PENGARUH *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI GEN *FIBROBLAST GROWTH FACTOR* 1 (FGF-1) DAN *STROMAL DERIVED GROWTH FACTOR* 1 (SDF-1)

(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

Nova Putri Hariani

MBK.23.22.010414

PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS

ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG 2025

TESIS

PENGARUH *EXOSOME MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP EKSPRESI GEN *FIBROBLAST GROWTH FACTOR* 1 (FGF-1) DAN *STROMAL DERIVED GROWTH FACTOR* 1 (SDF-1)

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

Disusun oleh :

Nova Putri Hariani

MBK. 23.22.010414

Yang dipertahankan didepan Tim Penguji pada
tanggal 21 Januari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Telah disetujui oleh :

Pembimbing I	Pembimbing II
Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med	Prof.Dr.dr. Prasetyowati Subchan, Sp. DVE. Subsp. DKE. FINSDV. FAADV
NIK. 210199050	NIK. 130530279

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula

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

PERNYATAAN

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

Semarang, 17 Januari 2025

Nova Putri Hariani

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 *FIBROBLAST GROWTH FACTOR 1* (FGF-1) DAN *STROMAL DERIVED GROWTH FACTOR* 1 (SDF-1) (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 serta penguji I dalam penelitian ini yang bersedia memberikan kritik dan masukan untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan tesis ini.

3. Dr. dr. Eko Setiawan, SpB, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta penguji II dalam penelitian ini yang bersedia memberikan kritik dan masukan untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan tesis ini.
4. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta penguji III dalam penelitian ini yang bersedia memberikan kritik dan masukan untuk meningkatkan kualitas penulisan selama proses penulisan tesis ini.
5. 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.
6. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE. Subsp.DKE.FINSDV.FAADV selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
7. 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.
8. 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 Desember 2024
Penulis,

Nova Putri Hariani

ABSTRAK

Latar Belakang: Luka bakar derajat dua melibatkan epidermis dan sebagian dermis yang memicu serangkaian proses inflamasi, regeneratif, dan *remodeling* yang kompleks. Ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 memainkan peran penting dalam proses penyembuhan luka, terutama dalam angiogenesis, rekrutmen sel-sel progenitor, dan regenerasi jaringan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana pemberian E-MSC mempengaruhi ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami luka bakar derajat dua.

Metode: Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *Post-test Only Control Group* secara in vivo**,** subjek tikus galur Wistar berjumlah 28 ekor yang dibagi 4 kelompok yaitu tikus sehat (K1), tikus luka bakar derajat dua dan diberikan injeksi NaCl (K2), tikus luka bakar derajat dua dan diberikan injeksi *subcutan exosome* 100 uL (K3), dan *exosome* 200 uL (K4), ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 dianalisis dengan metode qRT-PCR, dan uji statistik menggunakan uji *One Way* Anova

Hasil: Rata-rata ekspresi gen FGF-1 menunjukkan terdapat pengaruh signifikan *One Way* Anova dengan hasil 0,000 (p<0,05) pada kelompok K2 sebesar 0,31, kelompok K3 sebesar 0,57, dan paling tinggi terdapat pada kelompok K4 sebesar 0,99. Rata-rata ekspresi gen SDF-1 dengan uji *one way* Anova p 0,000 (<0,05) menunjukkan terdapat pengaruh signifikan kelompok K2 sebesar 0,40 lebih rendah, kelompok K3 sebesar 0,64, ekspresi gen SDF-1 lebih tinggi pada kelompok K4 sebesar 0,88.

Kesimpulan: Pemberian *Exosome* MSC berpengaruh terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami luka bakar derajat dua.

Kata Kunci: E-MSC, ekspresi gen FGF-1, SDF-1, luka bakar derajat dua.

ABSTRACT

Background: *Second-degree burns involve the epidermis and part of the dermis, triggering a series of complex inflammatory, regenerative, and remodeling processes. The expression of FGF-1 and SDF-1 plays an important role in the wound healing process, especially in angiogenesis, progenitor cell recruitment, and tissue regeneration. The aim of this study was to determine how E-MSC administration affects FGF-1 and SDF-1 gene expression in male Wistar rats with second-degree burns.*

Method: *This experimental study used a Post-test Only Control Group design in vivo, 28 Wistar rat subjects were divided into 4 groups, namely healthy rats (K1), second-degree burn rats and given NaCl injection (K2), secon-degree burn rats and given 100 µL subcutaneous exosome injection (K3), and 200 µL exosome (K4), FGF-1 and SDF-1 expressions were analyzed using the qRT-PCR method, and statistical tests using the One Way Anova test.*

Results: *The average FGF-1 expression showed a significant affects in One Way Anova with a result of 0.000 (p <0.05), in the K2 group of 0.31, the K3 group of 0.57, and the highest was in the K4 group of 0.99. The average expression of SDF-1 with one way anova test p 0.000 (<0.05) showed a significant difference in group K2 of 0.40 lower, group K3 of 0.64, SDF-1 expression was higher in group K4 of 0.88.*

Conclusion: *Administration of Exosome MSC affects the expression of FGF-1 and SDF-1 genes in male Wistar rats with second-degree burns.*

Keywords: *E-MSC, FGF-1 gene expression, SDF-1, Second-Degree burns.*

UNISSULA
جامعة سلطان أجونج الإسلامية

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PENGESAHAN ii
PERNYATAAN iii
RIWAYAT HIDUP iv
KATA PENGANTAR v
ABSTRAK viii
ABSTRACT ix
DAFTAR ISI x
DAFTAR SINGKATAN xiii
DAFTAR TABEL xvv
DAFTAR GAMBAR xvii
DAFTAR LAMPIRAN xviii
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 4
1.5. Manfaat Penelitian 8
1.5.1. Manfaat Teoritis 8
1.5.2. Manfaat Praktis 8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 9
2.1. *Fibroblast Growth Factor*-1 (FGF-1) 9
2.1.1. Definisi 9
2.1.2. Jalur Produksi dan Aktivasi FGF-1 9
2.2. *Stromal Derived Growth Factor* 1 (SDF-1) 11
2.2.1. Definisi 11
2.2.2. Sekresi SDF-1 12

2.2.3. Peran SDF-1 dalam Luka Bakar 13
2.3. *Exosome Mesenchymal Stem Cell*.....14
2.3.1. Definisi.....14
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....17
3.1. Kerangka Teori.....17
3.2. Kerangka konsep.....20
3.3. Hipotesis 20
BAB IV METODE PENELITIAN 21
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian 21
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional 22
4.2.1. Variabel Penelitian 22
4.2.2. Definisi Operasional Variabel 23
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....25
4.3.1. Subyek Penelitian.....25
4.3.2. Sampel Penelitian.....25
4.4. Besar Sampel 26
4.5. Alat dan Bahan.....27
4.5.1. Alat Penelitian.....27
4.5.2. Bahan Penelitian.....28
4.6. Cara Penelitian.....28
4.6.1. *Ethical Clearance*.....28
4.6.2. Isolasi Eksosom dari MSC.....29
4.6.3. Aklimatisasi Hewan Uji 30
4.6.4. Randomisasi Hewan Uji.....30
4.6.5. Pembuatan Luka Bakar 31
4.6.6. Pemberian Treatment 32
4.7. Koleksi Sampel dan Analisis RT-PCR.....32
4.7.1. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA 32
4.7.2. Pembacaan FGF-1 dan SDF-1 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) 33
4.8. Analisis Data.....34

4.9. Alur Penelitian 35
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....36
5.1. Hasil Penelitian 36
5.1.1. Validasi *Exosome* MSC 37
5.1.2. Validasi Model Tikus Luka Bakar Derajat Dua 40
5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi Gen FGF-1.....41
5.1.4. Hasil Pemeriksaan Ekspresi SDF-1 43
5.2. Pembahasan.....45
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN 49
6.1. Kesimpulan 49
6.2. Saran 49
DAFTAR PUSTAKA.....50
LAMPIRAN.....55

DAFTAR SINGKATAN

ASC-Exos : *Adipose-derived Stem Cell Exosomes*
ATP : Adenosin Trifosfat
bFGF : *Basic Fibroblast Growth Factor*
CD : *Cluster of Differentiation*
cDNA : *Complementary Deoxyribonucleic Acid*
COL1A1 : *Collagen Type 1 Alpha 1 Chain*
DAMPs : *Damage Associate Molecular Patterns*
DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
E-MSC : *Exosome Mesenchymal Stem Cell*
EPCs : *Endothelial Progenitor Cells*
ERK : *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FGFR : *Fibroblast Growth Factor Receptors*
FN1 : *Fibronectin 1*
HE : Hematoksilin-Eosin
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
HIF-1α : *Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha*
HMGB1 : *High Mobility Group Box 1*
hUCMSC : *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells*
IGF-1 : *Insulin-like Growth Factor 1*
IL : *Interleukin*
IL-1β : *Interleukin-1 Beta*
kDa : Kilo Dalton
MAPK : *Mitogen-Actived Protein Kinase*
MMP : *Matrix Metalloproteinase*
MMSC : *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*
mRNA : *Messenger Ribonucleic Acid*
miRNA : *Micro Ribonucleic Acid*
MRSA : *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MVB : *Multivesicular Bodies*

NF-κB : *Nuclear Factor Kappa-B*

NFW : *Nuclease Free Water*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

PI3K : *Phosphoinositide 3-Kinase*

PRRs : *Pattern Recognition Receptors*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

RNA : *Ribonucleic Acid*

SDF : *Stromal-cell Derived Factor*

TFF : *Tangential Flow Filtration*

TGF-β : *Transforming Growth Factor Beta*

TLRs : *Toll-like Receptors*

TNF-α : *Tumor Necrosis Factor-Alpha*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
UNISSULA
جامعة سلطان أجونج الإسلامية

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian 4
Tabel 5.1. Hasil Uji Deskriptif rata-rata ekspresi gen FGF-1 dan Uji *One Way* Anova 41
Tabel 5.2. Perbedaan rerata ekspresi FGF-1 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane 42
Tabel 5.3. Hasil Uji Deskriptif rata-rata ekspresi gen SDF-1 dan Uji *One Way* Anova tiap kelompok 43
Tabel 5.4. Perbedaan rerata ekspresi gen SDF-1 antar dua kelompok dengan Uji post hoc LSD 44

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
UNISSULA
جامعة سلطان أجونج الإسلامية

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1. Kerangka Teori 19
Gambar 3.2. Kerangka Konsep 20
Gambar 4.1. Rancangan Penelitian 21
Gambar 4.2. Gambaran Histologi Luka Bakar Derajat Dua 31
Gambar 4.3. Alur Penelitian.....35
Gambar 5.1. Isolasi E-MSC 37
Gambar 5.2. Isolasi E-MSC dengan *staining Oil Red* O dan *Alizarin Red* S.....38
Gambar 5.3. Analisis *flow cytometry* terhadap *marker* penanda MSC CD90, CD29, CD45, dan CD31.....39
Gambar 5.4. Validasi *exosome* terhadap ekspresi *marker* CD81, CD63 dan CD9.....40
Gambar 5.5. Validasi model luka bakar derajat dua.....41
Gambar 5.6. Grafik Rata-rata Ekspresi Gen FGF-1.....42
Gambar 5.7. Grafik Rata-rata ekspresi gen SDF-1 44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Etik Penelitian 55
Lampiran 2. Surat Keterangan Penelitian 56
Lampiran 3. Hasil Analisis.....57
Lampiran 4. Analisis Statistik FGF-1.....59
Lampiran 5. Analisis Statistik SDF-1 61
Lampiran 6. Kegiatan Penelitian.....63

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
UNISSULA
جامعة سلطان أجونج الإسلامية

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka bakar derajat dua merusak semua lapisan kulit dan sebagian jaringan di bawahnya. Gejalanya meliputi kulit memerah disertai rasa perih, terutama saat disentuh. Muncul lepuhan beberapa saat setelahnya. Luka terasa lebih sensitif dan pucat saat ditekan. Luka bakar ini sangat serius dan membutuhkan perawatan profesional untuk mencegah infeksi dan memperbaiki jaringan yang rusak. Penanganan medis, sering kali melibatkan pembedahan seperti metode *grafting*. Namun demikian, metode ini masih terkendala terbatasnya sumber donor kulit sehingga membutuhkan terapi yang lebih baik. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa *Fibroblast Growth Factor-1* (FGF-1) dan *Stromal cell-Derived Factor-1* (SDF-1) penting dalam penyembuhan luka bakar derajat dua. FGF-1 merangsang regenerasi jaringan dan angiogenesis, mempercepat pertumbuhan sel dan pembuluh darah. SDF-1 merekrut sel induk dan progenitor ke lokasi luka, mengurangi peradangan dan mendukung regenerasi jaringan serta angiogenesis. Beberapa penelitian melaporkan bahwa eksosom yang disekresikan *mesenchymal stem cell* (E-MSC) mampu mengatur produksi FGF-1 dan SDF-1.[1]

Cedera luka bakar bukan hanya masalah kesehatan individu, tetapi juga berdampak pada ekonomi dan sosial, dengan tingginya biaya perawatan, kehilangan produktivitas, serta meningkatnya angka disabilitas.

Oleh karena itu, upaya pencegahan dan peningkatan fasilitas kesehatan menjadi sangat penting untuk menekan angka kejadian dan dampaknya di masyarakat.[2]

Dalam pengobatan luka bakar, teknik pencangkokan kulit *autologous* tetap menjadi standar, karena kurangnya kulit donor, metode tersebut masih tidak efektif, terutama pada pasien dengan luka bakar yang luas. Keterbatasan ini menyebabkan pasien sering mengalami kegagalan *grafting* 5–10%, penundaan penutupan luka, infeksi, dan munculnya jaringan parut, dan akhirnya kematian, oleh karena itu inovasi untuk metode penyembuhan luka bakar menjadi sangat penting. [2]

Exosome mesenchymal stem cell (E-MSC) adalah vesikel kecil berukuran 30-150 nm yang dilepaskan oleh *mesenchymal stem cell* dan berperan penting dalam regenerasi serta perbaikan jaringan melalui berbagai molekul bioaktif didalamnya. Eksosom ini mengandung sitokin, *growth factor* seperti TGF-β, VEGF, IGF-1, dan HGF yang mendukung angiogenesis, modulasi sistem imun, serta stimulasi proliferasi sel. Selain itu, eksosom MSC membawa microRNA (miRNA) dan mRNA yang mengatur ekspresi gen untuk mempercepat penyembuhan luka dan mengurangi inflamasi. *Growth factor* yang terkandung dalam eksosom berperan dalam merangsang angiogenesis, mendukung proliferasi sel epitel, dan mempromosikan regenerasi dan perbaikan jaringan. Selain itu, miRNA seperti miR-21 dan miR-146a yang terdapat dalam eksosom mengatur

ekspresi gen yang terkait dengan proliferasi, diferensiasi, dan respon imun, sehingga meningkatkan kemampuan regeneratif sel.[1]

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa 100 uL E-MSC dapat meningkatkan kolagen pada penyembuhan luka. Beberapa kajian menyebutkan bahwa E-MSC dapat meregulasi sekresi FGF-1 dan SDF-1. Namun demikian, penelitian tersebut belum mengkaji pengaruh pemberian E-MSC terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada luka bakar derajat dua. Oleh karena itu, penelitian untuk mengkaji pengaruh pemberian E-MSC terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada luka bakar derajat dua menjadi sangat penting untuk dilakukan.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami luka bakar derajat dua pasca pemberian E-MSC?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana pemberian E-MSC mempengaruhi ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami luka bakar derajat dua.

1.3.2. Tujuan Khusus

a. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menunjukkan adanya pengaruh ekspresi gen FGF-1 pada tikus jantan galur Wistar dengan luka bakar

derajat dua yang diberikan E-MSC 100 uL dan 200 uL dibandingkan dengan kontrol.

b. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menunjukkan adanya pengaruh ekspresi gen SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar dengan luka bakar derajat dua yang diberikan E-MSC 100 uL dan 200 uL dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Berdasarkan review literatur mengenai penggunaan E-MSC 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
Aarthi Rajesh, Esther Da Eun Ju, Kelly A. Oxford, Rebecca M. Harman, Gerlinde R. Van de Walle[3]	The mesenchymal stromal cell secretome promotes tissue regeneration and increases macrophage infiltration in acute and methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected skin wounds in vivo	*In vivo*	BM-MSC CM memiliki efek pro-penyembuhan, imunomodulasi, dan anti-bakteri terhadap penyembuhan luka secara in vivo.
Hu, Li Wang, Juan Zhou, Xin Xiong, Zehuan Zhao, Jiajia Yu, Ran Huang, Fang Zhang, Handong Chen, Lili [4]	Exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts.	*In vivo*	Hasil eksperimen in vivo menunjukkan bahwa ASCs-Exos dapat dimasukkan ke area luka jaringan lunak dengan tingkat penyembuhan yang signifikan, seperti yang ditunjukkan oleh sayatan kulit tikus.
Li, Xiao Liu, Lingying	Exosome Derived From Human	*In vivo*	Eksosom hUCMSC (human umbilical cord

Peneliti,tahun	Judul	Metode	Hasil
Yang, Jing Yu, Yonghui Chai, Jiake Wang, Lingyan Ma, Li Yin, Huinan [5]	Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation		mesenchymal stem cell-derived exosomes) yang mengekspresikan berlebih miR-181c lebih efektif menekan jalur sinyal TLR4 dan meredakan peradangan pada tikus yang mengalami luka bakar.
Kudinov, V A. Artyushev, R I. Zurina, I M. Lapshin, R D. Snopova, L B. Mukhina, I V. Grinakovskaya, O S. Saburina, I N. [6]	Antimicrobial and regenerative effects of placental multipotent mesenchymal stromal cell secretome-based chitosan gel on infected burns in rats	*In vivo*	MSC-Ch-gel secara efektif mempercepat penyembuhan luka terinfeksi pada tikus dengan luka bakar derajat tiga.
Zhu, Ziying Zhang, Xiaona Hao, Haojie Xu, Heran Shu, Jun Hou, Qian Wang, Min [7]	Exosomes Derived From Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Treat Cutaneous Nerve Damage and Promote Wound Healing	*In vivo*	UC-MSC-Exo mempercepat rekrutmen fibroblas di lokasi trauma dan secara signifikan meningkatkan regenerasi saraf kulit secara in vivo.

Penelitian terdahulu yang menunjukkan peran *Conditioned Medium Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells* (BM-MSC) dan sekretom dalam meningkatkan penyembuhan luka, terutama dalam infeksi kronis seperti yang disebabkan oleh Staphylococcus aureus yang resisten terhadap methicillin (MRSA). Temuan utama menunjukkan bahwa meskipun perawatan BM-MSC CM tidak secara signifikan mempercepat penutupan luka pada luka yang terinfeksi MRSA, perawatan ini meningkatkan pembentukan jaringan granulasi, meningkatkan infiltrasi sel imun, dan mengurangi bakteri. Adanya makrofag mirip M2 dan berbagai faktor bioaktif dalam sekretom MSC menunjukkan potensinya

sebagai alternatif terapi non-antibiotik untuk meningkatkan hasil penyembuhan pada luka akut dan kronis.

Penelitian lainnya juga, dampak eksosom yang berasal dari *Adipose-derived Stem Cell Exosomes* (ASC-Exos) terhadap aktivitas fibroblas dan penyembuhan luka kulit, mengungkapkan bahwa eksosom ini meningkatkan migrasi, proliferasi, dan sintesis kolagen fibroblas. Penelitian ini menunjukkan bahwa luka dengan lapisan lemak sembuh lebih cepat dan menunjukkan distribusi eksosom yang lebih baik, sementara suntikan lokal dan intravena ASCs-Exos secara signifikan mempercepat penyembuhan luka, dengan pemberian intravena terbukti lebih efektif. Selain itu, temuan ini menunjukkan bahwa ASCs-Exos mendorong deposisi kolagen awal tetapi dapat menghambat sintesis kolagen yang berlebihan pada tahap selanjutnya, yang menunjukkan potensinya sebagai alat terapeutik untuk penyembuhan luka jaringan lunak. Penelitian yang berbeda lainnya bahwa peran *human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-exosome* (hUCMSC-exosome) dalam mengurangi peradangan, terutama dalam cedera luka bakar yang parah. Potensi terapeutik dari eksosom ini, dengan menekankan fungsi pengaturan mikroRNA (miR-181c) dalam menurunkan jalur pensinyalan TLR4, yang sangat penting untuk respons inflamasi. Temuan ini menunjukkan bahwa eksosom hUCMSC dapat secara signifikan mengurangi sitokin pro-inflamasi dengan meningkatkan respons anti-inflamasi, menunjukkan pendekatan untuk mengelola peradangan yang berlebihan dan meningkatkan penyembuhan pada pasien luka bakar.

Penelitian setelahnya, potensi terapeutik *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* (MMSC) dan sekretomnya, terutama berfokus pada aplikasi dalam penyembuhan luka dan aktivitas antimikroba. Melalui analisis proteomik, secretome dikarakterisasi, mengungkapkan berbagai protein yang terlibat dalam pensinyalan faktor pertumbuhan dan respons imun. Hasil percobaan menunjukkan bahwa gel kitosan yang diinfuskan dengan sekretom MMSC secara signifikan meningkatkan penyembuhan pada luka bakar yang terinfeksi pada model tikus, yang menunjukkan sifat antimikroba dan kemampuannya untuk mendorong regenerasi jaringan, sehingga potensinya sebagai pengobatan baru untuk luka kronis dan infeksi. Penelitian lainnya yang berbeda ini bahwa peran *stem cell*, khususnya *Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes* (UC-MSC-Exo), dalam meningkatkan penyembuhan luka dan regenerasi saraf. Temuan utama menunjukkan bahwa UC-MSC-Exo secara signifikan meningkatkan migrasi *fibroblast*, sekresi faktor pertumbuhan saraf, dan regenerasi kulit secara keseluruhan pada model in vitro dan in vivo. Yang menekankan pentingnya faktor neurotropik dan potensi terapeutik eksosom dalam meningkatkan proses penyembuhan pada cedera kulit dan saraf, adanya penelitian yang sedang berlangsung tentang strategi regeneratif yang inovatif.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat didapat dari penelitian ini adalah adanya hasil ilmiah peran E-MSC terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami luka bakar derajat dua.

1.5.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan bermanfaat bagi praktisi kesehatan karena dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan E-MSC sebagai agen regeneratif pada luka bakar derajat dua.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Fibroblast Growth Factor-1* (FGF-1)

2.1.1. Definisi

FGF-1, juga dikenal sebagai *fibroblast growth factor 1*, 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. FGF-1 memiliki berat molekul sekitar 18 kDa (kilodalton). Protein ini dikodekan oleh gen FGF-1 yang terletak pada kromosom manusia 5q31, di mana gen tersebut menghasilkan mRNA yang kemudian ditranslasi menjadi protein FGF-1. Reseptor utama untuk FGF-1 adalah *Fibroblast Growth Factor Receptors* (FGFR1, FGFR2, FGFR3, dan FGFR4), yang terletak pada permukaan berbagai jenis sel. Protein FGFR mengikat FGF-1 untuk memulai sinyal transduksi yang mendorong proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel-sel. FGF-1 memainkan peran penting dalam proses penyembuhan luka dengan merangsang pertumbuhan dan migrasi fibroblas dan sel endotel, menjadikannya penting dalam terapi regeneratif.[8–10]

2.1.2. Jalur Produksi dan Aktivasi FGF-1

Proses sekresi FGF-1 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. TGF-β memicu kaskade sinyal yang melibatkan protein Smad, yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen-gen kunci seperti kolagen tipe I alpha 1 (COL1A1) dan fibronectin (FN1). Kolagen dan fibronectin ini penting dalam membentuk matriks ekstraseluler yang mendukung penyembuhan luka.[11-12]

FGF-1 sendiri diproduksi oleh sel stroma di sekitar luka sebagai respons terhadap stimulasi oleh faktor-faktor pertumbuhan dan sitokin tersebut. FGF-1 berikatan dengan berbagai reseptor FGFR pada sel-sel target, memulai jalur sinyal yang mengaktifkan proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel. Jalur aktivasi FGF-1 dalam penyembuhan luka dimulai ketika FGF-1 berinteraksi dengan reseptor utamanya, seperti FGFR1, yang umumnya terdapat pada permukaan berbagai jenis sel. Interaksi ini memicu aktivasi berbagai jalur sinyal intraseluler, termasuk jalur Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) dan PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-Kinase/Akt). Aktivasi jalur MAPK mengarah pada proliferasi sel dan migrasi fibroblas serta sel endotel, yang penting untuk regenerasi jaringan. Sementara itu, jalur PI3K/Akt berkontribusi pada proses anti-apoptosis dan mempromosikan pertumbuhan sel. Selain itu, FGF-1 juga dapat merangsang produksi faktor-faktor pertumbuhan lainnya seperti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), yang mempromosikan

angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru, memperbaiki aliran darah ke area luka. Dengan cara ini, aktivasi jalur FGF-1 memainkan peran krusial dalam memfasilitasi proses penyembuhan luka, mengoptimalkan regenerasi jaringan, dan mengurangi risiko komplikasi seperti jaringan parut.[13–16]

2.2. *Stromal Derived Growth Factor-1* (SDF-1)

2.2.1. Definisi

Stromal cell-derived factor 1, juga dikenal sebagai CXCL12, adalah sebuah *chemokine* yang berperan penting dalam berbagai proses biologis, termasuk perkembangan sistem kekebalan tubuh, hematopoiesis (pembentukan sel darah), dan penyembuhan luka. SDF-1 memiliki berat molekul sekitar 8-12 kDa (kilodalton) dan dikodekan oleh gen CXCL12 yang terletak pada kromosom manusia 10q11.21.[17]

Chemokine ini berikatan dengan reseptor CXCR4, yang terletak pada permukaan berbagai jenis sel termasuk sel hematopoietik, sel progenitor, dan sel endotel. Ikatan antara SDF-1 dan CXCR4 memicu sinyal transduksi yang mengatur migrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel. SDF-1 memainkan peran penting dalam mobilisasi *stem cell* sehingga berperan penting dalam terapi regeneratif. Selain itu, SDF-1 juga terlibat dalam angiogenesis sehingga memiliki peran dalam penyembuhan luka.[18,19]

2.2.2. Sekresi SDF-1

Proses sekresi SDF-1 dimulai dengan transkripsi gen CXCL12 di dalam nukleus sel yang kemudian menghasilkan mRNA CXCL12. mRNA ini ditranslasi di ribosom yang melekat pada retikulum endoplasma (ER), menghasilkan preprotein SDF-1 yang mengandung peptida sinyal. Peptida sinyal ini mengarahkan preprotein ke dalam lumen ER, dimana ia mengalami modifikasi post-translasi seperti glikosilasi dan pembentukan ikatan disulfida, membentuk protein SDF-1 yang matang. Setelah proses ini selesai, SDF-1 dipindahkan ke aparatus Golgi melalui vesikel transpor. Di dalam Golgi, SDF-1 dapat mengalami modifikasi tambahan dan dikemas ke dalam vesikel sekretorik.[20–23]

Vesikel sekretorik ini kemudian diangkut ke membran plasma melalui sitoskeleton sel dengan bantuan motor protein seperti kinesin. Ketika vesikel mencapai membran plasma, mereka mengalami eksositosis yang dimediasi oleh kompleks protein SNARE, melepaskan SDF-1 ke dalam ruang ekstraseluler. Sekresi SDF-1 dapat dipicu oleh berbagai sinyal, termasuk hipoksia dan stimulasi oleh sitokin atau faktor pertumbuhan lain. Setelah disekresikan, SDF-1 berinteraksi dengan reseptor CXCR4 yang terletak pada permukaan sel target, seperti sel hematopoietik, progenitor, dan endotel. Interaksi ini memicu jalur sinyal yang melibatkan protein G, yang kemudian mengaktifkan serangkaian kinase, termasuk PI3K/AKT dan MAPK/ERK, yang mengatur migrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel.[24–26]

2.2.3. Peran SDF-1 dalam Luka Bakar

Penyembuhan luka bakar derajat dua melibatkan berbagai proses biologis yang kompleks, salah satunya adalah jalur yang melibatkan *Stromal cell-Derived Factor* 1 (SDF-1) atau CXCL12. Pada luka bakar derajat dua, kerusakan jaringan sangat parah mencakup epidermis, dermis, dan bahkan jaringan di bawahnya. Respon awal terhadap luka bakar ini adalah inflamasi akut yang memicu pelepasan sitokin dan faktor pertumbuhan, merangsang ekspresi gen CXCL12 pada sel-sel stromal dan fibroblas di sekitar luka. Transkripsi gen CXCL12 menghasilkan mRNA yang diterjemahkan menjadi preprotein SDF-1 di retikulum endoplasma (ER). Setelah modifikasi post-translasi seperti glikosilasi, protein SDF-1 matang dikemas dalam vesikel sekretorik melalui aparatus Golgi dan kemudian disekresikan ke ruang ekstraseluler melalui eksositosis yang dimediasi oleh kompleks protein SNARE.[19,27–29]

Sekresi SDF-1 meningkat terutama karena kondisi hipoksia yang umum terjadi di sekitar luka bakar, yang menginduksi faktor hipoksia (HIF-1α) dan meningkatkan ekspresi CXCL12. SDF-1 kemudian berinteraksi dengan reseptor CXCR4 pada permukaan sel hematopoietik, sel progenitor, dan sel endotel. Aktivasi reseptor CXCR4 oleh SDF-1 memicu jalur sinyal yang melibatkan protein G, yang mengaktifkan kinases seperti PI3K/AKT dan MAPK/ERK. Jalur ini memfasilitasi migrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel-sel tersebut ke area luka,

mempercepat proses penyembuhan dengan membentuk jaringan baru dan pembuluh darah. [19,27–29]

Lebih lanjut, SDF-1 juga berperan dalam mobilisasi sel-sel induk dari sum-sum tulang ke sirkulasi darah, yang kemudian bermigrasi ke situs luka di bawah pengaruh gradien SDF-1. Sel-sel ini membantu dalam regenerasi jaringan yang rusak, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), dan mempercepat epitelisasi. SDF-1 juga bekerja sinergis dengan faktor pertumbuhan lain seperti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) untuk memperkuat angiogenesis dan perbaikan jaringan. Secara keseluruhan, jalur yang melibatkan SDF-1 sangat penting dalam penyembuhan luka bakar derajat dua, dengan mengkoordinasikan berbagai respon seluler yang mendukung regenerasi dan perbaikan jaringan yang rusak. [19,27–29]

2.3. *Exosome Mesenchymal Stem Cell*

2.3.1. Definisi

Microvesicle adalah vesikel membran yang dilepaskan oleh berbagai jenis sel ke lingkungan ekstraseluler dan memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel. Ada beberapa jenis *microvesicle*, termasuk *classic microvesicle, apoptotic bodies,* dan *exosome*. *Classic microvesicle*, juga dikenal sebagai *ectosome*, dihasilkan dari *budding* langsung dari membran plasma dan biasanya berdiameter 100-1000 nm. *Apoptotic bodies* dihasilkan selama apoptosis (kematian sel terprogram) dan memiliki ukuran bervariasi dari 50 hingga 5000 nm. *Exosome*, yang paling dikenal

dan dipelajari, berukuran lebih kecil dengan diameter 30-150 nm dan berasal dari sistem endosomal, khususnya melalui *Multivesicular Bodies* (MVB) yang berfusi dengan membran plasma untuk melepaskan *exosome* ke lingkungan ekstraseluler.[30]

Exosome yang dihasilkan oleh *mesenchymal stem cells* (MSCs) memiliki karakteristik dan kandungan yang unik. Mereka memiliki membran lipid bilayer yang mirip dengan sel asalnya, mengandung berbagai protein permukaan seperti tetraspanins (CD9, CD63, CD81), integrins, dan selektins yang terlibat dalam pengenalan dan pengikatan ke sel target. Di dalam E-MSC terdapat berbagai jenis molekul bioaktif, termasuk protein, lipid, mRNA, microRNA (miRNA), dan DNA. Protein yang ditemukan dalam E-MSC sering kali mencakup faktor pertumbuhan (seperti TGF-β, HGF), sitokin (seperti IL-6, IL-8), dan enzim (seperti matrix metalloproteinases, MMPs) yang terlibat dalam proses regeneratif dan imunomodulasi.[31–33]

Beberapa miRNA yang terkandung dalam E-MSC dan berperan dalam penyembuhan luka antara lain miR-21 yang mempromosikan proliferasi dan migrasi sel fibroblas serta mengurangi apoptosis, miR-146a yang mengurangi respon inflamasi dengan menghambat ekspresi molekul inflamasi seperti NF-κB, dan miR-126 yang mendukung angiogenesis dengan meningkatkan aktivitas sel endotel. miRNA lain seperti miR-31 meningkatkan migrasi dan proliferasi keratinosit, miR-132 berperan dalam angiogenesis dan mengurangi inflamasi, miR-223 mengatur diferensiasi

dan fungsi sel imun, serta miR-199a meningkatkan proliferasi dan migrasi sel dermal fibroblas.[34–37]

Selain miRNA, E-MSC juga mengandung berbagai protein seperti faktor pertumbuhan TGF-β, HGF, sitokin (IL-6, IL-8), dan enzim (*matrix metalloproteinases*, MMPs) yang berperan dalam proses regeneratif dan imunomodulasi.[38–40] Lipid dalam E-MSC termasuk *sphingolipids, ceramides,* dan *cholesterol* yang berperan dalam struktur dan fungsi membran vesikel. *Exosome* MSC juga mengandung mRNA yang dapat diterjemahkan menjadi protein fungsional dalam sel target, memberikan instruksi genetik langsung untuk proses perbaikan dan regenerasi.[38–40] Secara keseluruhan, E-MSC merupakan kendaraan komunikasi antar sel yang sangat efisien, dengan kandungan molekul bioaktif yang memungkinkan mereka untuk mengatur berbagai proses biologis dan menawarkan potensi besar dalam terapi regeneratif dan pengobatan berbagai penyakit, termasuk penyembuhan luka.[38–40]

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

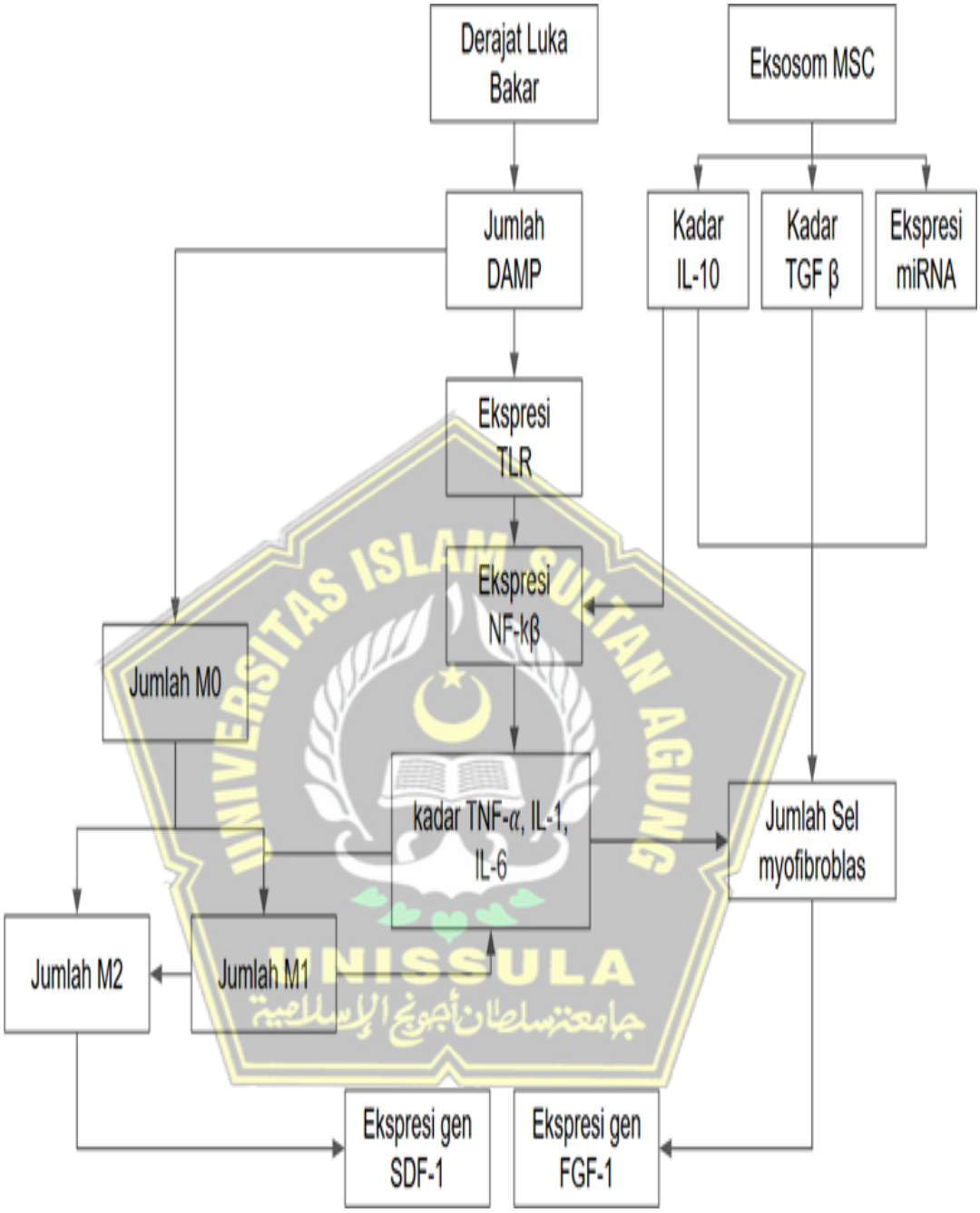
Menurut beberapa penelitian terdahulu, proses penyembuhan luka bakar melibatkan beberapa molekul penting seperti *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), NF-κB, SDF-1, dan FGF-1. Ketika terjadi luka bakar, sel-sel yang rusak melepaskan DAMPs seperti HMGB1, ATP, dan DNA mitokondria, yang dikenali oleh *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) pada sel imun, termasuk *Toll-Like Receptors* (TLRs). Aktivasi TLRs oleh DAMPs memicu jalur sinyal yang mengarah pada aktivasi NF-κB, yang merupakan faktor transkripsi yang berperan utama dalam respon inflamasi. NF-κB berpindah ke nukleus dan menginduksi ekspresi berbagai gen pro-inflamasi, seperti sitokin (IL-1β, TNF-α), kemokin, dan molekul adhesi.

Sitokin-sitokin ini merekrut lebih banyak sel imun ke situs luka, memperkuat respon inflamasi dan membersihkan debris seluler. Namun, inflamasi yang berlebihan dapat memperburuk kerusakan jaringan, sehingga penting adanya regulasi yang tepat. Sinyal inflamasi yang dikeluarkan sel imun pada gilirannya akan memicu produksi SDF-1 dan FGF-1 untuk memicu proses penyembuhan luka.

Exosome Mesenchymal Stem Cells mengandung berbagai jenis komponen seperti IL-10, TGF-β, PDGF, miRNA 21, dan miRNA 146a yang berperan penting dalam mengintervensi dan mempercepat proses

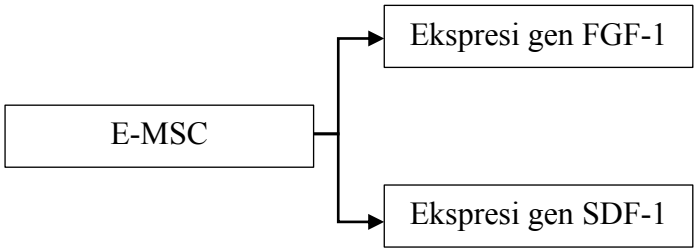
penyembuhan luka bakar. Sitokin seperti IL-1β dan TNF-α, yang dilepaskan selama respons inflamasi awal setelah luka bakar, dapat dimodulasi oleh E-MSC melalui penurunan aktivasi NF-κB dan pengurangan ekspresi sitokin pro-inflamasi.

Selain itu, eksosom mengandung faktor pertumbuhan seperti SDF-1 dan FGF-1, yang mendukung proliferasi sel-sel progenitor, fibroblas, dan sel epitel di sekitar luka. FGF-1 membantu dalam pembentukan jaringan baru, sementara SDF-1 berperan dalam menarik sel-sel induk ke area luka untuk memperbaiki kerusakan. MicroRNA (miRNA) yang terkandung dalam eksosom juga berkontribusi dalam regulasi ekspresi gen dan modulasi respons imun, mengoptimalkan keseimbangan antara inflamasi dan proses penyembuhan. Dengan demikian, E-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 FGF-1 dan SDF-1 pasca pemberian E-MSC pada tikus jantan galur Wistar dengan luka bakar derajat dua dibandingkan kontrol.

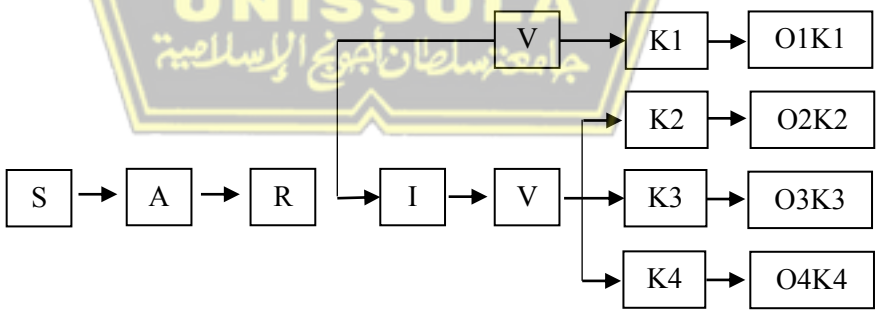
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *Post-test Only Control Group* secara in vivo, dengan metode rancangan acak lengkap untuk setiap perlakuan. Desain ini memungkinkan evaluasi efek perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkannya langsung dengan kelompok kontrol. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan prinsip *non-probability sampling*, khususnya *consecutive sampling*, dan melibatkan kelompok kontrol untuk membandingkan hasil. Sampel kulit yang digunakan berasal dari tikus model yang mengalami luka bakar derajat dua.

Penelitian ini menggunakan empat kelompok dengan rincian sebagai berikut :



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi

I : Induksi Luka Bakar Derajat Dua

V : Validasi Luka Bakar Derajat Dua menggunakan *staining* HE

K1 : Tikus Sehat tidak diberi perlakuan Luka Bakar Derajat Dua

K2 : Tikus dengan Luka Bakar Derajat Dua diberi injeksi NaCl

K3 : Tikus dengan Luka Bakar Derajat Dua diberi E-MSC dosis 100 uL

K4 : Tikus dengan Luka Bakar Derajat Dua diberi E-MSC dosis 200 uL

O1K1 : Observasi Ekspresi Gen FGF-1 dan Ekspresi Gen SDF-1 K1

O2K2 : Observasi Ekspresi Gen FGF-1 dan Ekspresi Gen SDF-1 K2

O3K3 : Observasi Ekspresi Gen FGF-1 dan Ekspresi Gen SDF-1 K3

O4K4 : Observasi Ekspresi Gen FGF-1 dan Ekspresi Gen SDF-1 K4

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah E-MSC dosis 100 uL dan 200 uL

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1

4.2.1.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah luka bakar derajat dua.

4.2.1.4. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah strain tikus galur Wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi/pakan tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2. Definisi Operasional Variabel

4.2.2.1. E-MSC

Eksosom MSC adalah *microvesicle* berukuran 100-150 nm yang disekresikan oleh MSC ke dalam medium kultur dan kemudian diisolasi menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* dengan filter 100 kDa dan 500 kDa. Eksosom MSC dibuat dalam sediaan injeksi isohidris dan isotonis *single dose.* Eksosom MSC dengan dosis 100 uL dan 200 uL diinjeksikan secara *subcutan* di sekitar luka.

Satuan : uL

Skala : Rasio

4.2.2.2. Ekspresi Gen FGF-1

Protein FGF-1 adalah protein yang diekspresikan di lokasi luka bakar pada kulit dan dievaluasi dari sampel kulit yang diambil 24 jam setelah pemberian perlakuan terakhir. Sampel jaringan kulit tikus seberat 50 mg disimpan dalam RNA *later* dan kemudian diekstraksi mRNA menggunakan *tryzole* dan alat ultrasonikasi. Analisis dilakukan dengan metode RT-PCR.

Satuan : Fold change

Skala : Rasio

4.2.2.3. Ekspresi Gen SDF-1

Protein SDF-1 adalah protein yang diekspresikan di lokasi luka bakar pada kulit dan dievaluasi dari sampel kulit yang diambil 24 jam setelah pemberian perlakuan terakhir. Sampel jaringan kulit tikus seberat 50 mg disimpan dalam RNA *later* dan kemudian diekstraksi mRNA menggunakan *tryzole* dan alat ultrasonikasi. Analisis dilakukan dengan metode RT-PCR.

Satuan : Fold change

Skala : Rasio

4.2.2.4. Luka Bakar Derajat Dua

Pembuatan luka bakar pada tikus dilakukan dengan mencukur rambut di bagian dorsal tikus menggunakan pisau cukur. Setelah itu, lakukan anestesi 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 perlukaan yaitu bagian proksimal punggung tikus. Luka bakar dibuat menggunakan plat logam tembaga dengan diameter 6 mm. Plat logam tembaga dengan tebal 3 mm dipanaskan hingga menyala lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 5 detik.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Hewan percobaan yang dipakai dalam studi ini adalah tikus jantan galur Wistar, berusia 6-8 minggu, dengan berat 200-250 gram, diakui layak oleh staff dokter hewan Laboratorium SCCR Indonesia. Tikus dipelihara pada suhu 20-28℃ dengan ruangan bersirkulasi udara 24 jam dan siklus cahaya 12 jam gelap-terang. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

a) Tidak ada kelainan anatomis.
b) Bergerak secara aktif.
c) Tikus dengan luka bakar derajat dua: tikus yang diinduksi dengan plat logam tembaga.
d) Pemeriksaan Histopatologis : tikus yang diberi plat logam tembaga selama 5 detik divalidasi secara makroskopik yaitu, kemerahan (eritema), bengkak (edema) dan bula. Setelah dilakukan *staining* HE, ditemukan hilangnya lapisan epidermis, kerusakan bagian dermis dan nekrosis di bagian epidermal.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

a) Tikus mengalami sakit selama penelitian.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

a) Tikus mengalami infeksi.

b) Tikus mati selama penelitian.

4.4. Besar Sampel

Dalam penelitian ini, ukuran sampel dihitung menggunakan rumus Federer dengan rumus, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, di mana t adalah jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah sampel per kelompok. Penelitian ini melibatkan empat perlakuan, yaitu tikus sehat tanpa luka bakar derajat dua (K1), luka bakar dengan injeksi NaCl (K2), serta luka bakar derajat dua yang menerima injeksi *subcutan exosome* dengan dosis 100 uL (K3) dan 200 uL (K4), masing-masing satu kali. Dengan rumus tersebut, perhitungannya adalah sebagai berikut :

$(t-1)(n-1) \geq 15$
$(4-1)(n-1) \geq 15$
$3(n-1) \geq 15$
$3n - 3 \geq 15$
$3n \geq 18$
$n \geq 6$

Dari perhitungan itu, jumlah minimum sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok perlakuan adalah 6 ekor tikus. Untuk mengantisipasi kemungkinan *drop out* selama penelitian, ditambahkan satu ekor per kelompok sebagai cadangan, sehingga total minimal sampel yang dibutuhkan untuk empat perlakuan menjadi 28 ekor tikus.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat Penelitian

1. *Centrifuge*
2. *Waterbath*
3. *Vaccum Pump*
4. Set kandang dengan tempat pakan dan minum
5. Alat cukur
6. Sarung tangan
7. Tempat fiksasi
8. Timbangan analitik
9. *Object glass*
10. Kaca penutup
11. Pisau scalpel
12. Pinset
13. *Freezer* dengan suhu -20°C
14. *Microtome*
15. Mesin *processor* jaringan otomatis
16. *Assay plate*
17. Mikropipet *single channel*
18. Mikropipet *multi channel*
19. *Incubator*
20. *Vortex*
21. Spektrofotometer UV-Vis

22. *Biosafety cabinet*

4.5.2. Bahan Penelitian

1. Simplisia E-MSC
2. Etanol 70%
3. Povidon iodine
4. HE *staining kit*
5. *Xylene*
6. Ketamin
7. *Mounting solution*
8. Aquabides
9. *Forward primer* FGF-1: 5'- ATGGCAGCCGGGAGATTC -3'
10. *Reverse primer* FGF-1 : 5'- TCAGCTCTGCCGTACTCGTT -3'
11. *Forward primer* SDF-1: 5'- TGCATCAGTGACGGTAAGCC -3'
12. *Reverse primer* SDF-1: 5'- AGCTTTGGGTCCAGGTACTC -3'

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. *Ethical Clearance*

Penelitian dimulai dengan mengajukan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang setelah mendapatkan persetujuan proposal penelitian dari pembimbing dan penguji. Permohonan ini diperlukan untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip etika dalam penggunaan hewan percobaan. Persetujuan etik juga menjamin bahwa

perlakuan terhadap hewan percobaan dilakukan dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan, serta meminimalkan penderitaan yang tidak perlu.

4.6.2. Isolasi Eksosom dari MSC

Langkah-langkah 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 memungkinkan produksi eksosom.
4. Kumpulkan *conditioning media* yang telah dikondisikan oleh MSC untuk proses filtrasi.
5. C*onditioning media* disentrifugasi pada 300g selama 10 menit untuk menghilangkan sel-sel yang tersisa.
6. Supernatan disentrifugasi pada 2000g selama 20 menit untuk membuang debris seluler dan *apoptotic bodies*.
7. Media difiltrasi menggunakan pori 0,22 µm untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dari eksosom.
8. Siapkan sistem TFF dengan filter 200-500 kDa.
9. Media yang telah difiltrasi dipindahkan ke dalam sistem TFF.

10. Jalankan media melalui filter TFF untuk memusatkan eksosom dengan ukuran 200-500 kDa.
11. Retentat yang mengandung eksosom dikumpulkan dan filtrat dibuang.
12. Tambahkan PBS atau *saline* ke *retentate* dan ulangi proses TFF untuk membersihkan eksosom dari sisa komponen media.
13. Konsentrasikan eksosom hingga volume yang diinginkan menggunakan TFF.
2. Eksosom yang terkonsentrasi dialokasikan dan disimpan pada suhu -80°C hingga siap digunakan.
3. Analisis eksosom dilakukan dengan *flow cytometry* menggunakan penanda CD9, CD63, dan CD81 untuk verifikasi kualitas dan kuantitas eksosom.

4.6.3. 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 Indonesia selama satu minggu. Tikus diadaptasikan dengan tempat tinggal baru, lingkungan baru, serta makanan dan minuman yang sesuai dengan standar kebutuhannya.

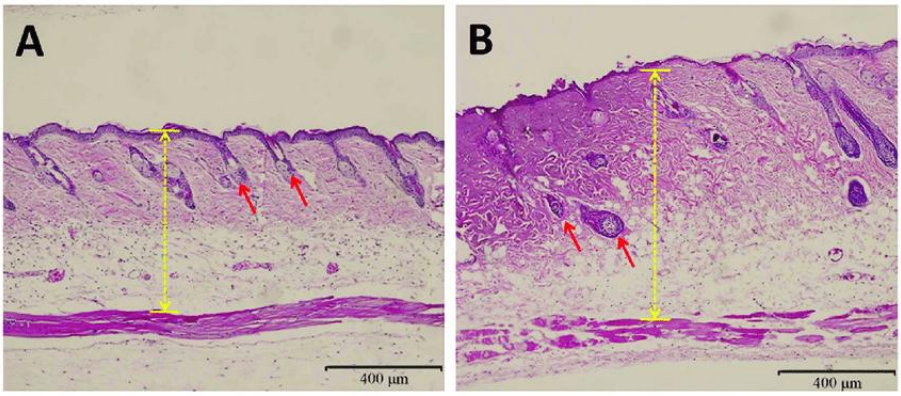
4.6.4. Randomisasi Hewan Uji

Randomisasi hewan uji bertujuan untuk mengelompokkan hewan uji sesuai kelompok perlakuan. Selanjutnya pada bagian punggung dari

masing-masing hewan uji diberi nomor yang berbeda. Hal ini bertujuan untuk menghindari kesalahan pengukuran pada setiap hewan uji.

4.6.5. Pembuatan Luka Bakar

Sebelum pembuatan luka bakar pada tikus dilakukan, daerah yang dibuat perlukaan dibebaskan terlebih dahulu dari bulu menggunakan pisau cukur. Setelah itu, lakukan anestesi menggunakan ketamin dengan dosis 7 mg/kgBB secara intraperitoneal 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 perlukaan yaitu bagian proksimal punggung tikus. Luka bakar dibuat menggunakan batang logam tembaga dengan diameter 6 mm. Plat logam tembaga dengan tebal 3 ml dipanaskan hingga menyala lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 5 detik. Validasi luka bakar derajat dua dilakukan menggunakan metode pengecatan Hematoxylin Eosin (HE) dengan gambaran histologi sebagaimana ditampilkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Gambaran Histologi Luka Bakar Derajat Dua[41]

4.6.6. Pemberian Treatment

Setelah luka bakar selesai dibuat pada bagian area luka tikus, selanjutnya perawatan luka bakar disesuaikan dengan kelompok perlakuan yang sudah ditentukan. Tikus sehat tanpa luka bakar derajat dua (K1), tikus dengan luka bakar derajat dua pemberian injeksi NaCl 100 uL secara *subcutan* (K2), luka bakar dengan injeksi 100 uL (K3) dan 200 uL (K4) diberikan sebanyak satu kali. Tikus diterminasi pada hari ke-7 setelah penyuntikan perlakuan.

4.7. Koleksi Sampel dan Analisis RT-PCR

4.7.1. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA

1. 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.
2. Sampel kemudian ditambahkan dengan 0.2µL kloroform dan diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu ruang.
3. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000xg selama 15 menit dengan suhu 4^{o}C.
4. Sampel membentuk tiga lapis larutan, sisi bawah berwarna merah muda berisi protein, sisi tengah berwarna putih asap berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (*aqueous phase*).
5. Pisahkan *aquoeus phase* di sisi atas ke tube yang berbeda.
6. Sampel *aqueous phase* kemudian ditambahkan 0.5µL isopropanol,

kemudian diresuspensi, diinkubasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000xg pada suhu 4^{o}C selama 10 menit.

7. Supernatant kemudian dibuang dan *pellet* ditambahkan dengan 1µL 75% *ethanol* lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7500xg di suhu 4^{o}C selama 5 menit.
8. Supernatant kemudian dibuang dan *pellet* RNA ditambahkan dengan 50µL *Nuclease-Free Water* (NFW).
9. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan *udrop microplate reader*.
10. Sampel RNA sebanyak 0,1µg dalam 1µL kemudian ditambahkan 5µL NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi pada suhu 65^{o}C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
11. Sampel RNA kemudian ditambahkan 2µL 4x DN Master Mix dan diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
12. Proses *reverse transcription* kemudian dilakukan dengan menambahkan 2µL 5x RT Master Mix dan diinkubasi pada 37^{o}C selama 15 menit, 50^{o}C selama 5 menit dan 98^{o}C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
13. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20^{o}C.

4.7.2. Pembacaan FGF-1 dan SDF-1 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR)

1. Ekspresi gen dari FGF-1 dan SDF-1 dianalisis menggunakan *Reverse*

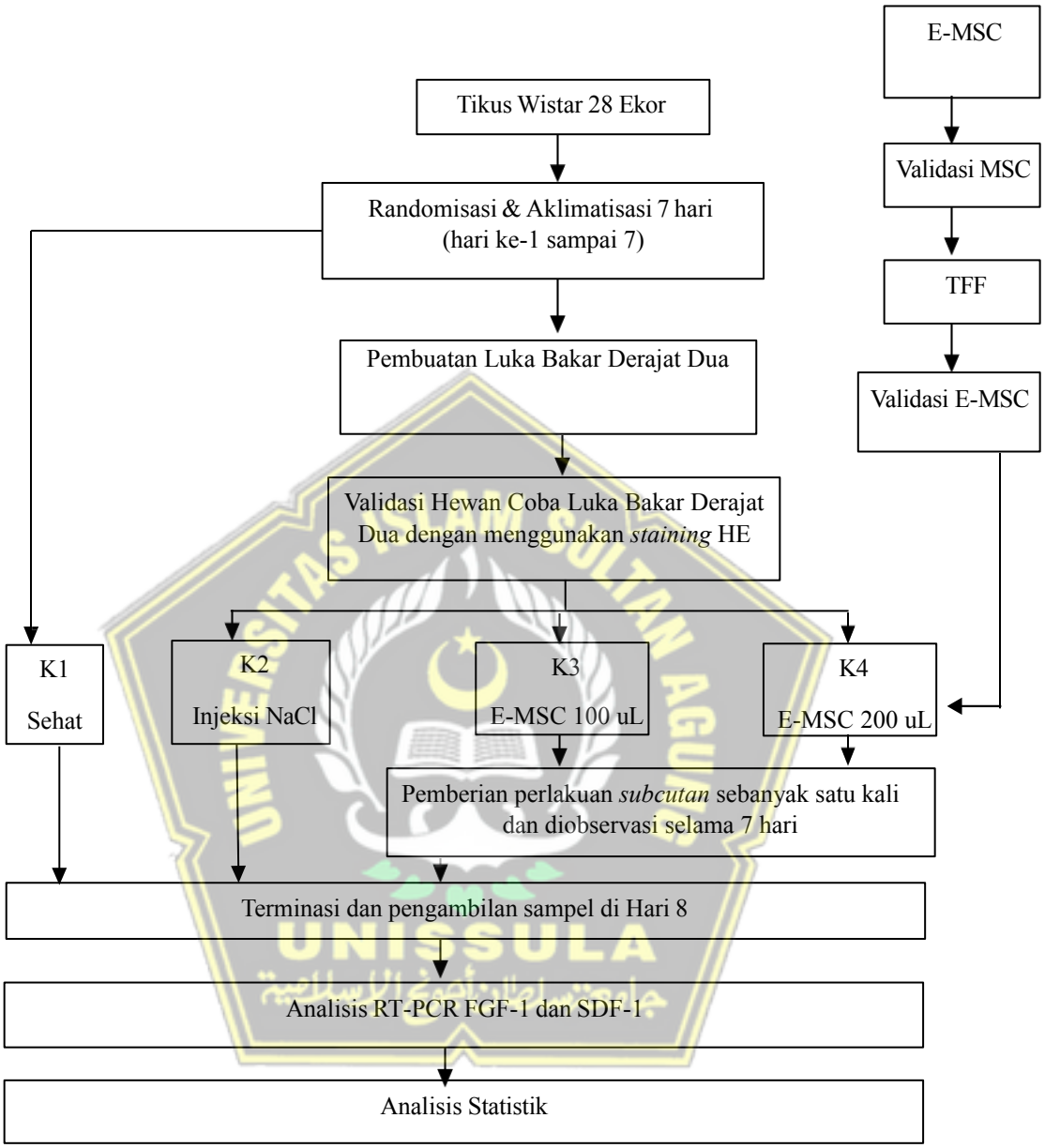
Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).

2. Campuran dari 1µL cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix sebanyak 10µL, *forward primer* 0,8µL, *reverse primer* 0,8µL dan NFW 7,4µL.
3. Proses qRT-PCR dilakukan menggunakan suhu 95^{o}C selama 2 menit, 95^{o}C selama 5 detik dan 56^{o}C selama 20 detik sebanyak 50 siklus. Proses qRT-PCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
4. Kuantifikasi data qRT-PCR dilakukan menggunakan *Software EcoStudy*.

4.8. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan SPSS untuk mengukur ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar. Data diukur pada skala rasio, dengan uji Shapiro-Wilk dan Levene untuk normalitas dan homogenitas. Hasil rata-rata ekspresi SDF-1 didapatkan data normal dan homogen, digunakan *One-Way* ANOVA dan Post Hoc LSD. Hasil rata-rata ekspresi gen FGF-1 didapatkan normal tapi tidak homogen, digunakan *One-Way* ANOVA dan Post Hoc Tamhane.

4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian E-MSC terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar model luka bakar derajat dua. Penelitian eksperimental menggunakan desain *Post-test Only Control Group* secara in vivo, dengan metode rancangan acak lengkap untuk setiap perlakuan dilakukan selama bulan Oktober-Desmber 2024 di laboratorium SCCR Indonesia, Semarang.

Penelitian dengan subjek tikus jantan galur Wistar sebanyak 28 ekor dengan model luka bakar derajat dua. Luka bakar dibuat menggunakan batang logam tembaga dengan diameter 6 mm. Plat logam tembaga dengan tebal 3 ml dipanaskan hingga menyala lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 5 detik. Tikus yang telah diberi luka kemudian dibagi 4 kelompok, yaitu kelompok K1 kontrol sehat, kelompok K2 luka bakar derajat dua dengan perlakuan pemberian injeksi NaCl, kelompok K3 luka bakar derajat dua yang diberi perlakuan injeksi *subcutan exosome* dosis 100 uL, dan kelompok K4 luka bakar derajat dua yang diberi perlakuan injeksi *subcutan exosome* dosis 200 uL.

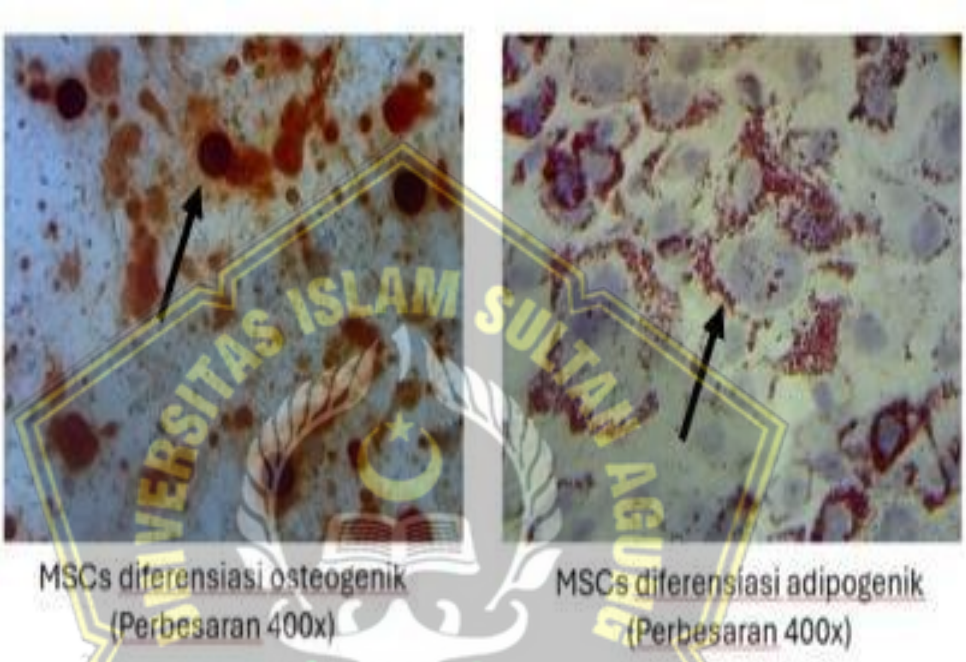
5.1.1. Validasi *Exosome* MSC

Hasil isolasi E-MSC dari tali pusat tikus yang sedang bunting selama 21 hari. 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 miskroskop (Gambar 5.1).

Gambar 5.1. Isolasi E-MSC. Sel terisolasi berbentuk *spindle-like* pada perbesaran 40x

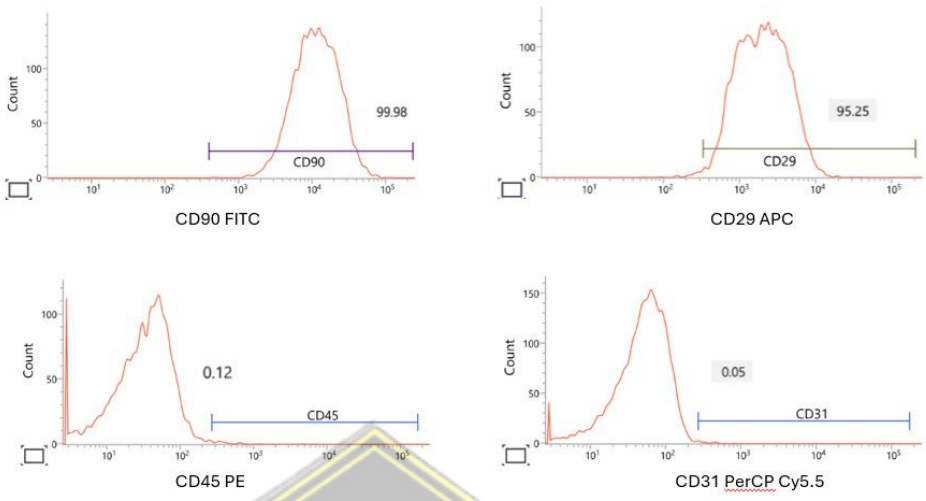
MSCs berkarakteristik dapat diferensiasi menjadi sel matur, termasuk osteosit dan adipogenik. Karakteristik ini dapat diamati setelah MSC diinkubasi dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik yang kemudian masing-masing diwarnai menggunakan *Alizarin Red* S untuk melihat deposisi kalsium dan *Oil Red* O untuk melihat droplet lipid yang terbentuk. Berdasarkan hasil pewarnaan, diketahui bahwa MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteogenik dan adipogenik (Gambar 5.2) Dengan

hasil pengamatan ini, sel yang dihasilkan dari isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik *mesenchymal stem cells*, yaitu kemampuan untuk mengalami diferensiasi menjadi jenis sel lain serta memiliki multipotensi.



Gambar 5.2. Isolasi E-MSC dengan *staining Oil Red* O dan *Alizarin Red* S. Droplet Lipid terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan *Oil Red* O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x (kiri), Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan *Alizarin Red* S (kanan).

Hasil isolasi sel yang diisolasi divalidasi menggunakan metode *flow cytometry* untuk menunjukan *marker* 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)

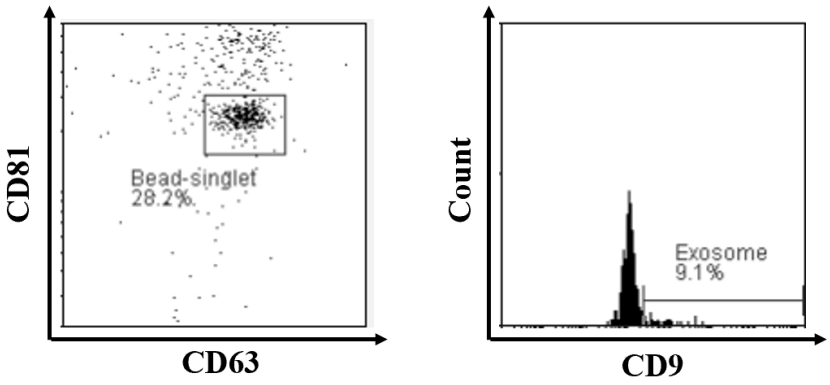


Gambar 5.3. Analisis *flow cytometry* terhadap *marker* penanda MSC CD90, CD29, CD45, dan CD31

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 prekondisi hipoksia 5% konsentrasi O2 menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF), berdasarkan *molecular weight cut-off*, maka molekul berukuran 100-500 kDa didapatkan mengandung *exosome* 0.75 ug/100 uL= 7.5 ug/mL

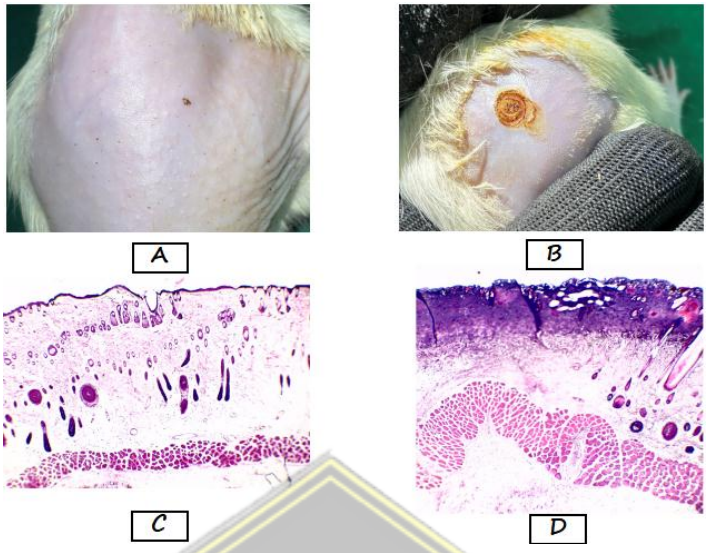
E-MSCs tervalidasi dengan menggunakan *flow cytometry* untuk melihat kandungan marker *exosome* yang terbaca yaitu CD63, CD81, dan CD9. Hasilnya, jumlah *exosome* yang terbaca positif menggunakan *marker* CD81, CD63 28,2%, dan CD9 9,1%.



Gambar 5.4. Validasi *exosome* terhadap ekspresi *marker* CD81, CD63 dan CD9.

5.1.2. Validasi Model Tikus Luka Bakar Derajat Dua

Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) digunakan untuk mengevaluasi struktur histologis jaringan pada model luka bakar, validasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa model luka bakar derajat dua yang dibuat berhasil dan sesuai dengan kriteria yang diinginkan. Validasi menggunakan pewarnaan HE merupakan pendekatan histopatologi yang umum untuk mengevaluasi kerusakan jaringan, 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. Lapisan *stratum corneum* dan *stratum spinosum* dapat menunjukkan tanda-tanda nekrosis atau deskuamasi, hilangnya struktur seluler di lapisan epidermis. Kerusakan jaringan permanen akibat paparan panas langsung, sel-sel tampak eosinofilik (pewarnaan merah muda cerah), dan nukleus menghilang (kariolisis). Pewarnaan HE menunjukkan tanda-tanda kerusakan epidermis dan dermis seperti pada gambar 5.4 terlampir :



Gambar 5.5. Validasi model luka bakar derajat dua. (A) Kelompok tikus sehat, (B) Kelompok tikus luka bakar derajat dua, (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 dua menunjukkan hilangnya lapisan epidermis, kerusakan bagian dermis dan nekrosis di bagian epidermal.

5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi Gen FGF-1

Hasil analisis rata-rata ekspresi gen FGF-1 pada masing-masing kelompok subjek penelitian ditunjukkan pada tabel 5.1 sebagai berikut :

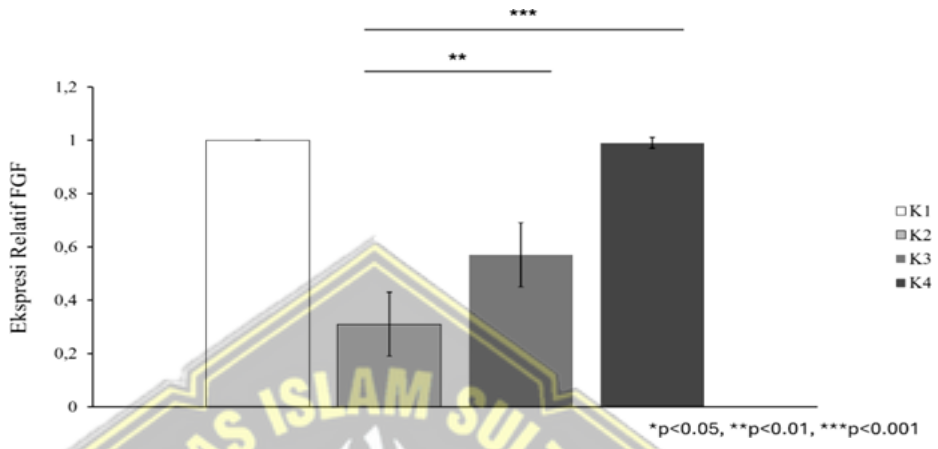
Tabel 5.1. Hasil Uji Deskriptif rata-rata ekspresi gen FGF-1 dan Uji *One Way* Anova

Kelompok	**Kelompok**			
	K2	**K3**	**K4**	**P**
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
Ekspresi FGF-1	0,31±0,12	0,57±0,12	0,99±0,02	
Shapiro wilk	0,932	0,712	0,759	
Lavene test				0,013
Oneway Anova				0,000

Keterangan: * *Shapiro-Wilk* = Normal (p>0,05)
* *Leuvene Test* = Homogen (p>0,05)
* *Oneway* Anova = Signifikan (p<0,05)

Rata-rata ekspresi gen FGF-1 pada kelompok K2 sebesar 0,31 yang merupakan hasil paling rendah pada ekspresi gen FGF-1 dibandingkan

kelompok lainnya. Ekspresi gen FGF-1 lebih tinggi terdapat pada kelompok K3 sebesar 0,57, dan ekspresi gen FGF-1 paling tinggi terdapat pada kelompok K4 sebesar 0,99.



Gambar 5.6. Grafik Rata-rata Ekspresi Gen FGF-1

Berdasarkan tabel 5.1 menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi gen FGF-1 terdistribusi normal (p>0,05) dan memiliki variasi data yang tidak homogen dengan hasil 0,013 (*p*>0,05). Hasil data yang terdistribusi normal dan tidak homogen, dilakukan uji parametrik *One Way* Anova dengan hasil 0,000 (*p*<0,05) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antar semua kelompok perlakuan.

Tabel 5.2. Perbedaan rerata ekspresi gen FGF-1 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane

Kelompok Perbandingan	K2	K3	K4
K2	-	0,009	0,000
K3	0,009	-	0,001
K4	0,000	0,001	-

Keterangan: * Bermakna p<0,05

Perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan, kemudian dilakukan uji post hoc Tamhane terhadap ekspresi gen FGF-1

menunjukkan perbedaan bermakna kelompok K2 dibandingkan K3, perbedaan bermakna kelompok K2 dibandingkan K4, perbedaan bermakna kelompok K3 dengan K4. Pemberian injeksi *subcutan exosome* dosis 200 uL terhadap luka bakar derajat dua memberikan pengaruh paling tinggi terhadap ekspresi gen FGF-1.

5.1.4. Hasil Pemeriksaan Ekspresi Gen SDF-1

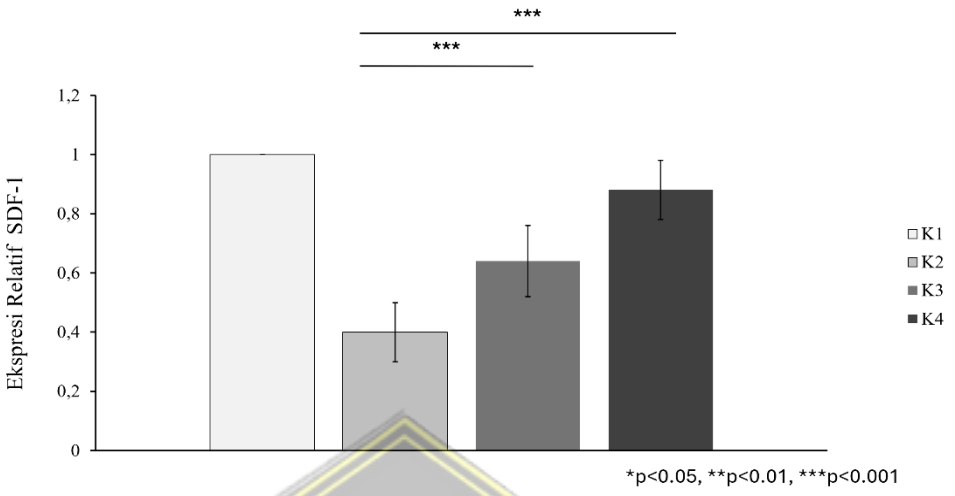
Hasil uji dan analisis rerata ekspresi gen SDF-1 setelah perlakuan pada masing-masing kelompok subjek penelitian ditunjukkan pada tabel 5.3 sebagai berikut :

Tabel 5.3. Hasil Uji Deskriptif rata-rata ekspresi gen SDF-1 dan Uji *One Way* Anova tiap kelompok

Kelompok	**Kelompok**			
	K2	**K3**	**K4**	**P**
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
Ekspresi SDF-1	0,40±0,10	0,64±0,12	0,88±0,10	
Shapiro wilk	0,893	0,155	0,204	
Lavene test				0,957
One way Anova				0,000

Keterangan: * *Shapiro-Wilk* = Normal (p>0,05)
* *Leuvene Test* = Homogen (p>0,05)
* *One way* Anova = Signifikan (p<0,05)

Rata-rata ekspresi gen SDF-1 pada kelompok K2 sebesar 0,40 yang merupakan hasil terendah dibandingkan kelompok lainnya. Ekspresi gen SDF-1 lebih tinggi pada kelompok K4 sebesar 0,88, jika dibandingkan dengan ekspresi gen SDF-1 pada kelompok K3 sebesar 0,64.



Gambar 5.7. Grafik rata-rata ekspresi gen SDF-1

Berdasarkan tabel 5.3 Rata-rata ekspresi gen SDF-1 pada semua kelompok terdistribusi normal (p>0,05) dan memiliki variasi data yang homogen dengan hasil 0,957 (p>0,05). Hasil data yang terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji parametrik *one way* anova dengan hasil 0,000 (<0,05) menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antar semua kelompok perlakuan.

Perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan, kemudian dilakukan uji post hoc LSD untuk mengetahui perbedaan bermakna antar dua kelompok seperti pada tabel 5.4 berikut :

Tabel 5.4. Perbedaan rerata ekspresi gen SDF-1 antar dua kelompok dengan Uji post hoc LSD

Kelompok Perbandingan	K2	K3	K4
K2	-	0,001	0,000
K3	0,001	-	0,002
K4	0,000	0,002	-

Keterangan: * Bermakna p<0,05

Hasil uji post hoc LSD menunjukkan perbedaan bermakna kelompok K4 dibandingkan K2, perbedaan bermakna kelompok K4 dibandingkan K3, perbedaan bermakna kelompok K4 dengan K3. Pemberian injeksi *subcutan exosome* dosis 200 uL terhadap luka bakar derajat dua memberikan pengaruh paling tinggi terhadap ekspresi gen SDF-1.

5.2. Pembahasan

Luka bakar derajat dua melibatkan epidermis dan sebagian dermis yang memicu serangkaian proses inflamasi, regeneratif, dan *remodeling* yang kompleks. Ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 memainkan peran penting dalam proses penyembuhan luka, terutama dalam angiogenesis, rekrutmen sel-sel progenitor, dan regenerasi jaringan.

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 lebih tinggi dengan pemberian eksosom MSC pada dosis 200 µL pada tikus model luka bakar derajat dua. Pemberian eksosom MSC secara signifikan meningkatkan ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 di jaringan luka bakar derajat dua. Proliferasi dan diferensiasi sel endotel yang diperkuat oleh FGF-1 memperbaiki vaskularisasi di area luka. Sejalan dengan beberapa hasil penelitian, bahwa FGF berperan dalam perbaikan dan regenerasi jaringan serta menyoroti interaksi antara FGF dan molekul pemberi sinyal penting lainnya.[42] Protein FGF adalah mitogen kuat yang berperan dalam pertumbuhan normal dan penyembuhan luka. Di antara protein-protein ini, bFGF berperan dalam proliferasi sel epitel dan fungsi dalam angiogenesis.[43]

FGF1 adalah anggota keluarga FGF yang terkenal dan memiliki ciri struktural yang baik dengan struktur, reseptor pengikatan, dan fungsi fisiologis yang mirip dengan bFGF. FGF1, FGF7, dan FGF10 adalah tiga protein FGF lain yang berperan dalam penyembuhan luka.[42]

FGF berperan penting dalam berbagai macam fungsi seluler, termasuk proliferasi sel, kelangsungan hidup, metabolisme, morfogenesis, dan diferensiasi, serta dalam perbaikan dan regenerasi jaringan.[42-44] Eksosom MSC menstimulasi ekspresi gen FGF-1 melalui aktivasi jalur MAPK/ERK dan PI3K/AKT, yang mempercepat proliferasi fibroblas dan keratinosit. Meningkatkan ekspresi gen SDF-1, yang bekerja melalui reseptor CXCR4 untuk menarik EPCs dan memperbaiki pembuluh darah yang rusak, menghambat sitokin pro-inflamasi (seperti IL-6 dan TNF-α), menciptakan lingkungan yang kondusif untuk penyembuhan.

Peningkatan SDF-1 merekrut sel progenitor endotelial ke lokasi luka melalui aktivasi reseptor CXCR4. Interaksi SDF-1/CXCR4 meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru. SDF-1 memperkuat efek angiogenik dari FGF-1 dengan menyediakan sel pendukung vaskular. [19,27–29] SDF-1 membantu dalam regenerasi jaringan yang rusak, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), dan mempercepat epitelisasi. SDF-1 juga bekerja sinergis dengan faktor pertumbuhan lain seperti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) untuk memperkuat angiogenesis dan perbaikan jaringan. Secara keseluruhan, jalur yang melibatkan SDF-1 sangat penting dalam penyembuhan luka bakar derajat dua, dengan mengkoordinasikan

berbagai respon seluler yang mendukung regenerasi dan perbaikan jaringan yang rusak. [19,27–29]

Hipoksia pada luka bakar diatasi dengan peningkatan HIF-1α, yang selanjutnya menstimulasi ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1. Eksosom MSC memperkuat jalur ini dengan menyediakan miRNA yang meningkatkan stabilitas HIF-1α. FGF-1 dan SDF-1 mengaktifkan jalur ini untuk meningkatkan proliferasi fibroblas, migrasi keratinosit, dan kelangsungan hidup sel di area luka, aktivasi CXCR4 oleh SDF-1 meningkatkan migrasi EPCs dan sel imun yang berkontribusi pada perbaikan jaringan.

Pemberian eksosom MSC pada luka bakar meningkatkan ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1, yang berperan penting dalam angiogenesis, rekrutmen sel progenitor, dan regenerasi jaringan. Jalur sinyal utama yang terlibat, termasuk HIF-1α, MAPK/ERK, dan PI3K/AKT, memungkinkan penyembuhan luka yang lebih cepat dan efisien, membuka peluang besar untuk terapi regeneratif berbasis eksosom pada luka bakar dan kondisi lainnya.

Eksosom MSC berpotensi menjadi terapi non-invasif untuk luka bakar derajat dua, dengan kemampuan meningkatkan angiogenesis dan regenerasi jaringan. Eksosom MSC dapat mempercepat penyembuhan, mengurangi risiko infeksi, dan meminimalkan pembentukan jaringan parut. Efek modulasi eksosom MSC dapat diterapkan pada berbagai jenis luka kulit kronis.

Penelitian ini membuktikan bahwa penggunaan Eksosom MSC meningkatkan kadar FGF yang mempercepat penyembuhan luka, mendorong penyembuhan luka dan *remodeling* jaringan.[44] FGF mempercepat proses perbaikan jaringan dan regenerasi jaringan.[42]

Pemberian eksosom MSC menjadi pendekatan terapi regeneratif yang menjanjikan, terutama dalam meningkatkan penyembuhan luka melalui modulasi ekspresi gen kunci seperti FGF-1 dan SDF-1. Vesikel kecil yang mengandung berbagai molekul bioaktif, termasuk RNA, protein, dan lipid. Eksosom ini berperan sebagai mediator parakrin yang memfasilitasi komunikasi antar sel, termasuk memodulasi lingkungan mikro luka.[8–10]

Penelitian selanjutnya dapat melakukan penambahan variasi dosis *exosome* lebih besar, melihat ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 lebih tinggi dengan pemberian eksosom MSC pada dosis 200 µL dibandingkan dengan dosis 100 µL. Pengujian lebih spesifik dapat dilakukan terhadap parameter lainnya sebelum melanjutkan ke uji klinis.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

6.1.1. Pemberian *Exosome* MSC berpengaruh terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar yang mengalami luka bakar derajat dua.

6.1.2. Terdapat perbedaan ekspresi gen FGF-1 lebih tinggi pada tikus jantan galur Wistar dengan luka bakar derajat dua yang diberikan E-MSC 100 uL dan 200 uL dibandingkan dengan kontrol.

6.1.3. Terdapat perbedaan ekspresi gen SDF-1 pada tikus jantan galur Wistar dengan luka bakar derajat dua yang diberikan E-MSC 100 uL dan 200 uL dibandingkan dengan kontrol.

6.2. Saran

6.2.1. Penelitian berikutnya dengan mencoba menaikkan dosis *Exosome* MSC lebih dari 200 µL untuk melihat pengaruh terhadap ekspresi gen FGF-1 dan SDF-1 untuk mendapatkan dosis paling optimal.

6.2.2. Melanjutkan penelitian ke tahap uji klinis terhadap aplikasi *Exosome* pada luka bakar derajat dua.

DAFTAR PUSTAKA

1. 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.

2. Żwierełło 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. Rajesh A, Ju EDE, Oxford KA, Harman RM, Van de Walle GR. The mesenchymal stromal cell secretome promotes tissue regeneration and increases macrophage infiltration in acute and methicillin-resistant Staphylococcus aureus infected skin wounds in vivo.*Cytotherapy*. 2024;26(11):1400-1410. doi:10.1016/j.jcyt.2024.06.007.

4. 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.

5. Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine*. Published online 2016. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.030.

6. Kudinov VA, Artyushev RI, Zurina IM, et al. Antimicrobial and regenerative effects of placental multipotent mesenchymal stromal cell secretome-based chitosan gel on infected burns in rats. *Pharmaceuticals*. 2021;14(12). doi:10.3390/ph14121263.

7. Zhu Z, Zhang X, Hao H, et al.Exosomes Derived From Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Treat Cutaneous Nerve Damage and Promote Wound Healing. Front Cell Neurosci. 2022;16.doi:10.3389/fncel.2022.913009.

8. 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.

9. Mossahebi-Mohammadi M, Quan M, Zhang JS, Li X. FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00079.

10. Wielgosz Z, Bartusik-Aebisher D, Aebisher D. Fibroblast growth factor (FGF). In: *The Biochemical Guide to Proteins*. ; 2023:111-115. doi:10.1016/b0-12-475570-4/00484-4.

11. Karimi M, Maghsoud Z, Halabian R. Effect of Preconditioned Mesenchymal Stem Cells with Nisin Prebiotic on the Expression of Wound Healing Factors Such as TGF-β1, FGF-2, IL-1, IL-6, and IL-10. *Regen Eng Transl Med*. 2021;7(1):30-40. doi:10.1007/S40883-021-00194-2/FIGURES/6.

12. 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.

13. Wei L, Al Oustah A, Blader P, Roussigné M. Notch signaling restricts FGF pathway activation in parapineal cells to promote their collective migration. *Elife*. 2019;8. doi:10.7554/eLife.46275.

14. Tang D, He Y, Li W, Li H. Wnt/β-catenin interacts with the FGF pathway to promote proliferation and regenerative cell proliferation in the zebrafish lateral line neuromast. *Exp Mol Med*. 2019;51(5). doi:10.1038/s12276-019-0247-x.

15. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2005;118(19):4495-4509. doi:10.1242/jcs.02553.

16. Yang L, O'Neill P, Martin K, et al. Analysis of FGF-Dependent and FGF-Independent Pathways in Otic Placode Induction. *PLoS One*. 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0055011.

17. Giri B, Dey S, Das T, Sarkar M, Banerjee J, Dash SK. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: an update on glucose toxicity. *Biomedicine {\&} Pharmacotherapy*. 2018;107:306-328.

18. Wajid N, Ali A, Ali F, Latief N, Qazi A. Therapeutic potential of stem cells derived factor-1 alpha (SDF-1α) for skin burn injuries. *Adv Life Sci*. 2019;6(4):139-146.

19. Kato T, Khanh VC, Sato K, et al. SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(2):1010-1017. doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.100.

20. Dimova I, Karthik S, Makanya A, et al. SDF-1/CXCR4 signalling is involved in blood vessel growth and remodelling by intussusception. *J Cell Mol Med*. 2019;23(6):3916-3926. doi:10.1111/jcmm.14269.

21. Zhang H, Li X, Li J, Zhong L, Chen X, Chen S. SDF-1 mediates mesenchymal stem cell recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect.*J Bone Miner Metab*.2021;39(2):126-138. doi:10.1007/s00774-020-01122-0.

22. Chen XY, Shi YX, Huang YP, et al. SDF-1 inhibits the dedifferentiation of islet β cells in hyperglycaemia by up-regulating FoxO1 via binding to CXCR4. *J Cell Mol Med*. 2022;26(3):750-763. doi:10.1111/jcmm.17110.

23. Peng SY, Chuang CC, Hwang YS, Yen CH, Lee CY, Yang SF. Association of SDF-1 and its receptor CXCR4 polymorphisms on the susceptibility of diabetic retinopathy in the Taiwanese population. *Front Genet*. 2023;14. doi:10.3389/fgene.2023.1296773.

24. Ling L, Hou J, Liu D, et al. Important role of the SDF-1/CXCR4 axis in the homing of systemically transplanted human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) to ovaries in rats with chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency (POI).*Stem Cell Res Ther*.2022;13(1). doi:10.1186/s13287-022-02759-6.

25. Adapala NS, Root S, Lorenzo J, Aguila H, Sanjay A. PI3K activation increases SDF-1 production and number of osteoclast precursors, and enhances SDF-1-mediated osteoclast precursor migration. *Bone Rep*. 2019;10. doi:10.1016/j.bonr.2019.100203.

26. Li M, Sun X, Ma L, et al. SDF-1/CXCR4 axis induces human dental pulp stem cell migration through FAK/PI3K/Akt and GSK3β/β-catenin pathways. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/srep40161

27. Jin Q, Giannobile W V. SDF-1 enhances wound healing of critical-sized calvarial defects beyond self-repair capacity.*PLoS One*.2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097035.

28. Yamashita T, Vuong CK, Ngo NH, Osaka M, Hiramatsu Y, Ohneda O. Impairment of HIF-2a Expression Induced the Compensatory Overexpression of the HIF-1a/SDF-1 Axis to Promote Wound Healing. *Stem Cells Dev*. 2023;32(19-20):592-605. doi:10.1089/scd.2023.0114.

29. Guo R, Chai L, Chen L, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015;51(6):578-585. doi:10.1007/s11626-014-9862-y.

30. Frommeyer TC, Gilbert MM, Brittain G V., et al. UVB-Induced Microvesicle Particle Release and Its Effects on the Cutaneous Microenvironment.*Front Immunol*.Published online 2022. doi:10.3389/fimmu.2022.880850.

31. Toh WS, Lai RC, Zhang B, Lim SK. MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(4):843-853. doi:10.1042/BST20180079.

32. Kim JY, Rhim WK, Yoo YI, et al. Defined MSC exosome with high yield and purity to improve regenerative activity.*J Tissue Eng*.2021;12. doi:10.1177/20417314211008626.

33. 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.

34. Kore RA, Henson JC, Hamzah RN, et al. Molecular events in MSC exosome mediated cytoprotection in cardiomyocytes. *Sci Rep*.2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-55694-7.

35. NCT05216562. Efficacy and Safety of EXOSOME-MSC Therapy to Reduce Hyper-inflammation In Moderate COVID-19 Patients. *https://clinicaltrials.gov/show/NCT05216562*. Published online 2022.

36. Zhao Z, Zhang L, Ocansey DKW, Wang B, Mao F. The role of mesenchymal stem cell-derived exosome in epigenetic modifications in inflammatory diseases. *Front Immunol*.2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1166536.

37. Lee BC, Kang I, Yu KR. Therapeutic features and updated clinical trials of mesenchymal stem cell (Msc)-derived exosomes.*J Clin Med*. 2021;10(4):1-18. doi:10.3390/jcm10040711.

38. Novello S, Pellen-Mussi P, Jeanne S. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles as cell-free therapy: Perspectives in periodontal regeneration.*J Periodontal Res*.2021;56(3):433-442. doi:10.1111/JRE.12866.

39. An T, Chen Y, Tu Y, Lin P. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Application and Challenges.*Stemcell Rev Rep*.Published online 2021.doi:10.1007/s12015-020-10014-9.

40. Wang LT, Liu KJ, Sytwu HK, Yen ML, Yen BL. Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: Use of cell-free

products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. Published online 2021. doi:10.1002/SCTM.21-0021.

41. Zhang Y, Bai X, Wang Y, et al. Role for heat shock protein 90α 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.

42. Farooq M, Khan AW, Kim MS, Choi S. The role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in tissue repair and regeneration. *Cells*. 2021;10(11). doi:10.3390/cells10113242.

43. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(1):27-44. doi:10.1038/s41581-018-0078-3.

44. Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(2):105-122. doi:10.1038/s41571-018-0115-y.