.1152/ajplung.00315.2001
 62. Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. Published online 2005. doi:10.3748/wjg.v11.i22.3385