

PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI *FIBROBLAST GROWTH FACTOR* (FGF), *CYCLOOXYGENASE-2* (COX2) DAN PERUBAHAN HISTOLOGI JARINGAN KULIT

**(Studi Eksperimental *in Vivo* pada Tikus Wistar
Model Luka Bakar Derajat III)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

**Dewi Fitrianiangrum
MBK.24.23.01.0438**

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI *FIBROBLAST GROWTH FACTOR* (FGF), *CYCLOOXYGENASE-2* (COX2) DAN PERUBAHAN HISTOLOGI JARINGAN KULIT
(Studi Eksperimental *in Vivo* pada Tikus Wistar
Model Luka Bakar Derajat III)**

Disusun oleh :

Dewi Fitrianingrum
MBK.24.23.01.0438

Yang dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 20 Agustus 2025

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

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

Dr. dr. Chodidjah M.Kes
NIK. 210186023

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 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 penerbitan maupun yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 4 Agustus 2025



(Dewi Fitrianingrum)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Dewi Fitrianingrum
Tempat / Tanggal lahir : Boyolali, 08 mei 1989
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK. Jaten, Boyolali : Lulus tahun 1995
2. SDN Jaten, Boyolali : Lulus tahun 2001
3. SMP N1 Simo, Boyolali : Lulus tahun 2004
4. SMA N1 Boyolali : Lulus tahun 2007
5. S1 Fakultas Kedokteran UNISSULA : Lulus tahun 2011
6. Profesi Dokter UNISSULA : Lulus tahun 2013
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2024 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : Capt. Udhi Arifianto, S.SiT, M.Mar
2. Nama Anak : Narendra Atallah Arifianto

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 Pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (Eh-Mscs) Terhadap Ekspresi *Fibroblast Growth Factor* (FGF), Cyclooxygenase-2 (COX2) dan Perubahan Histologi Jaringan Kulit (studi eksperimental *in Vivo* pada tikus wistar model luka bakar derajat III).**

Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) 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 dan selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
4. Dr. dr. Chodidjah selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H, Sp. KF, Prof. Titiek Sumarawati, M.Kes, Dr. dr. Joko W, M.Kes selaku penguji I, II, III yang telah memberikan masukan dan saran selama bimbingan penyusunan 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. Seluruh pegawai dan dokter di laboratorium Stem Cell & Cancer Research (SCCR) dan Animal Model Research Centre Semarang.
8. Kepada suami dan anakku tersayang, terima kasih atas doa, dukungan, dan support selama menyelesaikan penulisan proposal tesis ini.
9. Kepada Ayah dan Ibu, terima kasih perjuangan dan pengorbanannya dalam membesarkan, mendukung, dan mendidik Ananda.
10. 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, 4 Agustus 2025

Penulis

Dewi Fitrianingrum



ABSTRAK

Latar Belakang: Luka bakar derajat III merupakan cedera kulit berat yang ditandai kerusakan seluruh lapisan dermis hingga jaringan subkutan, disertai inflamasi kompleks yang menghambat regenerasi. Exosome yang dihasilkan oleh Mesenchymal Stem Cells (MSC), terutama yang dikondisikan pada lingkungan hipoksia, mengandung biomolekul yang berpotensi mempercepat penyembuhan melalui modulasi ekspresi growth factor dan sitokin. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh pemberian exosome hipoksia-MSC (EH-MSCs) terhadap ekspresi FGF, COX-2, serta perubahan histologi kulit tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model luka bakar derajat III.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain post-test only control group menggunakan rancangan acak lengkap. Sebanyak 30 ekor tikus wistar jantan dibagi menjadi lima kelompok (K1–K5). Luka bakar derajat III dibuat dengan plat besi bersuhu 350 °C selama 10 detik pada dorsal tikus berukuran 2×2 cm. Perlakuan diberikan sesuai kelompok selama 5 hari. Jaringan kulit diambil 24 jam pasca perlakuan terakhir untuk analisis ekspresi FGF dan COX-2 menggunakan qRT-PCR, serta pemeriksaan histologi (HE) dengan mikroskop Olympus CX23 (40× dan 100×). Data dianalisis menggunakan One-Way ANOVA.

Hasil: Rata-rata ekspresi FGF tertinggi ditemukan pada K5 ($2,39 \pm 0,32$) dan K4 ($2,31 \pm 0,17$), sedangkan terendah pada K2 ($0,56 \pm 0,23$). Rata-rata ekspresi COX-2 tertinggi pada K2 ($3,35 \pm 0,40$), diikuti K3 ($2,35 \pm 0,43$), sedangkan terendah pada K1 ($1,02 \pm 0,01$) dan K5 ($1,46 \pm 0,34$). Histologi menunjukkan perbaikan struktur epitel, fibroblas, dan sel radang paling mendekati normal pada EH-MSCs dosis 200 µg.

Kesimpulan: Pemberian EH-MSCs dosis 100 µg dan 200 µg meningkatkan ekspresi FGF serta menurunkan ekspresi COX-2. Secara histologis, dosis 200 µg lebih optimal dalam memperbaiki jaringan kulit luka bakar derajat III.

Kata kunci: Exosome, Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, luka bakar derajat III, FGF, COX-2, histologi kulit

ABSTRACT

Background: Third-degree burns are severe skin injuries characterized by full-thickness dermal destruction extending to subcutaneous tissue, accompanied by complex inflammation that impairs tissue regeneration. Exosomes derived from Mesenchymal Stem Cells (MSCs), particularly those conditioned under hypoxic environments, contain biomolecules with potential to accelerate wound healing through modulation of growth factor and cytokine expression. This study aimed to evaluate the effects of hypoxia-conditioned MSC-derived exosomes (EH-MSCs) on FGF and COX-2 expression, as well as histological changes in the skin of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with third-degree burn injuries.

Methods: An experimental study with a post-test only control group design using a completely randomized design was conducted. Thirty male Wistar rats were divided into five groups (K1–K5). Third-degree burns (2×2 cm) were induced by applying a heated iron plate (350°C) to the dorsal area for 10 seconds. Treatments were administered according to group allocation for five consecutive days. Skin tissue samples were collected 24 hours after the last treatment for analysis of FGF and COX-2 expression using qRT-PCR, and histological examination (HE staining) with Olympus CX23 microscope at $40\times$ and $100\times$ magnification. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The highest mean FGF expression was observed in K5 (2.39 ± 0.32) and K4 (2.31 ± 0.17), while the lowest was in K2 (0.56 ± 0.23). The highest mean COX-2 expression was found in K2 (3.35 ± 0.40), followed by K3 (2.35 ± 0.43), whereas the lowest values were in K1 (1.02 ± 0.01) and K5 (1.46 ± 0.34). Histological evaluation revealed that EH-MSCs at a dose of $200\ \mu\text{g}$ restored epithelial, fibroblast, and inflammatory cell structures close to normal.

Conclusion: Administration of EH-MSCs at doses of $100\ \mu\text{g}$ and $200\ \mu\text{g}$ increased FGF expression and reduced COX-2 expression. Histologically, $200\ \mu\text{g}$ EH-MSCs demonstrated superior efficacy in skin tissue repair of third-degree burn injuries.

Keywords: Exosome, Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, third-degree burn, FGF, COX-2, skin histology

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	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan umum.....	4
1.3.2. Tujuan khusus	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat penelitian.....	7
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	7
1.5.2. Manfaat Praktis	7

BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. <i>Fibblast Growth Factor</i> (FGF).....	9
2.1.1. Definisi.....	9
2.1.2. Peran FGF pada luka bakar.....	9
2.2. Siklooksigenase-2 (COX-2)	10
2.2.1. Definisi.....	10
2.2.2. Peran COX-2 pada penyembuhan luka bakar	11
2.2.3. Peran COX-2 pada <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	11
2.3. Histologi Jaringan Kulit	12
2.4. Luka Bakar	16
2.4.1. Definisi.....	16
2.4.2. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan luka bakar.	16
2.4.3. Etiopatogenesis Luka Bakar	17
2.4.4. Patofisiologi Luka Bakar	18
2.4.5. Klasifikasi Luka Bakar	19
2.5. Luka bakar derajat III.....	21
2.5.1. Gambaran histologis luka bakar derajat III.....	22
2.6. Penyembuhan Luka Bakar	23
2.7. Terapi Standar Untuk Luka Bakar Derajat III Dengan <i>Silver Sulfadiazine</i> (Burnazine).....	27
2.8. Hipoksia	27
2.9. <i>Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cell</i> (EH-MS)	28
2.9.2. Kandungan Exosome MSC.....	28
2.9.3. Metode Isolasi Exosome MSC.....	29

BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	33
3.1. Kerangka Teori.....	33
3.2. Kerangka Konsep	37
3.3. Hipotesis.....	38
BAB IV METODE PENELITIAN	39
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	39
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	40
4.2.1. Variabel penelitian	40
4.2.2. Definisi Operasional	40
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	41
4.4. Teknik Sampling	42
4.5. Besar Sampel.....	43
4.6. Alat dan Bahan.....	44
4.6.1. Alat Penelitian.....	44
4.6.2. Bahan Penelitian	44
4.7. Cara Penelitian	45
4.7.1. <i>Ethical clearance</i>	45
4.7.2. Isolasi MSC.....	45
4.7.3. Isolasi Exosome MSC.....	47
4.7.4. Aklimatisasi Hewan Uji.....	48
4.7.5. Randomisasi Hewan Uji	48
4.7.6. Pembuatan Luka Bakar	49
4.7.7. Pemberian Treatment	49
4.7.8. Koleksi Sampel dan Analisis RT-PCR	49
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian	52

4.9. Analisa Data	52
4.10. Alur Penelitian	54
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	55
5.1. Hasil Penelitian	55
5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC (<i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>).....	56
5.1.2. Hasil Validasi Luka Bakar Derajat III	58
5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi FGF.....	60
5.1.4 Hasil Pemeriksaan Ekspresi COX2	63
5.1.5 Hasil Pemeriksaan Histologi Luka Bakar	65
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	69
5.3. Keterbatasan Penelitian.....	73
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	76
6.1. Kesimpulan	76
6.2. Saran.....	76
DAFTAR PUSTAKA	79
LAMPIRAN.....	88

DAFTAR SINGKATAN

ADP	: Adenosin difosfat
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase-2 Inhibitor</i>
DAMP	: <i>Damage Associate Molecular Pattern</i>
DC	: <i>Dendritic Cells</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E-MSC	: <i>Exosome mesenchymal stem cell</i>
EPC	: <i>Endothelial Progenitor Cells</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated</i>
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
H ₂ O ₂	: Hidrogen peroksida
IGF-1	: <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
I κ B α	: <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor alpha</i>
kDa	: Kilo Dalton
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
RNA	: <i>Micro Ribonucleic Acid</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal stem cells</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NLR	: <i>Neutrophil to Lymphocyte Ratio</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
OH	: <i>Hydroxide</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PGE ₂	: <i>Prostaglandin E2</i>
PAMP	: <i>Pathogen Associate Molecular Pattern</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PEG	: <i>Polyethylene Glycol</i>
PLC γ	: <i>Phospholipase C gamma</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SIRS	: <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and activator of transcription</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TIMPs	: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*
TRPV : *Transient Receptor Potential Vanilloid*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Facto*



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Originalitas Penelitian	5
Tabel 5.1.	Hasil Uji Deskriptif rata-rata ekspresi FGF dan Uji <i>One way Anova</i> pada masing-masing kelompok penelitian	60
Tabel 5.2	Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Tamhane.....	61
Tabel 5.3.	Hasil Uji deskriptif rata-rata ekspresi COX-2 dan <i>One way Anova</i> pada masing-masing kelompok penelitian.....	63
Tabel 5.4.	Uji <i>Post Hoc</i> Tamhane	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Mekanisme infiltrasi penanda proinflamasi ke SSP setelah luka bakar dan bagaimana hal itu dapat menyebabkan kerusakan pada SSP.	11
Gambar 2.2.	Lapisan-lapisan dan apendiks kulit. Diagram lapisan kulit memperlihatkan saling hubung dan lokasi apendiks dermal (folikel rambut, kelenjar keringat, dan kelenjar sebacea).	13
Gambar 2.3..	Lapisan-lapisan epidermis kulit tebal. Sumber: Mescher AL, 2010.....	13
Gambar 2.4.	Kolagen padat.....	15
Gambar 2.5.	Kolagen sedang.....	15
Gambar 2.6.	Kolagen longgar.....	15
Gambar 2.7.	Zona luka bakar.....	18
Gambar 2.8.	Klasifikasi Luka Bakar.....	20
Gambar 2.9.	Makro dan mikroskopis luka bakar derajat tiga.....	22
Gambar 2.10.	Representasi skematis tahapan penyembuhan luka.....	24
Gambar 3.1	Kerangka Teori.....	37
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	37
Gambar 4.1.	Rancangan Penelitian.....	39
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	54
Gambar 5.1.	Morfologi MSC. (A) MSCs Passage 7 konfluensi 80% (Perbesaran 40x). (B) Analisis <i>flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90.....	56
Gambar 5.2.	Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red(A) dan Adiposit pada pewarnaan oil red o(B)	57
Gambar 5.3.	Hasil Analisis Kadar <i>Exosome</i> menggunakan marker CD63 dan CD9	58
Gambar 5.4.	Validasi Luka Bakar Derajat III.....	59
Gambar 5.5.	Histologi Validasi Luka Bakar Derajat III.....	59
Gambar 5.6.	Grafik rata-rata ekspresi gen FGF setiap kelompok perlakuan	62
Gambar 5.7.	Grafik rata-rata ekspresi gen COX2 setiap kelompok perlakuan	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Ijin Etik Penelitian	88
Lampiran 2.	Surat Keterangan Hasil Penelitian.....	89
Lampiran 3.	Dokumentasi.....	92
Lampiran 4.	Statistik Ekspresi FGF dan COX2.....	94
Lampiran 5.	Validasi Microskopis.....	98



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luka bakar merupakan cedera jaringan yang diakibatkan oleh paparan panas, listrik, bahan kimia, atau radiasi yang menyebabkan kerusakan pada kulit dan jaringan di bawahnya. Luka bakar derajat III adalah bentuk cedera paling berat yang melibatkan seluruh lapisan epidermis, dermis, hingga jaringan subkutan, bahkan dapat mencapai otot dan tulang.¹ Cedera ini memicu respon inflamasi sistemik, kehilangan integritas sawar kulit, risiko infeksi tinggi, dan proses penyembuhan yang lambat serta sering kali diikuti jaringan parut yang luas.⁴ Proses penyembuhan luka melibatkan interaksi kompleks antara sel, faktor pertumbuhan, sitokin, dan mediator inflamasi.⁸ Salah satu faktor kunci dalam regenerasi jaringan adalah Fibroblast Growth Factor (FGF), protein yang berperan dalam proliferasi fibroblas, angiogenesis, dan pembentukan matriks ekstraseluler.⁶ Peningkatan FGF mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan re-epitelisasi.³ Sebaliknya, mediator inflamasi seperti Cyclooxygenase-2 (COX-2), meskipun diperlukan pada fase awal inflamasi, bila kadarnya berlebihan atau berlangsung terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan jaringan lebih lanjut, memperburuk inflamasi, dan menghambat proses penyembuhan.²

Urgensi penelitian ini terletak pada kebutuhan akan terapi yang tidak hanya menutup luka secara cepat, tetapi juga mampu memperbaiki struktur jaringan secara fungsional dan estetik. Luka bakar derajat 3, masih menjadi

masalah kesehatan masyarakat yang signifikan, dengan angka kejadian yang cukup tinggi di negara berkembang. Menurut WHO, sekitar 180.000 kematian setiap tahun disebabkan oleh luka bakar, dan sebagian besar terjadi di negara berpenghasilan rendah hingga menengah.³ Menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) dan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, terdapat ribuan kasus luka bakar setiap tahunnya, di Indonesia, prevalensi luka bakar pada tahun 2013 adalah 0,7% dan telah menurun sebesar 1,5% dibandingkan tahun 2008 (2,2%). Papua (2,0%) dan Bangka Belitung (1,4%).⁴⁹ yang sebagian besar terjadi di rumah tangga akibat kecelakaan dengan api terbuka, air panas, minyak panas, atau bahan kimia.² Luka bakar derajat tiga ditandai dengan kerusakan menyeluruh pada epidermis dan dermis serta kemungkinan melibatkan jaringan subkutan. Penyembuhan luka jenis ini sangat kompleks dan memerlukan penanganan intensif, karena kerusakan jaringan yang mendalam menyebabkan hilangnya struktur pendukung untuk regenerasi. Komplikasi seperti infeksi, kontraktur, dan pembentukan jaringan parut juga sering dijumpai. Oleh karena itu, dibutuhkan terapi tambahan yang mampu mempercepat proses penyembuhan luka dan memperbaiki kualitas jaringan yang terbentuk.³

Sejumlah penelitian telah mengungkapkan bahwa exosome MSCs dapat merangsang proliferasi fibroblas, mempercepat epitelisasi luka, serta menurunkan respon inflamasi.⁹ Namun, pemahaman tentang bagaimana EH-MSCs secara spesifik memengaruhi ekspresi Fibroblast Growth Factor (FGF) yang berperan penting dalam proliferasi dan migrasi sel fibroblas serta

angiogenesis dan Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzim yang memediasi proses inflamasi masih sangat terbatas. Mengingat pentingnya keseimbangan antara proliferasi jaringan dan kontrol inflamasi dalam proses penyembuhan luka, maka penelitian ini penting untuk mengetahui bagaimana efek EH-MSCs terhadap ekspresi kedua biomolekul tersebut, khususnya dalam kondisi luka bakar derajat tiga.¹²

Sejumlah penelitian terdahulu telah menunjukkan potensi terapeutik exosome dalam memperbaiki jaringan luka. Exosome MSCs mampu meningkatkan ekspresi faktor pertumbuhan seperti FGF, VEGF, dan TGF- β , serta menekan ekspresi mediator inflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Dalam model hewan, pemberian exosome telah terbukti mempercepat penyembuhan luka kulit dan luka bakar ringan hingga sedang. Sebagai contoh, penelitian oleh Zhang et al. (2015) menunjukkan bahwa exosome MSCs mempercepat penutupan luka dan memperbaiki morfologi jaringan. Penelitian oleh Hu et al. (2020) menunjukkan bahwa EH-MSCs mengandung lebih banyak faktor pro-regeneratif dibandingkan MSCs normoksia. Namun, belum banyak penelitian yang secara spesifik mengevaluasi pengaruh EH-MSCs terhadap ekspresi FGF dan COX-2 pada model luka bakar derajat tiga. Selain itu perubahan histologi jaringan kulit setelah pemberian EH-MSCs menjadi indikator penting dalam menilai kualitas penyembuhan secara structural seperti regenerasi epidermis jaringan granulasi, pembuluh darah baru, dan inflamasi selular.¹³⁻¹⁷ Penelitian ini bermaksud akan membuktikan efek dari *Exosome hypoxia mesenchymal stem cells* (MSCs) terhadap ekspresi

fibroblast growth factor (FGF), *Cyclooksigenase-2* (COX-2) dan perubahan histologi jaringan kulit pada tikus model luka bakar derajat tiga.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi *fibroblast growth factor* (FGF), *Cyclooksigenase-2* (COX-2) dan perubahan histologi jaringan kulit pada tikus model luka bakar derajat III?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum yang ingin dicapai penelitian ini adalah membuktikan pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi *fibroblast growth factor* (FGF), *Cyclooksigenase-2* (COX-2) dan perubahan histologi jaringan kulit pada tikus model luka bakar derajat III.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi *fibroblast growth factor* (FGF) antar kelompok *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB dengan kelompok kontrol pada Tikus model luka bakar derajat III.
- b. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi *Cyclooksigenase-2* (COX-2) antar kelompok *Exosome Hypoxia*

Mesenchymal Stem Cell 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB dengan kelompok kontrol pada Tikus model luka bakar derajat III.

- c. Penelitian ini bertujuan membuktikan bagaimana perubahan histologi jaringan kulit setelah pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* 100 µg/kgBB dan 200 µg/kgBB dengan kelompok kontrol pada Tikus model luka bakar derajat III.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, Tahun	Judul	Variabel Bebas	Hasil
1.	Bayu Tirta, et al 2024	<i>Enhanced Third Degree Burn Wound Healing by Hypoxic Mesenchymal Stem Cells' Secretome: IL-10 Upregulation and TNF-α/PGE2 Suppression</i>	Pemberian sekretom hipoksia yang berasal dari <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSC)	Penelitian menunjukkan bahwa penggunaan HS-MSC mengakibatkan peningkatan terkait dosis pada IL-10, sitokin anti-inflamasi, di samping penurunan yang nyata pada TNF-α dan PGE2, sitokin pro-inflamasi. Efek ini mempercepat proses penyembuhan dengan meningkatkan re-epitelialisasi dan meminimalkan pembentukan jaringan parut.
2.	Ashok Priyadarshi, et al 2023	<i>Effect of combination of photobiomodulation 904 nm superpulsed laser therapy</i>	Terapi fotobiomodulasi (PBMT) dan pemberian ekstrak	Perawatan ganda (PBMT + SBTL-ALE) mempercepat penyembuhan luka bakar tingkat tiga pada tikus, yang dapat

		<i>and Hippophae rhamnoides L. on third-degree burn wound healing</i>	<i>seabuckthorn</i> (SBTL- ALE)	membuka jalan bagi strategi terapi multimode untuk penanganan luka bakar dan perawatan kosmetik kulit.
3.	Rayanne Lisboa Mesquita, et al 2016	<i>Effect of low-intensity therapeutic ultrasound on wound healing in rats subjected to third-degree burns</i>	Pemberian <i>low- intensity therapeutic ultrasound</i> (LITUS)	Tidak ada perbedaan yang tampak di antara lesi kelompok pada hari ke-4. Pada akhir perawatan, penyembuhan luka lebih jelas terlihat pada BTG. Tidak ditemukan perbedaan yang signifikan secara statistik antara BG dan BTG dalam kaitannya dengan parameter yang diukur menggunakan sistem penilaian perubahan histologis dalam penyembuhan luka bakar
4.	Zahra Saremi, et al 2016	<i>The Combined Effects of Nano-Zinc, Nano-Albumin and Honey in Healing Wounds Caused by Third- Degree Burn in Male Mice</i>	Pemberian Nano-Zinc, Nano-Albumin dan Madu	Pada tingkat makroskopis, setelah perawatan luka bakar, penyusutan luka bakar dan pengurangan bekas luka diamati pada kelompok yang diberi madu dan nano-Seng dibandingkan dengan kelompok control dan kelompok yang diberikan perawatan lainnya, studi histologis menunjukkan peningkatan signifikan

pada ketebalan total lapisan dermal dan epidermal kulit pada kelompok eksperimen dibandingkan dengan kelompok lainnya

Berdasarkan kajian beberapa penelitian terdahulu, ditemukan bahwa telah dilakukan penelitian mengenai terapi penyembuhan luka bakar derajat III, namun demikian belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi *fibroblast growth factor* (FGF), *Cyclooksigenase-2* (COX-2) dan perubahan histologi jaringan kulit untuk penyembuhan luka bakar derajat III pada tikus wistar sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah memberikan bukti ilmiah peran *exosome hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap ekspresi FGF, COX-2 dan perubahan histologi jaringan kulit pada Tikus Wistar model luka bakar derajat tiga.

1.5.2. Manfaat Praktis

- a. Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang berguna bagi masyarakat mengenai kegunaan *Exosome hypoxia Mesenchymal Stem Cell* untuk memperbaiki luka bakar derajat tiga.
- b. Bagi praktisi kesehatan, temuan ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan *Exosome hypoxia*

Mesenchymal Stem Cell sebagai agen antiinflamasi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Fibblast Growth Factor (FGF)*

2.1.1. Definisi

Faktor pertumbuhan fibroblast (FGF) merupakan kelompok faktor pertumbuhan yang anggotanya terlibat dalam angiogenesis, penyembuhan luka, dan perkembangan embrio. FGF berperan dalam proses proliferasi dan diferensiasi berbagai sel dan jaringan.²⁵

2.1.2. Peran FGF pada luka bakar

FGF dapat memengaruhi proliferasi banyak sel, termasuk sel endotel, neuron, kondrosit, sel otot polos, melanosit, dan adiposit.²⁵ FGF terlibat dalam berbagai proses biologis, termasuk proliferasi seluler, kelangsungan hidup, metabolisme, morfogenesis, diferensiasi, perkembangan embrio, angiogenesis, perbaikan jaringan, dan regenerasi.

Angiogenesis adalah salah satu pengatur utama penyembuhan luka. Pembuluh darah mengangkut nutrisi, oksigen, dan sel imun yang mempercepat proses penyembuhan luka.²⁶ Kehadiran pembuluh darah yang matang sangat membantu untuk meningkatkan perbaikan jaringan. Baik FGF asam maupun basa (bFGF) terlibat dalam angiogenesis dengan cara tertentu. bFGF telah ditemukan pada tingkat tinggi pada luka akut dan meningkatkan penyembuhan luka dan remodeling jaringan.²⁷ Telah juga dibuktikan oleh penelitian *in vivo* bahwa mengobati luka dengan FGF mempercepat proses

perbaikan jaringan. FGF juga dapat diberikan melalui biomaterial dan polimer yang berbeda untuk perbaikan dan regenerasi jaringan.²⁸⁻³⁰

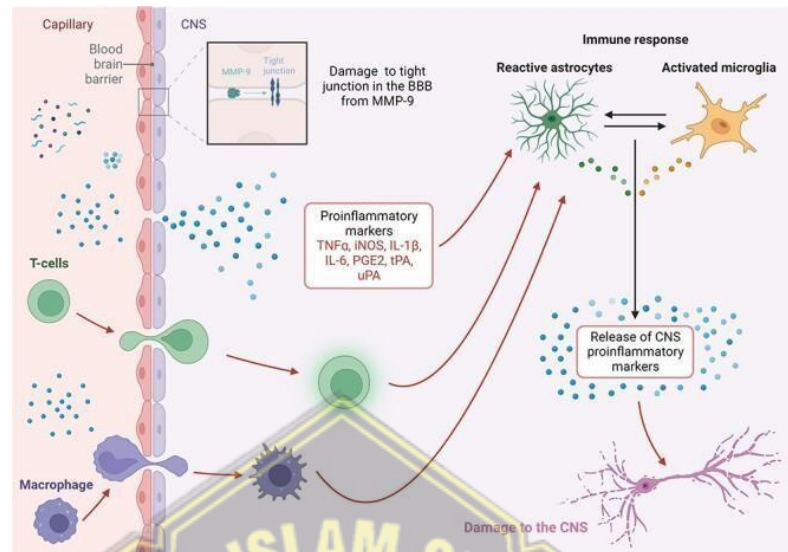
Fibroblast growth factor (FGF) merupakan keluarga besar molekul sekretori yang bekerja melalui reseptor tirosin kinase yang dikenal sebagai reseptor FGF. Mereka memainkan peran penting dalam berbagai fungsi seluler, termasuk proliferasi sel, kelangsungan hidup, metabolisme, morfogenesis, dan diferensiasi, serta dalam perbaikan dan regenerasi jaringan. Jalur pensinyalan yang diatur oleh FGF meliputi RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)–protein kinase B (AKT), phospholipase C gamma (PLC γ), dan signal transducer and activator of transcription (STAT).¹¹

2.2. Siklooksigenase-2 (COX-2)

2.2.1. Definisi

Siklooksigenase (COX) adalah enzim terkait membran yang terletak di retikulum endoplasma atau membran nukleus yang selanjutnya dapat diklasifikasikan menjadi dua isoform, siklooksigenase-1 (COX-1) dan COX-2. COX-1 diekspresikan secara konstitutif di hampir semua jaringan dan sel dan memainkan peran "penjaga rumah" yang penting untuk mempertahankan fisiologi seluler yang teratur.³¹ Namun, COX-2 mempromosikan produksi prostaglandin (PG), yang terlibat dalam respons inflamasi, sebagai respons terhadap beberapa rangsangan, seperti IL-1 β dan TGF- β . COX-2 dapat mengatur respons inflamasi dini, dan produksinya yang terus-menerus dapat menyebabkan penyembuhan luka kronis setelah cedera.³²

2.2.2. Peran COX-2 pada penyembuhan luka bakar



Gambar 2.1. Mekanisme infiltrasi penanda proinflamasi ke SSP setelah luka bakar dan bagaimana hal itu dapat menyebabkan kerusakan pada SSP.⁵⁴

COX-2 adalah enzim yang terlibat dalam sintesis prostaglandin E2 (PGE2), yang berperan dalam respon inflamasi dan proses penyembuhan jaringan. Setelah cedera bakar, ekspresi COX-2 meningkat secara signifikan, yang berkontribusi pada produksi PGE2. PGE2 ini dapat memodulasi aktivitas neutrofil dan makrofag, serta berperan dalam regulasi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α . Misalnya, penelitian pada tikus menunjukkan bahwa setelah luka bakar, ekspresi COX-2 pada neutrofil meningkat dalam waktu 4 jam dan menurun pada 36 jam setelah cedera. Namun, pada kondisi infeksi, ekspresi COX-2 tetap tinggi meskipun telah lewat dari 36 jam pasca cedera.³³

2.2.3. Peran COX-2 pada *Mesenchymal Stem Cell*

COX-2 memainkan peran penting pada sel punca mesenkimal (MSC)

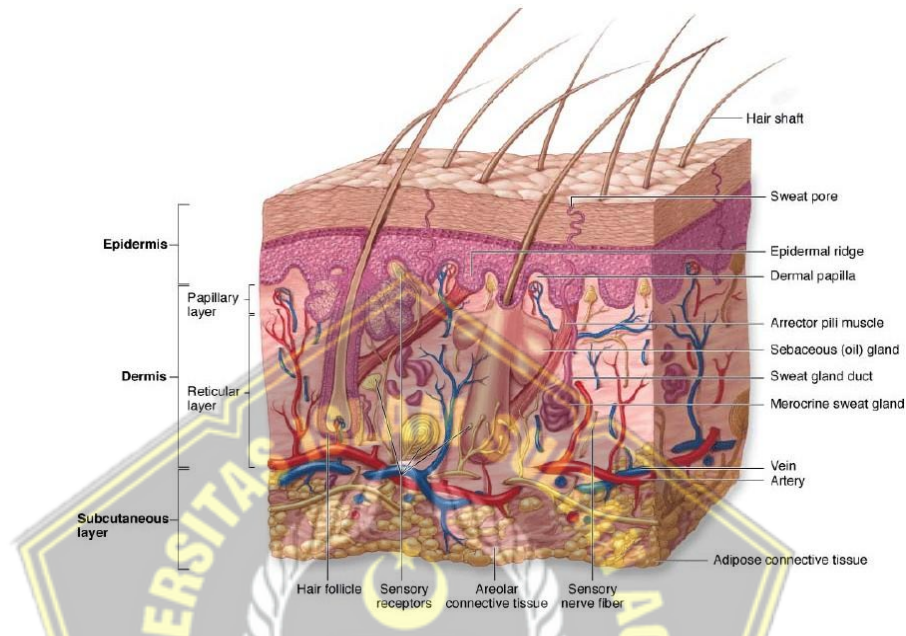
terkait luka bakar. Inhibisi COX-2 dapat meningkatkan engraftment dan diferensiasi MSCs, serta mengurangi ekspresi IL-17A yang dimediasi COX-2, yang pada gilirannya mengurangi infiltrasi makrofag dan ekspresi sitokin pro-inflamasi melalui jalur NF- κ B.³² Selain itu, COX-2 inhibitor seperti celecoxib dapat melindungi MSC dari apoptosis yang disebabkan oleh makrofag yang diaktifkan, serta mendorong diferensiasi MSC menjadi sel mirip keratinosit, yang berkontribusi pada perbaikan jaringan luka bakar. Secara keseluruhan, COX-2 berperan sebagai mediator kunci dalam peradangan dan penyembuhan luka bakar. Inhibisi COX-2 dapat meningkatkan efektivitas terapi MSC dengan mengurangi peradangan dan meningkatkan regenerasi jaringan.³¹

2.3. Histologi Jaringan Kulit

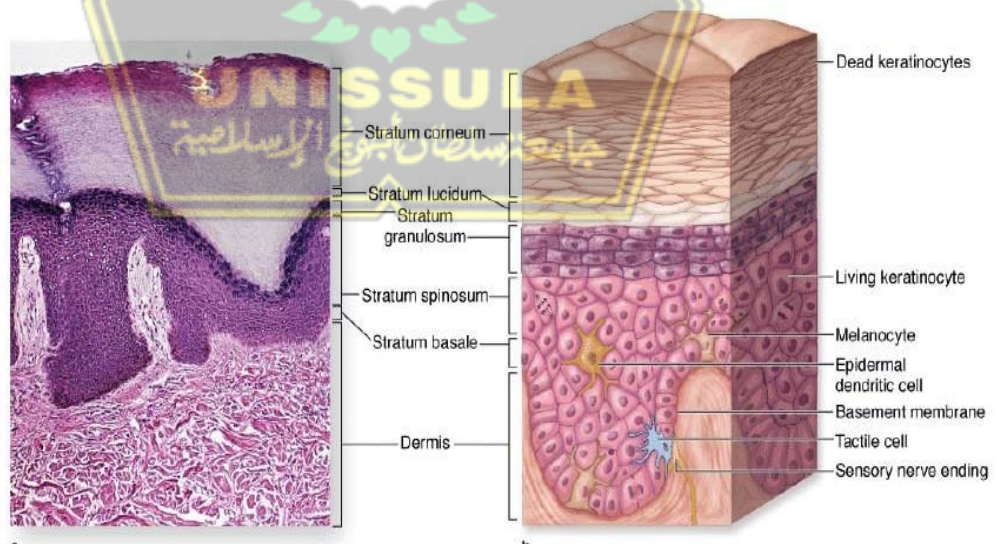
Kulit merupakan organ yang tersusun dari 4 jaringan dasar:

1. Kulit mempunyai berbagai jenis epitel, terutama epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Pembuluh darah pada dermisnya dilapisi oleh endotel. Kelenjar-kelenjar kulit merupakan kelenjar epitelial.
2. Terdapat beberapa jenis jaringan ikat, seperti serat-serat kolagen dan elastin, dan sel-sel lemak pada dermis.
3. Jaringan otot dapat ditemukan pada dermis. Contoh, jaringan otot polos, yaitu otot penegak rambut (*m. arrector pili*) dan pada dinding pembuluh darah, sedangkan jaringan otot bercorak terdapat pada otot-otot ekspresi wajah.

4. Jaringan saraf sebagai reseptor sensoris yang dapat ditemukan pada kulit berupa ujung saraf bebas dan berbagai badan akhir saraf. Contoh, badan Meissner dan badan Pacini.



Gambar 2.2. Lapisan-lapisan dan apendiks kulit. Diagram lapisan kulit memperlihatkan saling hubung dan lokasi apendiks dermal (folikel rambut, kelenjar keringat, dan kelenjar sebacea). Sumber: Mescher AL, 2010.



Gambar 2.3. Lapisan-lapisan epidermis kulit tebal. Sumber: Mescher AL, 2010.

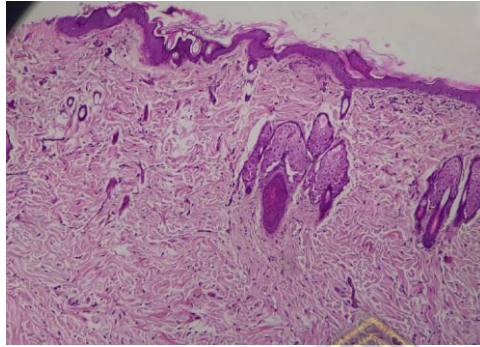
Penyembuhan luka adalah suatu proses dinamik kompleks yang menghasilkan pemulihan terhadap kontinuitas anatomik dan fungsi jaringan setelah terjadi perlukaan. Penyembuhan luka dibagi dalam tiga tahap yang saling berhubungan dan tumpang tindih dalam waktu terjadinya, yaitu: 1) peradangan; 2) pembentukan jaringan (proliferasi); dan 3) *remodeling* jaringan.³⁴⁻³⁵

Salah satu tujuan utama tubuh pada proses perbaikan luka kulit ialah mengembalikan fungsi kulit sebagai sawar fungsional. Reepitelisasi luka kulit dimulai 24 jam setelah luka melalui pergerakan sel-sel epitel dari tepi bebas jaringan melintasi defek dan dari struktur folikel rambut yang masih tersisa pada dasar luka *partial thickness*.

Sel-sel epitel berubah bentuk baik secara internal dan eksternal untuk memudahkan pergerakan. Metamorfosis selular ini meliputi retraksi tonofilamen intrasel, disolusi desmosom intersel dan hemi-desmosom membran basal, serta pembentukan filamen aktin sitoplasma perifer. Sel-sel epidermis pada tepi luka cenderung kehilangan polaritas apiko-basal dan menjulurkan pseudopodia dari tepi basolateral bebas ke dalam luka.³⁷ Pola pasti dari migrasi epidermis yang mengalami regenerasi ini belum diketahui, tetapi kemungkinan berupa migrasi sel tunggal melintasi permukaan luka dengan mekanisme “lompat-katak” (*leap-frogging*) atau “jejak-traktor” (*tractor tread*).

Gambaran histologi kolagen :

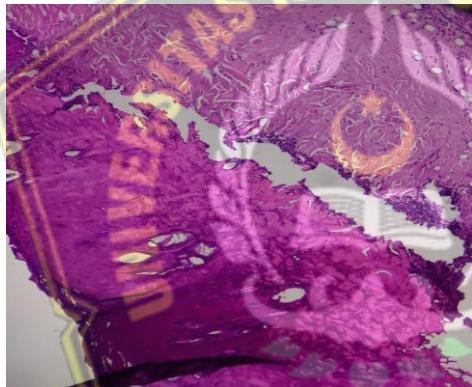
1. Kolagen padat



Epitel utuh, Kolagen sehat,
gambaran merah muda,
Edema tidak ada atau
minimal

Gambar 2.4. Kolagen padat

2. Kolagen sedang



Epitel tidak utuh, Kolagen
longgar,
Jaringan trauma Edema +

Gambar 2.5. Kolagen sedang

3. Kolagen longgar



Hampir tidak terlihat
kolagen atau edema
prominen/ menonjol

Gambar 2.6. Kolagen longgar

2.4. Luka Bakar

2.4.1. Definisi

Luka bakar (*combustio/burn*) adalah cedera (*injury*) sebagai akibat kontak langsung atau terpapar dengan sumber-sumber panas (*thermal*), Listrik (*electrict*), zat kimia (*chemycal*), atau radiasi (*radiation*).¹⁴ Faktor penting lainnya yang secara langsung mempengaruhi tingkat keparahan cedera meliputi lokasi luka bakar, suhu dan waktu paparan sumber panas, dengan efek sinergis di antara semuanya.²

2.4.2. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan luka bakar

a. Luka Bakar Termal

Luka bakar *thermal* (panas) disebabkan oleh karena terpapar atau kontak dengan api, cairan panas atau objek-objek panas lainnya.

b. Luka Bakar Kimia

Luka bakar *chemical* (kimia) disebabkan oleh kontaknya jaringan kulit dengan asam atau basa kuat. Konsentrasi zat kimia, lamanya kontak dan banyaknya jaringan yang terpapar menentukan luasnya injuri karena zat kimia ini. Luka bakar kimia dapat terjadi misalnya karena kontak dengan zat- zat pembersih yang sering dipergunakan untuk keperluan rumah tangga dan berbagai zat kimia yang digunakan dalam bidang industri, pertanian dan militer. Lebih dari 25.000 produk zat kimia diketahui dapat menyebabkan luka bakar kimia.

c. Luka Bakar Elektrik

Luka bakar *electric* (listrik) disebabkan oleh panas yang digerakan dari energi listrik yang dihantarkan melalui tubuh. Berat ringannya luka dipengaruhi oleh lamanya kontak, tingginya voltage dan cara gelombang elektrik itu sampai mengenai tubuh.

d. Luka Bakar Radiasi

Luka bakar *radiation* (radiasi) disebabkan oleh terpapar dengan sumber radioaktif. Tipe injuri ini seringkali berhubungan dengan penggunaan radiasi ion pada industri atau dari sumber radiasi untuk keperluan terapeutik pada dunia kedokteran. Terbakar oleh sinar matahari akibat terpapar yang terlalu lama juga merupakan salah satu tipe luka bakar radiasi.

2.4.3. Etiopatogenesis Luka Bakar

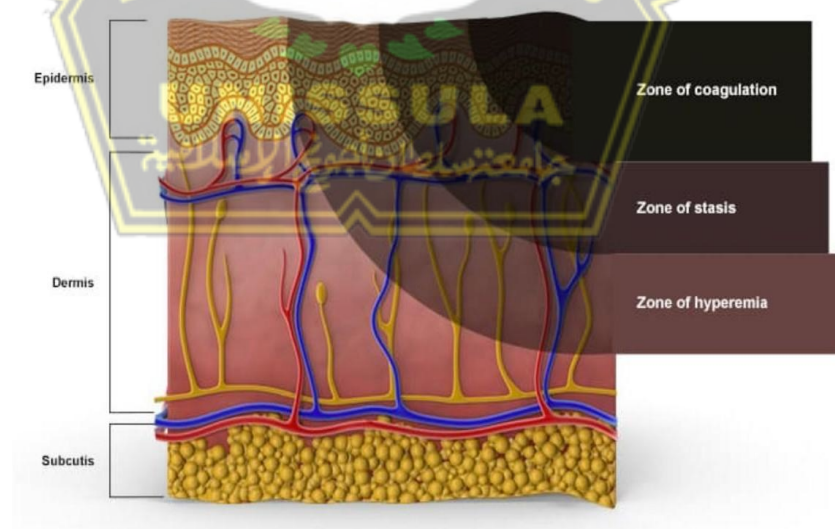
Berdasarkan perjalanan penyakitnya, luka bakar dibagi menjadi fase akut, fase subakut dan fase lanjut. Pada fase akut terjadi gangguan keseimbangan sirkulasi cairan dan elektrolit akibat cedera termis bersifat sistemik yang dapat mengakibatkan terjadinya syok hipovolemik. Fase sub akut berlangsung setelah syok berakhir yang ditandai dengan keadaan hipermetabolisme, infeksi hingga sepsis serta inflamasi dalam bentuk SIRS (*Systemic Inflammatory Respon Syndrome*). Luka terbuka akibat kerusakan jaringan (kulit dan jaringan di bawahnya) menimbulkan inflamasi, sepsis dan penguapan cairan tubuh disertai panas atau energi.¹⁶ Masalah yang terjadi adalah kerusakan atau kehilangan jaringan akibat kontak dengan sumber panas. Luka yang terjadi menyebabkan proses inflamasi dan infeksi, masalah

penutupan luka pada luka telanjang atau tidak berepitel luas dan atau pada struktur atau organ-organ fungsional, dan keadaan hipermetabolisme.^{15,16}

Fase lanjut berlangsung setelah fase subakut hingga pasien sembuh. Penyulit pada fase ini adalah parut yang hipertrofik, keloid gangguan pigmentasi, deformitas dan timbulnya kontraktur.¹⁵

2.4.4. Patofisiologi Luka Bakar

Luka bakar menyebabkan nekrosis koagulatif pada berbagai lapisan kulit dan jaringan di bawahnya. Karena fungsi utamanya sebagai penghalang fisiologis yang melindungi jaringan di bawahnya, kulit biasanya membatasi penyebaran kerusakan ke lapisan yang lebih dalam, tetapi tingkat kerusakan ditentukan oleh suhu, energi yang ditransmisikan oleh agen penyebab, dan durasi paparan. Pada prinsipnya, lokasi luka bakar kulit dapat dibagi menjadi tiga zona:²



Gambar 2.7. Zona luka bakar²⁰

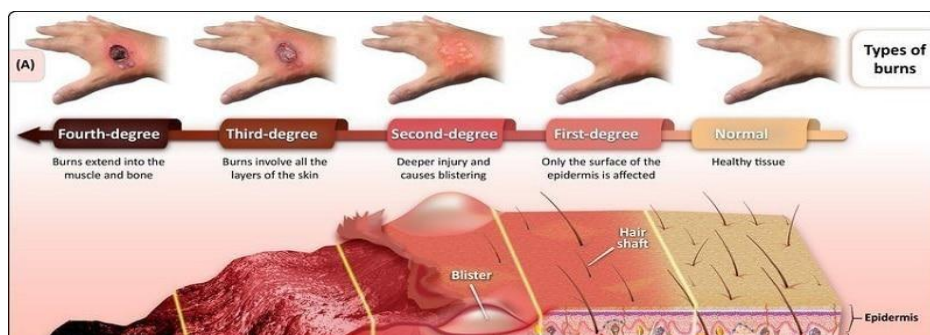
- a. Zona koagulasi, mewakili area nekrosis dengan kerusakan jaringan

ireversibel yang terjadi pada saat cedera

- b. Zona stasis, mengelilingi zona koagulasi dan mengalami kerusakan sedang akibat transudat vaskular, peningkatan faktor vasokonstriktor, serta reaksi inflamasi lokal, yang mengakibatkan gangguan perfusi jaringan. Bergantung pada lingkungan luka, zona tersebut dapat pulih atau berkembang menjadi nekrosis
- c. Zona hiperemia, dengan pembuluh darah yang melebar akibat peradangan. Zona ini ditandai dengan peningkatan aliran darah ke jaringan sehat tanpa banyak risiko nekrosis, kecuali jika terjadi sepsis berat atau hipoperfusi berkepanjangan.

2.4.5. Klasifikasi Luka Bakar

Luka bakar dapat diklasifikasikan menurut sejumlah faktor, termasuk kedalamannya, etiologi, dan persentase luas permukaan tubuh yang terkena.² Untuk menentukan kedalaman luka bakar secara akurat, empat komponen penting harus dievaluasi yaitu tampilan, pucat karena tekanan, nyeri, dan sensasi. Komponen-komponen ini mengklasifikasikan luka bakar ke dalam beberapa tingkatan berdasarkan ketebalannya.¹⁸



Gambar 2.8. Klasifikasi Luka Bakar¹⁷

a. Luka bakar superfisial (*Superficial Burns*)

Luka bakar superfisial (derajat I) hanya melibatkan epidermis. Luka bakar ini bisa berwarna merah muda hingga merah, tanpa lepuh, kering, dan bisa terasa agak nyeri. Luka bakar superfisial sembuh tanpa meninggalkan jaringan parut dalam waktu 5 hingga 10 hari.¹⁹

b. Luka bakar ketebalan sebagian (*Partial-Thickness Burns*)

Luka bakar derajat II, juga dikenal sebagai luka bakar ketebalan parsial superfisial, memengaruhi lapisan superfisial dermis. Lepuh sering terjadi dan mungkin masih utuh saat pertama kali dievaluasi. Setelah lepuh terbuka, dasar luka di bawahnya berwarna merah atau merah muda secara homogen dan akan memucat jika ditekan. Luka bakar ini terasa nyeri. Penyembuhan biasanya terjadi dalam 2 hingga 3 minggu dengan jaringan parut minimal.¹⁹

Luka bakar parsial-ketebalan yang dalam melibatkan dermis retikuler yang lebih dalam. Mirip dengan luka bakar parsial-ketebalan yang dangkal, luka bakar ini juga dapat muncul dengan lepuh yang utuh.

Setelah lepuh dibersihkan, dasar luka yang mendasarinya akan berbintik-bintik dan akan perlahan memucat dengan tekanan. Pasien dengan luka bakar parsial- ketebalan mengalami nyeri minimal, yang mungkin hanya muncul dengan tekanan yang dalam. Luka bakar ini dapat sembuh tanpa operasi, tetapi membutuhkan waktu lebih lama, dan jaringan parut tidak dapat dihindari.¹⁹

c. Luka bakar ketebalan penuh (*Full-Thickness Burns*)

Luka bakar derajat III, yang juga dikenal sebagai luka bakar menyeluruh, adalah luka bakar yang paling parah dan memengaruhi lapisan kulit epidermis dan dermis. Luka bakar ini juga meluas hingga ke jaringan subkutan. Luka bakar ini menyebabkan kulit tampak kasar, kaku, dan kering. Pada kedalaman ini, area yang terkena tidak memucat karena tekanan akibat suplai darah yang terganggu. Saraf pada kedalaman ini juga rusak, sehingga pasien tidak merasakan sensasi atau nyeri. Luka bakar ini membutuhkan waktu lebih dari 8 minggu untuk sembuh dan memerlukan perawatan bedah.¹⁹

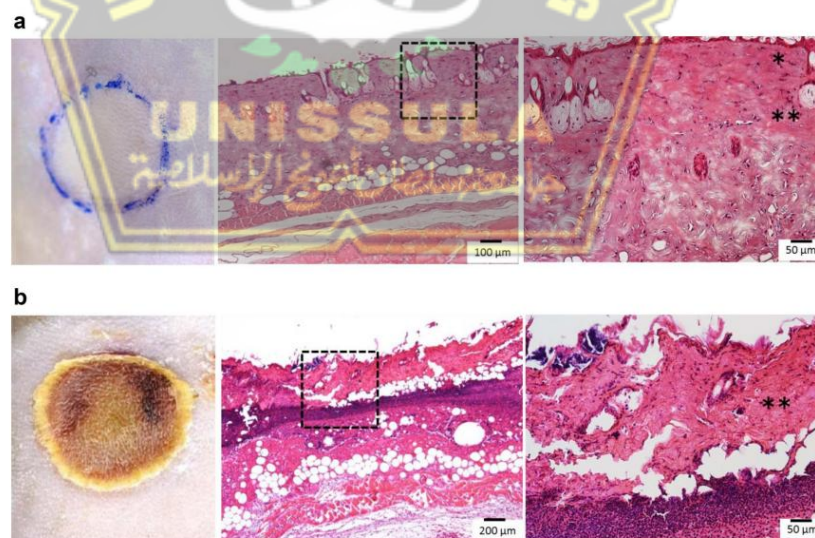
d. Luka bakar meluas ke jaringan yang lebih dalam (*Charring Injury*)

Didefinisikan sebagai luka bakar derajat IV dan biasanya berwarna hitam dan seringkali mengakibatkan hilangnya jaringan yang terbakar, terjadi kerusakan seluruh kulit dan jaringan subkutan begitu juga pada tulang akan gosong.²

2.5. Luka bakar derajat III

Luka bakar derajat III meliputi destruksi total epidermis serta lapisan dermis dan jaringan yang ada di bawahnya. Warna luka bakar sangat bervariasi mulai dari warna putih hingga merah, coklat atau hitam. Daerah yang terbakar tidak terasa nyeri karena serabut sarafnya telah hancur.⁶² Selain itu, luka bakar derajat III juga ditandai dengan adanya eskar.⁶³ Eskar merupakan sel-sel kulit mati yang mengelupas dan menutupi jaringan luka. Eskar yang tetap dipertahankan akan menghambat penyembuhan luka, pertumbuhan sel-sel yang baru, membuat bagian disekitar luka kehilangan protein dan membuat obat yang diberikan menjadi tidak efektif. Eskar memperlambat proses penyembuhan luka dikarenakan tidak terjadi epitelisasi secara spontan.⁶⁴ Berdasarkan alasan tersebut eskar harus dihilangkan atau dikelupas agar terjadi proses penyembuhan luka.⁶⁵

2.5.1 Gambaran histologis luka bakar derajat III⁶⁶



Gambar 2.9. Makro dan mikroskopis luka bakar derajat tiga.⁶⁶

- a. Foto diambil segera setelah luka bakar tingkat tiga.

Kiri: foto lokasi luka di mana kulit yang terluka berubah menjadi putih. Tengah dan kanan: histologi area yang terluka. Lapisan epitelnya halus dan dermisnya seperti hialin. Gambar kanan menunjukkan pembesaran bingkai putus-putus memanjang di foto Tengah. Foto sebelah kanan menunjukkan edema jaringan, nekrosis, dan beberapa kehilangan pada epidermis; serat kolagen sulit dibedakan dari setiap serat karena degenerasi mirip hialin.

- b. Gambar diambil 7 hari setelah luka bakar derajat tiga.

Kiri: bagian yang cedera ditutupi koreng. Tengah dan kanan: histologi area yang cedera. Area nekrosis pada dermis membesar. Gambar kanan menunjukkan pembesaran bingkai putus-putus memanjang di foto tengah. Tidak ada lapisan epitel yang diamati; sebagian dermis hancur dan serpihan sel telah terkumpul.

2.6. Penyembuhan Luka Bakar

Penyembuhan luka melibatkan sejumlah proses yang berbeda yang harus dilakukan untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Lingkungan yang optimal untuk proses penyembuhan luka yang alami adalah lingkungan hangat, lembab dan tidak beracun. Proses penyembuhan luka dibagi dalam tiga fase yaitu fase inflamasi, proliferasi dan maturasi atau remodeling yang merupakan perwujudan ulang jaringan. Ketika cedera terjadi, fase awal selalu berupa keluarnya cairan limfatik dan darah. Selama proses inilah hemostasis yang memadai tercapai. Baik jalur koagulasi ekstrinsik maupun intrinsik diaktifkan dan berperan dalam menghentikan kehilangan darah. Agregasi

trombosit mengikuti vasokonstriksi arteri ke lapisan endotel yang rusak. Pelepasan adenosin 5' difosfat (ADP) mengakibatkan penggumpalan trombosit dan memulai proses trombosis. Vasokonstriksi ini merupakan proses jangka pendek yang segera diikuti oleh vasodilatasi, yang memungkinkan masuknya sel darah putih dan lebih banyak trombosit.²¹



Gambar 2.10. Representasi skematis tahapan penyembuhan luka.²⁴

a. Fase inflamasi (*The inflammatory phase*)

Dimulai dengan hemostasis dan kemotaksis. Baik sel darah putih maupun trombosit mempercepat proses inflamasi dengan melepaskan lebih banyak mediator dan sitokin. Selain faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit, faktor-faktor lain mendorong degradasi kolagen, transformasi fibroblas, pertumbuhan pembuluh darah baru, dan re-epitPCRsi. Semua proses tersebut terjadi pada saat yang sama tetapi secara tersinkronisasi. Mediator seperti serotonin dan histamin dilepaskan dari trombosit dan meningkatkan permeabilitas sel. Faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit menarik fibroblas dan, bersama

dengan faktor pertumbuhan transformasi, meningkatkan pembelahan dan memperbanyak fibroblas. Fibroblas, pada gilirannya, mensintesis kolagen.

Sel-sel inflamasi, seperti neutrofil, monosit, dan sel endotel, menempel pada perancah fibrin yang dibentuk oleh aktivasi trombosit. Neutrofil memungkinkan fagositosis serpihan sel dan bakteri, sehingga memungkinkan dekontaminasi luka.²²

b. Fase proliferasi (*The proliferative*)

Fase proliferasi atau granulasi tidak terjadi pada suatu waktu tertentu, tetapi berlangsung terus-menerus di latar belakang. Pada hari ke-5 hingga ke-7, fibroblas mulai membentuk kolagen dan glikosaminoglikan baru. Proteoglikan ini membentuk inti luka dan membantu menstabilkan luka. Kemudian, reepitelialisasi mulai terjadi dengan migrasi sel dari tepi luka dan tepi yang berdekatan. Awalnya, hanya lapisan tipis sel epitel superfisial yang terbentuk, tetapi lapisan sel yang lebih tebal dan lebih tahan lama akan menjembatani luka seiring waktu. Selanjutnya, neovaskularisasi terjadi melalui angiogenesis, pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh yang ada, dan vaskulogenesis, yang merupakan pembentukan pembuluh darah baru dari sel progenitor endotel *endothelial progenitor cells* (EPC). Setelah serat kolagen terbentuk pada kerangka fibrin, luka mulai matang. Luka juga mulai berkontraksi dan difasilitasi oleh pengendapan fibroblas dan miofibroblas yang berkelanjutan.²¹

c. Fase pematangan (*The maturational or remodeling*)

Fase pematangan atau remodeling dimulai sekitar minggu ke-3

dan dapat berlangsung hingga 12 bulan. Kolagen yang berlebih akan terdegradasi, dan kontraksi luka juga akan mencapai puncaknya sekitar minggu ke-3. Kontraksi luka terjadi jauh lebih besar pada penyembuhan sekunder dibandingkan penyembuhan primer. Kekuatan tarik maksimal luka sayatan terjadi setelah sekitar 11 hingga 14 minggu. Bekas luka yang dihasilkan tidak akan pernah memiliki kekuatan 100% dari kekuatan awal luka dan hanya sekitar 80% dari kekuatan tarik.²³

2.6.1. Peran Keseimbangan Kelembapan dalam Penyembuhan Luka

Dalam proses penyembuhan luka, sangat penting untuk menciptakan lingkungan yang lembap, hal tersebut akan mempercepat penyembuhan luka secara signifikan. Namun apabila sebaliknya yaitu ketika kelembapan berlebihan dalam kasus luka bakar dapat menyebabkan maserasi kulit di sekitar area luka. Di sisi lain, merawat luka dalam kondisi kering dapat menghambat proliferasi sel dan kolagen. Pendekatan perawatan luka yang berfokus pada menjaga tingkat kelembapan yang seimbang disebut sebagai pembalutan modern (*modern dressing*) Salah satu metode yang efektif untuk memastikan lingkungan luka yang lembap adalah penggunaan pembalutan primer, yang mematuhi prinsip pembalutan modern (*moisture balance*).⁵ Perawatan luka dalam keadaan lembap akan memicu percepatan fibrinolisis, mempercepat angiogenesis, menurunkan risiko infeksi, memicu percepatan pembentukan *growth factor*, dan mempercepat pembentukan sel aktif. Penyembuhan luka terbentuk dalam beberapa fase yaitu respon vaskular, inflamasi, proliferasi, pemulihan jaringan, dan diakhiri dengan fase

remodeling.⁶ Namun, ada beberapa faktor yang juga dapat membuat penyembuhan luka menjadi terhambat antara lain: sistem imun, usia, stres, dan beberapa jenis penyakit.⁷

2.7. Terapi Standar Untuk Luka Bakar Derajat III Dengan *Silver Sulfadiazine* (Burnazine®)

Sulfadiazine perak topikal (SSD) merupakan terapi antimikroba efektif yang digunakan untuk mencegah infeksi luka bakar dan mempercepat penyembuhan. Silver sulphadiazine (SSD 1%), hingga saat ini, diperkenalkan oleh Charles Fox Jr. Memiliki efek antibakteri yang kuat, meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pasien luka bakar parah dan dilaporkan kurang kaustik dibandingkan dengan perak nitrat. Silver sulphadiazine masih sering disebut sebagai '*the gold standard*' dalam pengobatan luka bakar ketebalan parsial karena sifat antibakterinya yang sangat baik dan ketersediaannya yang luas. Keberhasilan SSD yang meluas terletak pada cara kerjanya. Perak mengikat asam amino, dinding sel bakteri, DNA dan mengganggu rantai pernapasan. Situs target yang berbeda ini menghasilkan efek antibakteri yang luas dan tingkat resistensi yang rendah. Sulphadiazine adalah antibiotik sulfonamida yang tidak benar-benar bertindak di sini sebagai agen antibakteri, tetapi dalam SSD telah dilaporkan menunjukkan efek sinergis spesifik dalam kombinasi dengan Ekspresi perak 'subinhibitor'.⁶⁷

2.8. Hipoksia

Hipoksia merupakan kondisi dimana tidak terdapat pasokan oksigen ke jaringan, dampak negatif dari berbagai tipe sel yang terpapar hipoksia yang

berkepanjangan dapat menyebabkan apoptosis sel. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa lingkungan hipoksia dapat mengakibatkan adhesi, proliferasi, dan pembaharuan dari MSCs. Lingkungan hipoksia menyebabkan sintesis molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF), yang membantu MSCs memproduksi lebih banyak sitokin.

2.9. *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC)

2.9.1. Definisi

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) adalah vesikel ekstraseluler berukuran 30-150 nm yang berperan dalam komunikasi antar sel. Mereka memiliki marker permukaan spesifik seperti CD63, CD81, dan CD9, yang digunakan untuk identifikasi dan isolasi. *Exosome* dibagi berdasarkan ukuran menjadi tiga jenis utama: small *exosome* (30-50 nm), medium *exosome* (50-100 nm), dan large *exosome* (100-150 nm). *Exosome* MSC mengandung berbagai molekul bioaktif seperti miRNA, protein, dan lipida yang berkontribusi pada regenerasi jaringan, anti-inflamasi, dan modulasi imun, menjadikannya potensi besar dalam terapi medis.³⁴⁻³⁶

2.9.2. Kandungan *Exosome* MSC

Exosome dari *mesenchymal stem cell* (MSC) mengandung berbagai molekul bioaktif yang memainkan peran penting dalam mengatasi luka bakar. Berikut adalah beberapa komponen utama dari *exosome* MSC yang berkontribusi dalam mengatasi luka bakar:

a. miRNA (MicroRNA)

Exosome MSC mengandung sejumlah miRNA yang diketahui mengatur ekspresi gen dan memiliki peran penting dalam pertumbuhan

dan diferensiasi sel.^{39,40}

b. Protein dan Enzim

Exosome MSC mengandung berbagai protein dan enzim yang mendukung regenerasi jaringan dan pertumbuhan sel.^{41,42}

c. Lipida

Komponen lipida dalam *exosome* MSC juga memainkan peran dalam memodulasi respon seluler dan menjaga integritas membran sel. Lipida seperti *ceramide* dan *sphingomyelin* dapat berperan dalam proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan.⁴³

d. *Cytokine dan Growth Factors*

Exosome MSC mengandung berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan seperti PDGF, VEGF, dan IGF-1 yang berperan dalam angiogenesis, proliferasi sel, dan penyembuhan luka.^{44,45}

2.9.3. Metode Isolasi *Exosome* MSC

Isolasi *exosome* dari *mesenchymal stem cell* (MSC) dari medium kultur adalah proses penting untuk mempelajari fungsi dan aplikasi terapinya. Beberapa metode isolasi telah dikembangkan untuk memastikan kemurnian dan integritas *exosome* yang diisolasi. Berikut adalah beberapa metode yang umum digunakan:

a. Ultrasentrifugasi Diferensial

Metode ini adalah yang paling umum digunakan untuk isolasi *exosome*. Proses ini melibatkan beberapa tahap centrifugasi pada

kecepatan yang berbeda untuk menghilangkan sel, debris seluler, dan partikel-partikel yang lebih besar.

Pertama, medium kultur disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk menghilangkan sel-sel dan debris besar. Supernatan kemudian disentrifugasi pada kecepatan lebih tinggi untuk mengendapkan mikrovesikel dan partikel yang lebih besar dari exosome. Akhirnya, supernatan disentrifugasi pada kecepatan sangat tinggi (100,000-120,000 x g) untuk mengendapkan *exosome*. *Pellet exosome* kemudian dicuci dan disentrifugasi ulang untuk meningkatkan kemurnian.⁴⁶

b. *Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells In Scalable Microcarrier- Based Threedimensional (3D) Culture.*

Metode ini dikombinasi dengan ultracentrifugasi diferensial konvensional, kultur 3D menghasilkan 20 kali lipat lebih banyak eksosom (3D-UC-eksosom) daripada kultur dua dimensi (2D-UC eksosom). *Tangential flow filtration* (TFF) yang dikombinasikan dengan kultur sel punca mesenkimal 3D semakin meningkatkan hasil eksosom (eksosom 3D-TFF) sebanyak 7 kali lipat dibandingkan eksosom 3D-UC. Eksosom 3D-TFF tujuh kali lebih kuat dalam transfer siRNA (*small interfering RNA*) ke neuron dibandingkan dengan eksosom 2D-UC. Kultur 3D berbasis mikrokarrier dan TFF memungkinkan produksi eksosom aktif biologis yang dapat diskalakan dari sel punca mesenkimal.⁶¹

c. Ultrafiltrasi

Metode ini menggunakan membran filter dengan ukuran pori tertentu untuk memisahkan *exosome* berdasarkan ukuran. Medium kultur difiltrasi melalui membran untuk menghilangkan partikel yang lebih besar dan molekul kecil, sementara *exosome* tertahan di membran. Ultrafiltrasi sering digunakan sebagai langkah tambahan setelah ultracentrifugasi untuk meningkatkan kemurnian *exosome*.⁴⁶

d. Kromatografi Afinitas

Metode ini memanfaatkan interaksi spesifik antara molekul di permukaan *exosome* dengan ligan yang terikat pada matriks kromatografi. Antibodi yang spesifik terhadap marker permukaan *exosome* seperti CD63, CD81, dan CD9 sering digunakan. Medium kultur dilewatkan melalui kolom yang mengandung ligan ini, sehingga *exosome* yang mengandung marker permukaan yang sesuai akan terperangkap dan kemudian dielusi.⁴⁶

e. Presipitasi Polimer

Metode ini melibatkan penggunaan polimer, seperti *polyethylene glycol* (PEG), yang menginduksi presipitasi *exosome* dari medium kultur. Polimer ini ditambahkan ke medium kultur dan diinkubasi, kemudian campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah untuk mengendapkan *exosome*. Metode ini relatif cepat dan sederhana, namun bisa menghasilkan eksosom dengan kemurnian yang lebih rendah dibandingkan metode lain.⁴⁶

f. Isolasi Berdasarkan Densitas

Metode ini melibatkan penggunaan gradien densitas, seperti *gradien sucrose* atau *iodixanol*, untuk memisahkan *exosome* berdasarkan densitas mereka. Medium kultur ditempatkan pada gradien densitas dan disentrifugasi pada kecepatan tinggi. *Exosome* akan terpisah pada lapisan yang sesuai dengan densitas mereka, yang kemudian dapat diambil secara terpisah.⁴⁶



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Luka bakar mengaktifkan sel imun dan produksi sitokin yang diatur oleh pola molekuler terkait kerusakan (DAMP). Peran DAMPs dalam dua jenis respons terhadap cedera luka bakar dan syok hemoragik traumatis. Saran untuk penggunaan DAMPs sebagai biomarker untuk kedua kondisi tersebut dilaporkan, serta kemungkinan perannya dalam memodulasi respons imun dan dalam membatasi respons inflamasi yang berlebihan. Sejumlah besar DAMP, atau alarmin telah dijelaskan untuk memulai dan mengabadikan respons inflamasi sistemik pasca-trauma dan/atau noninfeksi.⁷⁰ Segala jenis kejadian traumatik/cedera jaringan yang dipicu oleh trauma mekanis, trauma termal, atau trauma metabolik, seperti yang dipromosikan oleh cedera iskemia/reperfusi, asidosis, dan hipoksia/hipoksemia, memicu pelepasan DAMP.^{13, 70} Respons steril ini berfungsi sebagai strategi pertahanan yang ditujukan untuk mempertahankan dan memulihkan homeostasis. Ketika DAMP dilepaskan di lingkungan ekstraseluler, mereka mampu mengaktifkan imunitas bawaan dan adaptif. Sel imunitas bawaan seperti sel penyaji antigen (APC), sel dendritik (DC), atau neutrofil (PMN) memiliki reseptor pengenalan pola (PRR) yang mampu mengenali DAMP. Setelah aktivasi PRR, PMN, dan APC, produksi sitokin, kemokin, dan faktor terlarut lainnya dimulai.²⁰ Trauma memiliki respon imun terkait cedera yang serupa, di mana

DAMP dilepaskan secara besar- besaran pada cedera muskuloskeletal dan menimbulkan peradangan sistemik yang meluas. Pola molekuler terkait kerusakan (DAMPS) berperan dalam patofisiologi respons inflamasi sistemik pasca cedera yang dimulai segera setelah cedera.^{13, 69, 70} Respons ini terjadi pada pasien trauma, bedah, dan pasien sakit kritis, meskipun pada luka bakar, respons ini memiliki tingkat keparahan dan besarnya yang unik.^{71, 72} DAMP dikeluarkan setelah kerusakan jaringan, dan aktif secara imunologis dan relevan secara klinis.

Sensor adalah reseptor sel (reseptor pengenalan patogen-PPR) yang mengenali DAMP atau PAMP. Yang paling umum dikenal adalah reseptor tol-like-4 (TLR4) yang mengikat LPS dan memulai respons peradangan. Kerusakan yang terkait dengan DAMP yang ada di jaringan yang cedera mengaktifkan sel inflamasi melalui reseptor seperti tol (TLR) dan reseptor seperti NOD (NLR).⁶⁹ Pada luka bakar, DAMP dihasilkan oleh kerusakan jaringan yang dimediasi oleh luka bakar dan dikenali melalui TLR dan reseptor mirip NOD (NLR).⁹ Jalur TLR yang bergantung pada MyD88 mendorong polarisasi M1 dan ekspresi sitokin pro-inflamasi. Reseptor mirip Toll sangat penting dalam regulasi proses polarisasi M1.⁷⁵ Selama proses penyembuhan luka refrakter, fungsi makrofag tidak normal seperti ketidakseimbangan makrofag M1/M2.

Exosom yang berasal dari sel punca mesenkimal (MSC) memiliki beragam fungsi dalam mengatur penyembuhan luka dan peradangan; namun, mekanisme molekuler eksosom yang berasal dari MSC tali pusat manusia

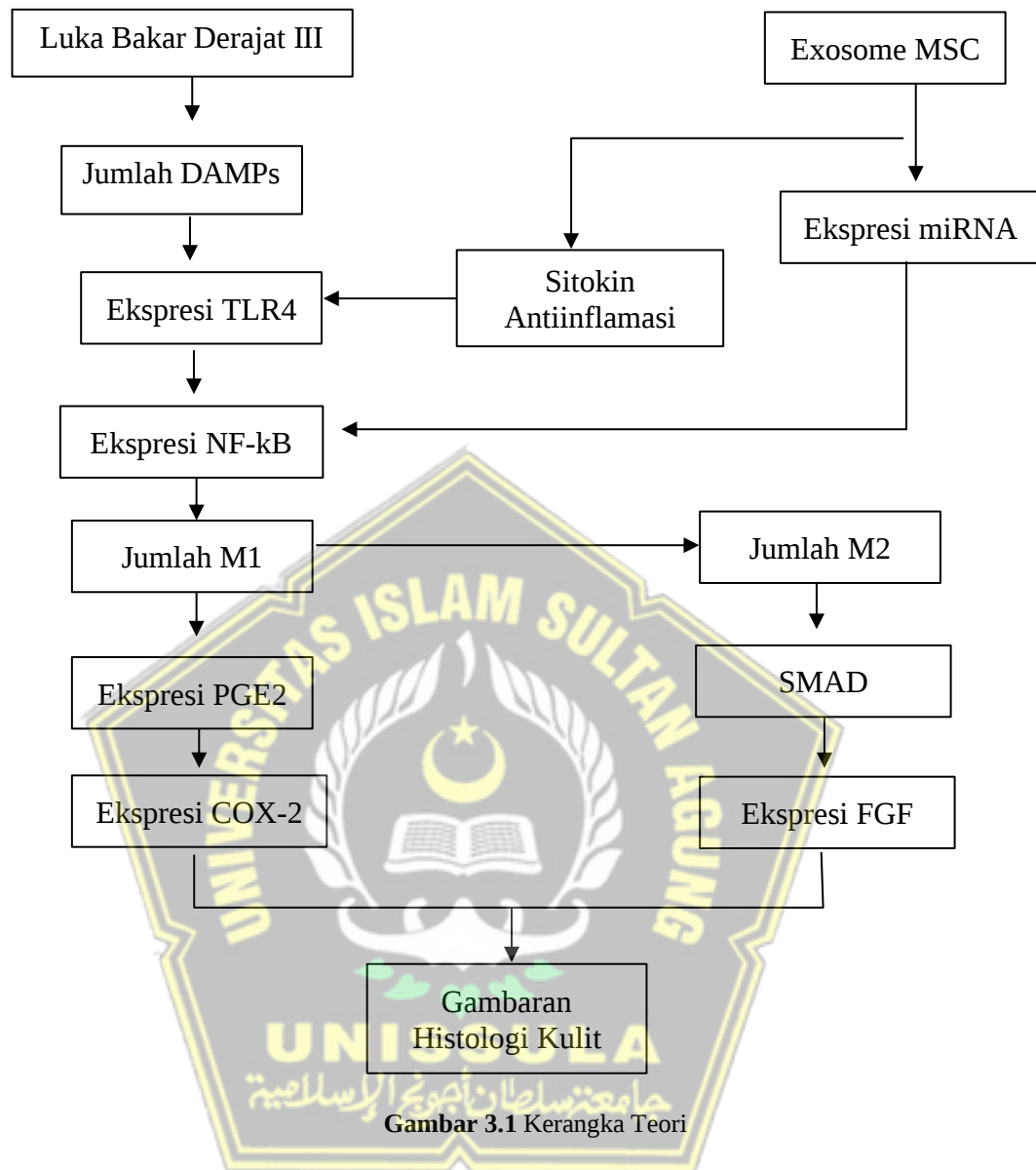
(hUCMSC) dalam mengatur peradangan yang disebabkan oleh luka bakar. Ditemukan bahwa luka bakar secara signifikan meningkatkan reaksi peradangan atau makrofag, meningkatkan Ekspresi *Fibroblast growth factor* (FGF) dan *Cyclooxygenase-2* (COX-2). Pemberian eksosom hUCMSC berhasil membalikkan reaksi ini. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa miR- 181c dalam eksosom memainkan peran penting dalam mengatur peradangan. Dibandingkan dengan eksosom hUCMSC kontrol, eksosom hUCMSC yang mengekspresikan miR-181c secara berlebihan lebih efektif menekan jalur pensinyalan TLR4 dan meredakan peradangan pada tikus yang terbakar. Pemberian hUCMSC-eksosom yang mengekspresikan miR-181c atau pengurangan TLR4 secara signifikan mengurangi ekspresi TLR4 yang diinduksi LPS oleh makrofag dan reaksi inflamasi. Singkatnya, ekspresi miR-181c dalam hUCMSC-eksosom mengurangi inflamasi yang disebabkan oleh luka bakar dengan menurunkan regulasi jalur pensinyalan TLR4.⁷³

Mekanisme Aktivasi NF- κ B jalur kanonik Inisiasi mekanisme ini dipromosikan oleh aksi beberapa sinyal sitokin, seperti FGF dan COX-2, pola molekuler terkait patogen (PAMPS) dan molekul terkait yang dilepaskan oleh sel inang yang dikenali oleh TLR (reseptor mirip tol); sinyal stres, dan reseptor sel T dan B.^{35, 68} NF- κ B dalam sel imun bawaan, NF- κ B memainkan peran penting dalam induksi dan fungsi gen pro-inflamasi baik dalam sistem imun bawaan maupun adaptif, di mana sel-sel seperti makrofag, sel dendritik, dan neutrofil terlibat secara aktif. Sel-sel ini mengekspresikan reseptor pengenalan pola (PRR), yang mengenali berbagai komponen mikroba sebagai

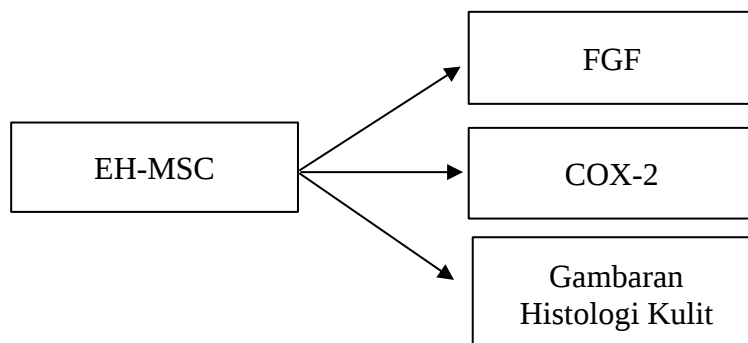
(PAMP). Setelah distimulasi oleh PAMP dan DAMP, monosit diaktifkan menjadi makrofag, yang menghasilkan molekul antimikroba dan melepaskan sitokin dan kemokin. Kemudian, makrofag yang diaktifkan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis makrofag dengan fenotip yang berbeda, yang dinamakan M1 dan M2.^{74, 75}

Jalur persinyalan NF-kB mengatur ekspresi gen yang dapat mempengaruhi angiogenesis dimana *Fibroblast growth factor* (FGF) menginduksi angiogenesis dan meningkatkan ekspresi protease serta membantu perbaikan jaringan dan penyembuhan luka.¹¹ Sedangkan pada *Cyclooxygenase-2* (COX-2) memicu angiogenesis.





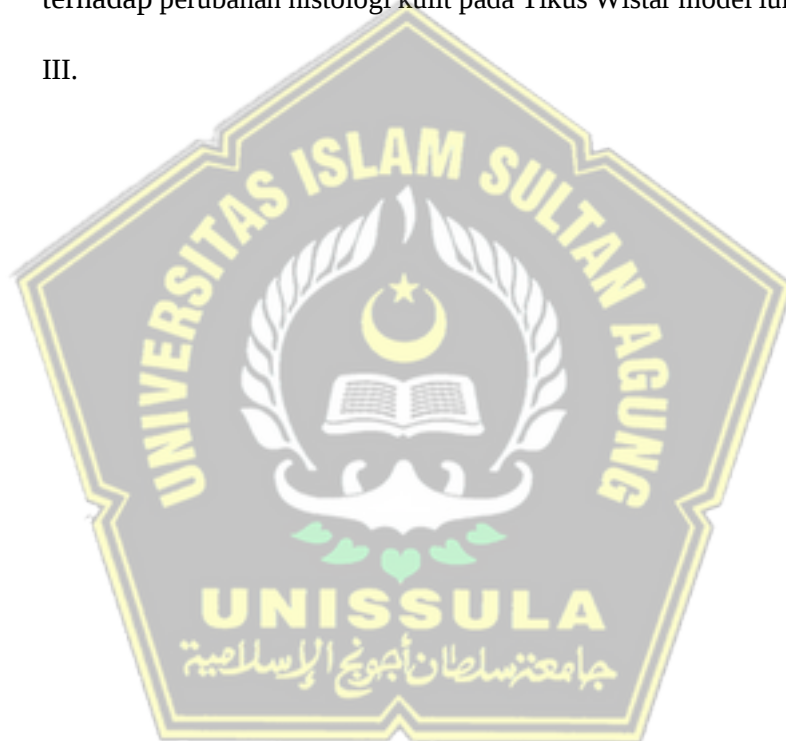
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi FGF pada Tikus Wistar model luka bakar derajat III.
2. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap ekspresi COX-2 pada Tikus Wistar model luka bakar derajat III.
3. Terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap perubahan histologi kulit pada Tikus Wistar model luka bakar derajat III.

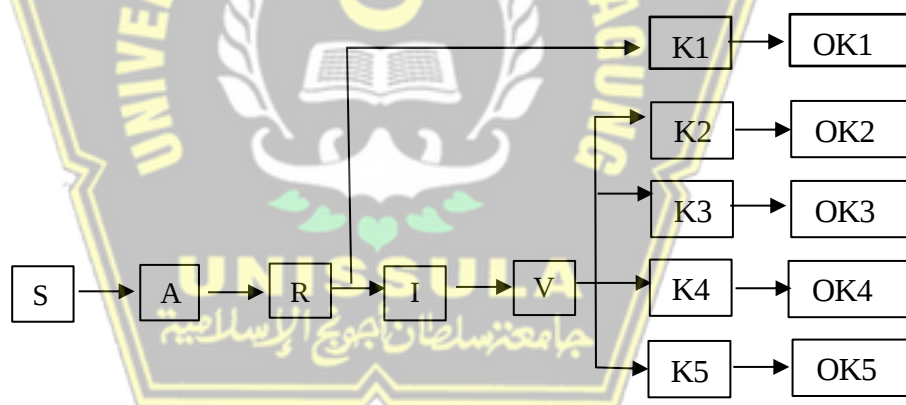


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan 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. Sampel yang digunakan adalah kulit luka bakar dari tikus model dengan luka bakar Derajat Tiga. Berikut merupakan rancangan penelitian yang akan dilakukan.



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

S = Sampel

A = Aklimatisasi

R = Random

I = Induksi Luka Bakar Derajat 3

V = Validasi densitas kolagen menggunakan Masson Trichrome

- K1 = Tikus sehat tanpa luka bakar tanpa perlakuan
- K2 = LBD 3 dengan perlakuan pemberian injeksi NaCl
- K3 = LBD 3 yang diberi perlakuan olesan Silver Sulfadiazine di sekeliling luka.
- K4 = LBD 3 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 100µg
- K5 = LBD 2 yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 200µg
- OK1 = Observasi Ekspresi FGF dan COX-2
- OK2 = Observasi Ekspresi FGF dan COX-2
- OK3 = Observasi Ekspresi FGF dan COX-2
- OK4 = Observasi Ekspresi FGF dan COX-2
- OK5 = Observasi Ekspresi FGF dan COX-2

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel penelitian

- Variabel Bebas penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Exosome Hypoxia Mesenchymal stem cell*
- Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekspresi FGF, Ekspresi COX-2, Perubahan histologi jaringan kulit.
- Variabel Prakondisi penelitian ini adalah paparan plat besi.

4.2.2. Definisi Operasional

- E-MSC

Eksosom MSC adalah eksosom hasil isolasi dari kultur MSC hipoksia yang diberikan secara subcutan dalam dosis 100µg dan 200µg di 1jam, 24jam, 3 hari setelah luka bakar derajat tiga.

Satuan : μg

Skala : Rasio

b. Ekspresi FGF

Ekspresi gen FGF merupakan ekspresi gen FGF dari jaringan kulit dengan LBD 3 pada hari ke-5 setelah pemberian E-MSC yang diukur menggunakan metode RT PCR.

Satuan : fold change

Skala : Rasio

c. Ekspresi COX-2

Ekspresi gen COX-2 merupakan ekspresi gen COX-2 dari jaringan kulit dengan LBD 3 pada hari ke-5 setelah pemberian E-MSC yang diukur menggunakan metode RT PCR.

Satuan : fold change

Skala : Rasio

d. Histologi Jaringan Kulit

Gambaran mikroskopis jaringan luka bakar pada hari ke-5 setelah pemberian E-MSC yang dinilai melalui preparate HE (Hematoxylin-eosin).

Satuan : Presentase

Skala : Ordinal

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek penelitian

4.3.1.1. Kriteria inklusi

- a. Tikus galur Wistar jantan
- b. Usia 6-8 minggu
- c. Berat badan 200-250 g
- d. Tidak memiliki kelainan anatomis
- e. Tikus bergerak secara aktif.

4.3.1.2. Kriteria Eksklusi

- a. Reaksi alergi terhadap exosome
- b. Kondisi stres ekstrem yang mengganggu prosedur injeksi.
- c. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

4.3.1.3. Kriteria drop out

- a. Tidak menerima terapi sesuai protokol
- b. Tikus mati selama penelitian.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur wistar Dewasa dengan berat badan 200-250 gram $\pm$ 10 gr (cv = 5%) yang termasuk kriteria inklusi. Semua sampel tikus yang dipilih untuk penelitian ini setelah dinyatakan sehat dan layak oleh dokter hewan dari Laboratorium SCCR (*Stem Cell And Cancer Research*) Semarang. Tikus dipelihara di lab berventilasi cukup dan suhu ruangan 20-28°C dengan makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*.

4.4. Teknik Sampling

Sampling adalah strategi yang digunakan untuk memilih elemen dari populasi untuk diteliti. 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.

4.5. 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 5 perlakuan yang terdiri dari : tikus sehat tanpa luka bakar derajat tiga (K1), luka bakar derajat tiga dengan perlakuan pemberian injeksi *Water for Injection* (K2), luka bakar derajat tiga dengan olesan *Silver Sulfadiazine* di sekeliling luka (K3), luka bakar derajat tiga yang diberi perlakuan injeksi sub cutan exosome dosis 100 uL (K4) dan 200 uL (K5) sebanyak satu kali sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow 5 \text{ (pembulatan)}$$

Berdasarkan rumus tersebut, jumlah minimal sampel yang dibutuhkan

untuk masing-masing kelompok perlakuan pada penelitian ini adalah 5 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 30 ekor tikus.

4.6. Alat dan Bahan

4.6.1. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk kultur antara lain meliputi *Micropipette* with tip (*blue tip, yellow tip, pink tip*), *Pippete Filler*, *Conical Tube* (15ml, 50ml), *Cryotube* 1ml, *Haemocytometer*, *Inverted Microscope* CO2 *Cylinder*, *Scissor*, *Pinset*, *Scalpel* dan *Bisturi*, *Thermostirrer*, *Sentrifuge*, *Beaker glass*, *Aluminium Foil*. Alat yang digunakan untuk Kultur Vessel antara lain meliputi *Dish*, *flask*, *12 well plate*, *96 well plate*. Alat yang digunakan untuk *Testing Instrumen* antara lain meliputi *PCR reader*, *MACS*, *Immunocytochemistry*, *Antibody Monoclonal*, *Western Blot*. Alat yang digunakan untuk *Incubation and Working Culture Area* antara lain meliputi *Biosafety Cabinet* dan CO2 *Inkubator*. Peralatan lain yang digunakan antara lain *Invereted microscope*, *Hotplate stirrer*, *Dissposable pipet*, *Heparin tube*, *Conical tune*, *Cryo tube*, *Haemocytometer*, *Cell counter*.

4.6.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian meliputi bahan kultur yang terdiri dari *Cell Storage: Mesenchymal stem cell* Isolasi Mice Umbilical Cord, Antibodi Monoklonal: CD 90°, CD 105', CD 34", Growth Factor: Fetal Bovine Serum (FBS), Substance: Medium Alpha Mem, penstrep, tripsin, fungizin, 70% alcohol, Immunostaining: Blocking serum, universal link, Streptavidin, DAB. Reagen terdiri dari Phospat Buffer Saline (PBS), HEPES, Tripsin, Penstrep, Fungizone, Kolagenase tipe I, Kolagenase tipe IV, Triptofan Blue, DMSO, MTT, Stropper.

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian meliputi Teknik isolasi Bahan-bahan yang diperlukan untuk analisis PCR antara lain PCR Kit FGF dan COX-2.

4.7. Cara Penelitian

4.7.1. *Ethical clearance*

Penelitian dimulai dengan mengajukan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas 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.

4.7.2. Isolasi MSC

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

1. Kumpulkan tali pusat segera setelah tikus melahirkan.
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*.

4.7.3. 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.

4.7.4. 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.

4.7.5. 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.

4.7.6. 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 perlukaan yaitu bagian proksimal punggung tikus. Luka bakar dibuat menggunakan lempeng besi yang sudah dipanasi dengan api suhu 350°C supaya kedalamannya sama, luas luka 2x2 cm². Kemudian lempeng besi ditempelkan pada kulit punggung tikus selama 10 detik sampai terbentuk luka bakar derajat III.

4.7.7. Pemberian Treatment

Setelah luka bakar selesai dibuat pada bagian dorsal 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 olesan *Silver Sulfadiazine* di sekeliling luka (K3), luka bakar dengan injeksi subcutan exosome 100 uL (K4) dan 200 uL (K5) diberikan sebanyak 1 kali. Tikus diterminasi pada hari ke-5 setelah penyuntikan perlakuan.

4.7.8. Koleksi Sampel dan Analisis RT-PCR

1. Koleksi dan Homogenisasi Sampel

Koleksi sampel diambil pada hari ke-5, 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 dimasukkan 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 berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (aqueous phase).
- h. Pisahkan aqueous phase di sisi atas ke tube yang berbeda.
- i. 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.

- j. 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.
 - k. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan dengan 50µL Nuclease-Free Water (NFW).
 - l. Konsentrasi sampel RNA kemudian diukur menggunakan udrop microplate reader.
 - m. 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.
 - n. Sampel RNA kemudian ditambahkan 2µL 4x DN Master Mix dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit menggunakan thermal cycler.
 - o. 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.
 - p. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20OC.
2. Pembacaan Ekspresi Gen FGF dan COX-2 dengan RT-PCR
- a. Ekspresi gen dari FGF dan COX-2 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR).
 - b. Campuran dari 1µL 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.

- c. 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.
- d. Kuantifikasi data qRT-PCR dilakukan menggunakan Software EcoStudy.

4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada 24 April- 6 Mei 2025. Perlakuan dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR) Indonesia dan Animal Model Research Center SCCR Indonesia selama 14 hari.

4.9. Analisa Data

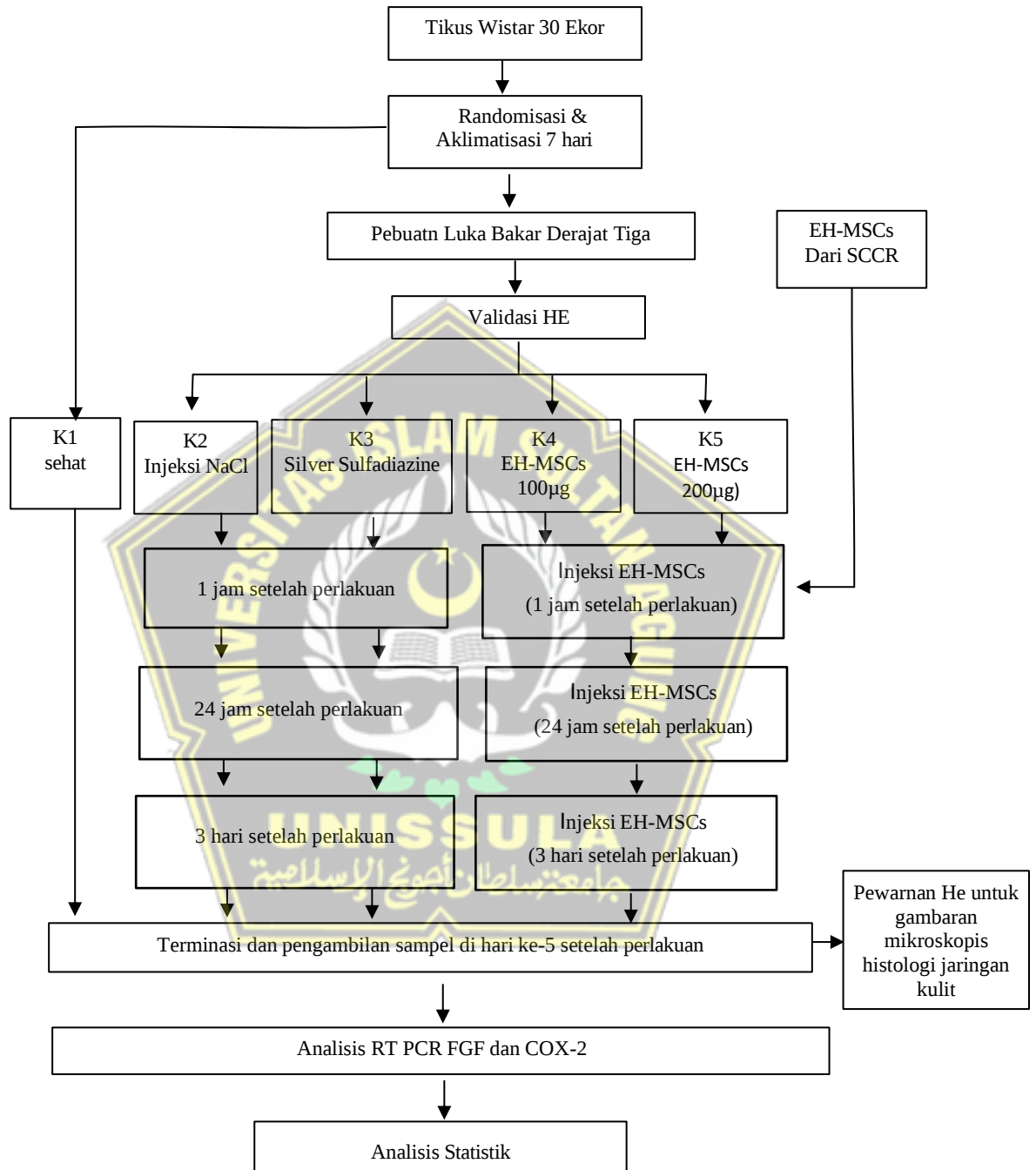
Data hasil analisis ekspresi FGF dan COX-2, normalitas distribusi data diuji dengan *Shapiro-Wilk*. Pada ekspresi FGF didapatkan data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene's Test* dan didapatkan hasil variasi data tidak homogen ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji statistik parametrik *One-Way ANOVA* Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian, setelah uji *One-Way ANOVA*, maka uji *Post Hoc Tamhane* yang digunakan. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok

Pada ekspresi COX-2 didapatkan data terdistribusi normal ($p > 0,05$).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene's Tes* dan didapatkan hasil variasi data tidak homogen ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji statistic parametrik *One-Way ANOVA* Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian, setelah uji *One-Way ANOVA*, maka uji *Post Hoc Tamhane* yang digunakan. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian.



4.10. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

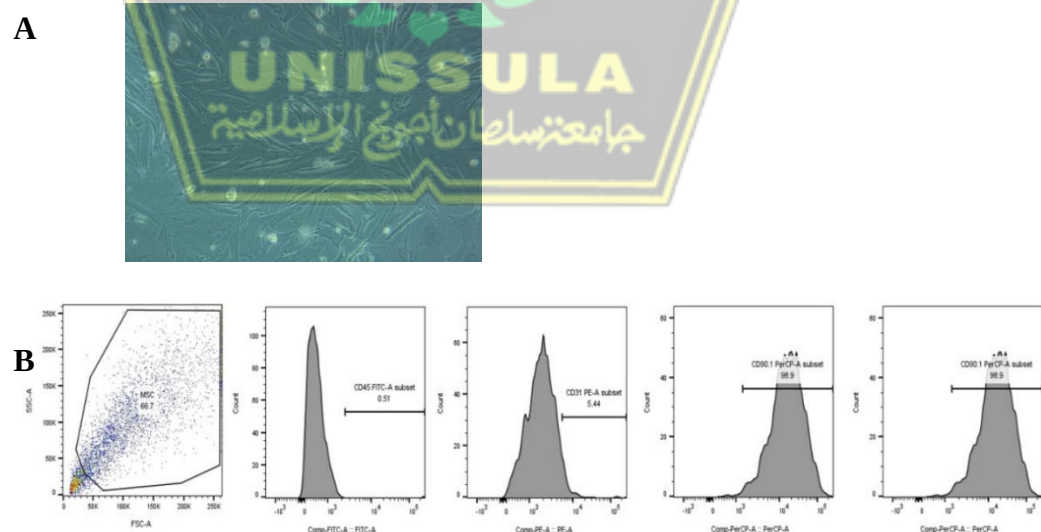
5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi ekperimental secara *in vivo* yang bertujuan untuk mengetahui Pengaruh Pemberian Exosome hypoxia mesenchymal stem cells (EH-MSCs) terhadap ekspresi fibroblast growth factor (FGF), cyclooxygenase-2 (COX2) dan perubahan histologi jaringan kulit pada tikus wistar model luka bakar derajat III. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group* dengan metode rancang acak lengkap, yang melibatkan 5 kelompok perlakuan. Subjek penelitian ini adalah adalah tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*), dengan jumlah sampel sebanyak 30 ekor berusia 6-8 minggu dan memiliki berat badan 200-250 g. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari, kemudian dibagi secara acak menjadi lima kelompok : kelompok 1 (tikus sehat tanpa paparan luka bakar derajat III), kelompok 2 (kontrol negatif) (tikus yang dipaparkan luka bakar derajat III dan diberikan injeksi NaCl pada 1 jam, 24 jam, 3 hari setelah perlakuan), kelompok 3 (kontrol positif) (tikus yang dipapar luka bakar derajat III dan diberikan cream *Silver Sulfadiazine* pada 1 jam, 24 jam, 3 hari setelah perlakuan), kelompok 4 (tikus yang dipapar luka bakar derajat III dan diberikan injeksi EH-MSCs 100µg pada 1 jam, 24 jam, 3 hari setelah perlakuan), kelompok 5 (tikus yang dipapar luka bakar derajat III dan diberikan injeksi EH-MSCs 200µg pada 1 jam, 24 jam, 3 hari setelah perlakuan). Rambut pada setiap tikus di bagian punggung dicukur hingga bersih dengan ukuran 3-5 cm, lalu dilakukan anestesi pada kulit dengan menggunakan ketamine, selanjutnya

didesinfeksi dengan alkohol 70% dan diberikan paparan plat besi ukuran 2x2 cm yang dipanaskan mencapai suhu 350°C kemudian ditempelkan pada punggung tikus selama 10 detik sehingga terbentuk luka bakar derajat III lalu diberikan perlakuan sesuai kelompok. Exosome yang dipakai dalam penelitian ini dari SCCR, sedangkan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di animal model research center SCCR Semarang menggunakan metode deteksi ekspresi FGF dan ekspresi COX-2 memakai *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC (*Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*)

Mesenchymal stem cell diisolasi di Laboratorium SCCR Indonesia di Semarang, menggunakan sumber berupa tali pusat tikus pada usia berusia 21 hari kehamilan. Setelah proses isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam *Flask* kultur yang berisi media DMEM. Setelah mencapai pasase kelima, analisis morfologi sel, menunjukkan terdapat sel yang menyerupai *spindle* saat diamati dengan mikroskop dan melekat di atas permukaan flask (Gambar 5.1A).



Gambar 5.1. Morfologi MSC. (A) MSCs Passage 7 konfluensi 80% (Perbesaran 40x). (B) Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90.

Analisis identitas sel menggunakan *surface marker* MSC menggunakan

metode *flow cytometry* menunjukkan bahwa sel yang dikultur secara kuat mengekspresikan CD90 (98,9%), dan hanya sedikit mengekspresikan CD45 (0,51%) dan CD31 (5,44%) (Gambar 5.1B). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur dari tali pusar memiliki karakteristik MSC.

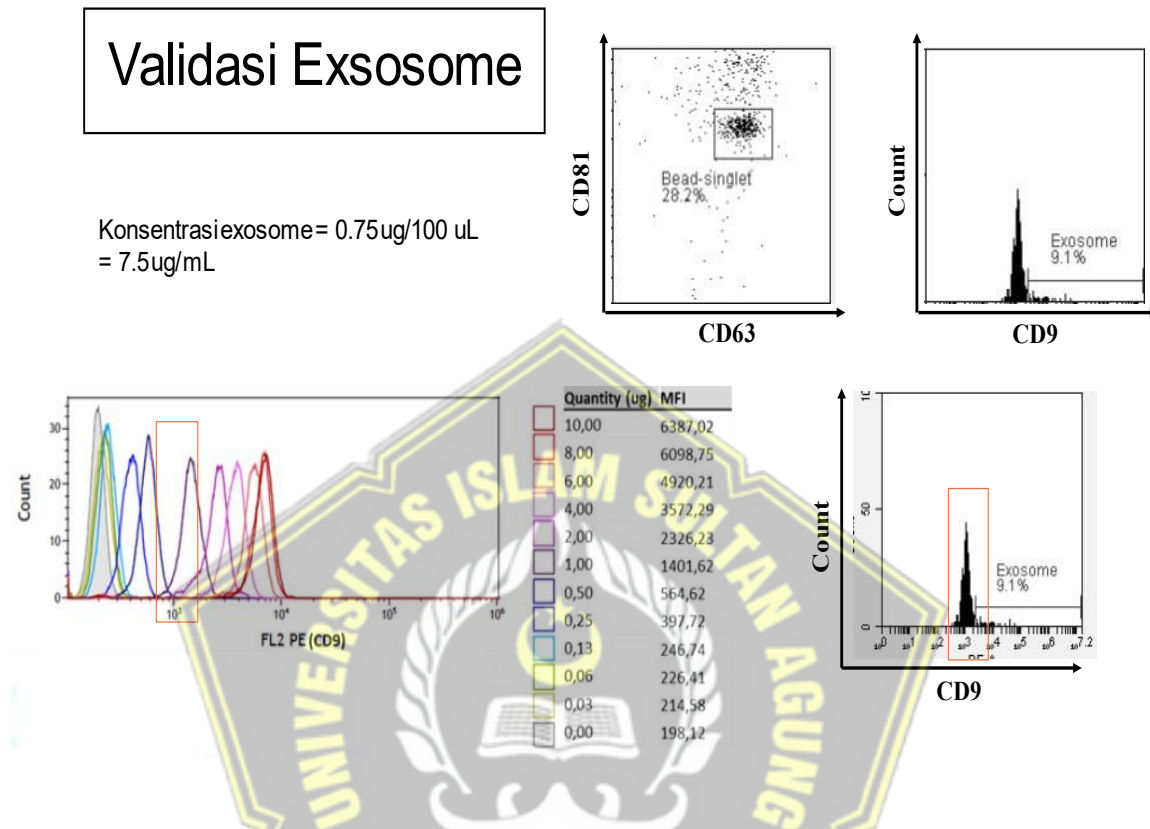
Penelitian ini juga memastikan kapasitas MSC dalam diferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa seperti sel osteosit dan sel adiposity yaitu dengan cara memberi medium spesifik menginduksi diferensiasi, baik menjadi osteosit maupun adiposit. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MSC mampu mengalami diferensiasi menjadi osteosit dan adiposity yang terlihat oleh Alizarin Red dan oil Red O. (Gambar 5.2 A dan B).



Gambar 5.2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red(A) dan Adiposit pada pewarnaan oil red o(B).

Setelah tervalidasi, MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan box hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSC yang mengandung sekretom MSC dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sehingga dapat diperoleh EH-MS. Setelah diisolasi kadar *exosome* dianalisis menggunakan metode *flowcytometry* dan didapatkan bahwa kadar *exosome* yang didapatkan

sebesar 0.75 ug/100 uL = 7.5 ug/mL (Gambar 5.3).

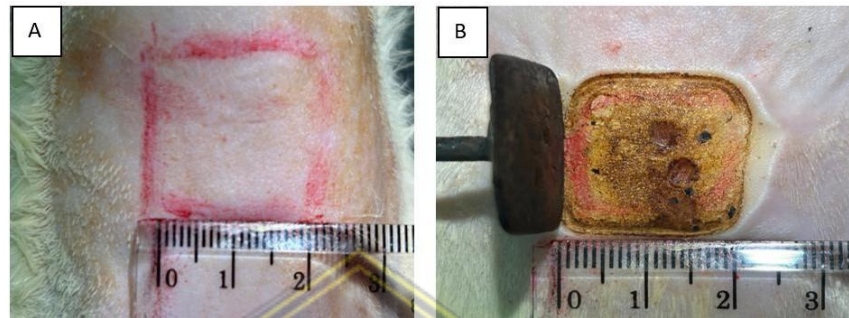


Gambar 5.3. Hasil Analisis Kadar *Exosome* menggunakan marker CD63 dan CD9

5.1.2. Hasil Validasi Luka Bakar Derajat III

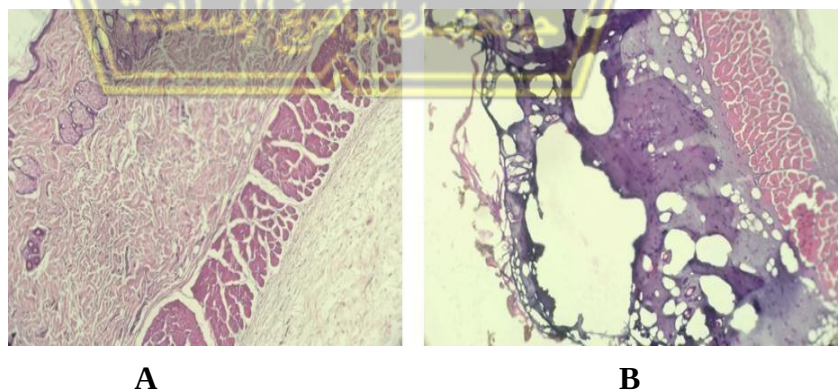
Validasi pembentukan model Luka Bakar pada tikus dilakukan secara pemodelan dibuat menggunakan plat logam dengan ukuran 2 x 2 cm² dan tebal 3mm, dipanaskan hingga menyala sampai suhu 350⁰C, lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 10 detik. Kondisi luka bakar derajat III ini divalidasi dengan kenampakan luka dan pemeriksaan histologis dengan menggunakan pengecatan Hematoxyline-Eosin (HE). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tikus sehat menggambarkan struktur jaringan kulit normal, di mana epidermis, dermis, serta jaringan subkutan tersusun rapi, tanpa indikasi inflamasi atau kerusakan jaringan, sedangkan tikus yang diinduksi luka bakar

menunjukkan jaringan pasca-luka bakar dengan tanda-tanda nekrosis koagulatif, kerusakan menyeluruh pada epidermis dan dermis, terbentuknya vakuolisasi, dan hilangnya struktur jaringan normal, sebagaimana terlihat dalam Gambar 5.4.



Gambar 5.4. A: Tikus Sehat, B: Tikus Luka Bakar Derajat III

(A) menggambarkan struktur jaringan kulit normal, di mana epidermis, dermis, serta jaringan subkutan tersusun rapi, tanpa indikasi inflamasi atau kerusakan jaringan, sedangkan tikus yang induksi luka menggunakan besi panas yang ditempelkan pada kulit hasilnya tampak perubahan warna menjadi coklat tua hingga kehitaman, yang menunjukkan kerusakan termal mendalam dan nekrosis koagulatif, khas luka bakar derajat III (B)



Gambar 5.5. Validasi A: Tikus Sehat, B: Luka Bakar Derajat III

Setelah tikus tervalidasi mengalami Luka bakar derajat III, tikus yang

tanpa induksi luka bakar derajat III digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan tikus yang mengalami Luka Bakar Derajat III dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (tikus luka bakar derajat III dengan injeksi NaCl), K3 (tikus luka bakar derajat III dengan perlakuan olesan *Silver Sulfadiazine* di sekeliling luka), K4 dan K5 (tikus luka bakar derajat III dengan injeksi subkutan exosome dengan dosis masing-masing 100 µg dan 200 µg).

Validasi luka bakar derajat III dilakukan pada hari pertama setelah induksi panas dengan memastikan adanya perubahan warna kulit menjadi putih keabu-abuan hingga coklat kehitaman dan terbentuknya skar, yang menunjukkan kerusakan pada lapisan epidermis, dermis, hingga jaringan subkutan. Setelah validasi, hewan uji dibagi ke dalam kelompok perlakuan dan diberikan injeksi Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cell (EH-MSC) sesuai dosis yang telah ditentukan. Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-5 pasca perlakuan. Jaringan kulit yang diperoleh kemudian dihomogenisasi menggunakan RIPA buffer yang telah ditambahkan inhibitor proteinase untuk mencegah degradasi protein. Homogenat yang dihasilkan selanjutnya disentrifugasi, dan supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis ekspresi FGF dan COX-2 menggunakan metode RT-PCR

5.1.3. Hasil Pemeriksaan Ekspresi FGF

Hasil analisis rata-rata ekspresi FGF pada masing-masing kelompok subyek penelitian ditunjukkan pada table 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1. Ekspresi FGF

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Ekspresi FGF						
Mean	1,02	0,56	1,16	2,31	2,39	
SD	±0,01	±0,23	±0,14	±0,17	±0,32	
Shapiro Wilk	0,415	0,358	0,661	0,812	0,383	
Levene Test						0,01
One way anova						0,00
Keterangan:	*Shapiro-Wilk = Normal ($p > 0,05$) *Leuvene Test = Tidak Homogen ($p < 0,05$) *Oneway Anova = Signifikan ($p < 0,05$)					

Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan *Levene test* yang menghasilkan nilai $p = 0,01$ ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa variasi antar kelompok tidak homogen. Karena data normal dan tidak homogen dilakukan uji statistic *One-Way ANOVA*, hasil uji ANOVA menunjukan nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Yang mengindikasikan adanya perbedaan ekspresi FGF yang signifikan secara statistic antar kelompok perlakuan. Selanjutnya uji lanjutan dilakukan menggunakan *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar pasangan kelompok (Tabel 5.2)

Tabel 5.2 Hasil Uji *Post Hoc Tamhane* FGF

Kelompok	Kelompok Perbandingan	p(value)
K1	K2	0,045
	K3	0,481
	K4	0,000
	K5	0,001
K2	K3	0,005
	K4	0,000
	K5	0,000
K3	K4	0,000
	K5	0,001
K4	K5	1,000

Keterangan : berbeda bermakna $p < 0,05$

Berdasarkan hasil perbandingan antar dua kelompok, pasangan

kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna statistic yaitu K1 dengan K2, K1 dengan K4, K1 dengan K5, K2 dengan K3, K2 dengan K4, K2 dengan K5, K3 dengan K4, K4 dengan K5. Sedangkan kelompok yang tidak berbeda signifikan secara statistic adalah K1 dengan K3 dan K4 dengan K5.



Gambar 5.6. Grafik rata-rata ekspresi gen FGF setiap kelompok perlakuan

Hasil analisis rata-rata (Gambar 5.1) menunjukkan bahwa ekspresi gen FGF pada jaringan kulit tikus bervariasi sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Kelompok tikus sehat tanpa paparan luka bakar derajat III (K1) memiliki rata-rata ekspresi FGF sebesar $1,02 \pm 0,01$, sementara kelompok tikus yang dipapar luka bakar derajat III dan diberikan NaCl (K2) memiliki ekspresi paling rendah, yaitu sebesar $0,56 \pm 0,23$. Adapun kelompok tikus yang dipapar luka bakar derajat III dan diberikan krim *Silver sulfadiazine* (K3) memiliki rata-rata ekspresi lebih rendah dibandingkan K4 dan K5 yaitu sebesar $1,15 \pm 0,14$.

Kelompok yang diberikan EH-MSC dengan dosis 100 μg (K4) dan 200 μg (K5) memiliki ekspresi FGF lebih tinggi dibandingkan dengan K3 yaitu K4

sebesar $2,31 \pm 0,17$ dan K5 sebesar $2,39 \pm 0,32$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EH-MSC dosis 100 μg dan 200 μg lebih efektif dalam meningkatkan ekspresi FGF dibandingkan dengan pemberian krim *Silver sulfadizine*.

5.1.4 Hasil Pemeriksaan Ekspresi COX2

Hasil analisis rata-rata ekspresi COX-2 pada masing-masing kelompok subyek penelitian ditunjukkan pada table 5.3 sebagai berikut:

Tabel 5.3. Ekspresi COX-2

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	P value
Ekspresi COX-2						
Mean	1,02	3,35	2,34	2,09	1,45	
SD	0,00	0,40	0,43	0,07	0,34	
Shapiro Wilk	0,158	0,947	0,834	0,529	0,727	
Levene Test						0,006
One way anova						0,000

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

Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan *Levene test* yang menghasilkan nilai $p = 0,006$ ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa variasi antar kelompok tidak homogen. Karena data normal dan tidak homogen dilakukan uji *statistic One-Way ANOVA*, hasil uji ANOVA menunjukan nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Yang mengindikasikan adanya perbedaan ekspresi COX-2 yang signifikan secara statistic antar kelompok perlakuan. Selanjutnya uji lanjutan dilakukan menggunakan Post Hoc Tamhane untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar pasangan kelompok

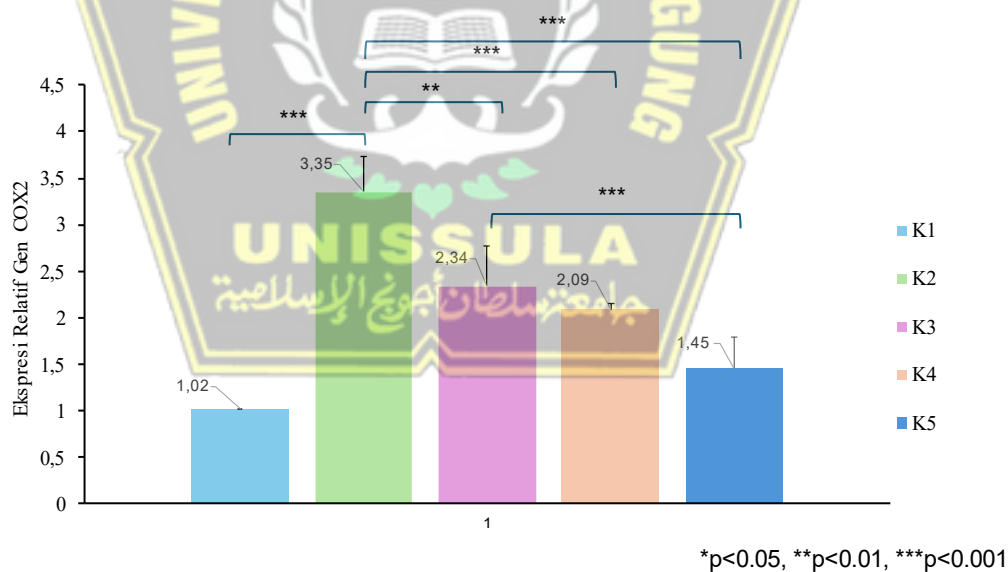
Tabel 5.4. Uji Post Hoc Tamhane COX-2

Kelompok	Kelompok Perbandingan	p(value)
K1	K2	0,000

	K3	0,006
	K4	0,000
	K5	0,232
K2	K3	0,018
	K4	0,005
	K5	0,000
K3	K4	0,902
	K5	0,029
K4	K5	0,055

Keterangan : berbeda bermakna $p < 0,05$

Berdasarkan hasil perbandingan antar dua kelompok, pasangan kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna statistic yaitu K1 dengan K2, K1 dengan K3, K1 dengan K4, K2 dengan K3, K2 dengan K4, K2 dengan K5, K3 dengan K5. Sedangkan kelompok yang tidak berbeda signifikan secara statistic adalah K1 dengan K5, K3 dengan K4 dan K4 dengan K5.



Gambar 5.7. Grafik rata-rata ekspresi gen COX2 setiap kelompok perlakuan

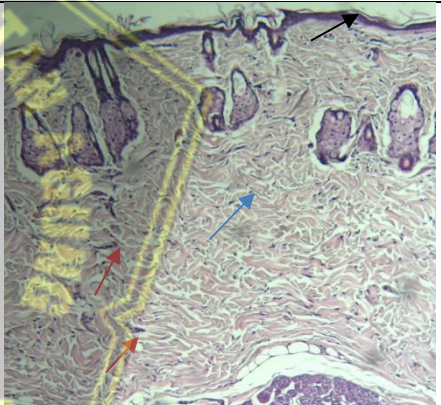
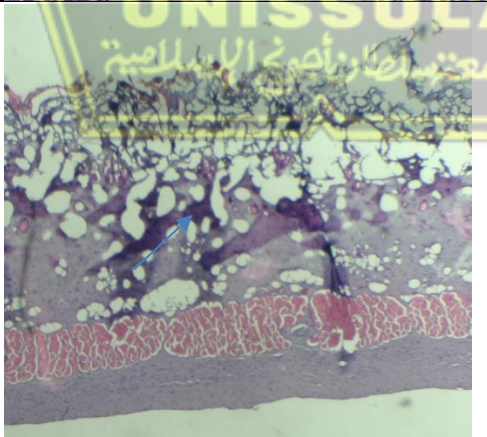
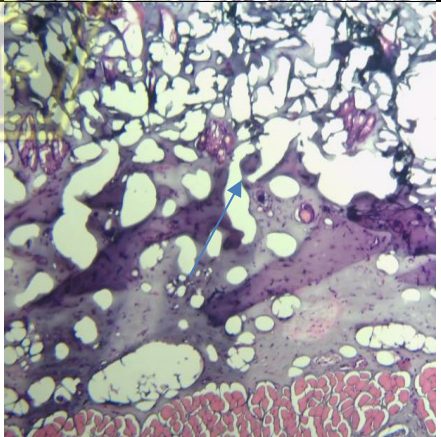
Hasil analisis rata-rata (gambar 5.2) menunjukkan bahwa ekspresi COX-2 pada setiap kelompok perlakuan pada jaringan kulit tikus hampir sama pada

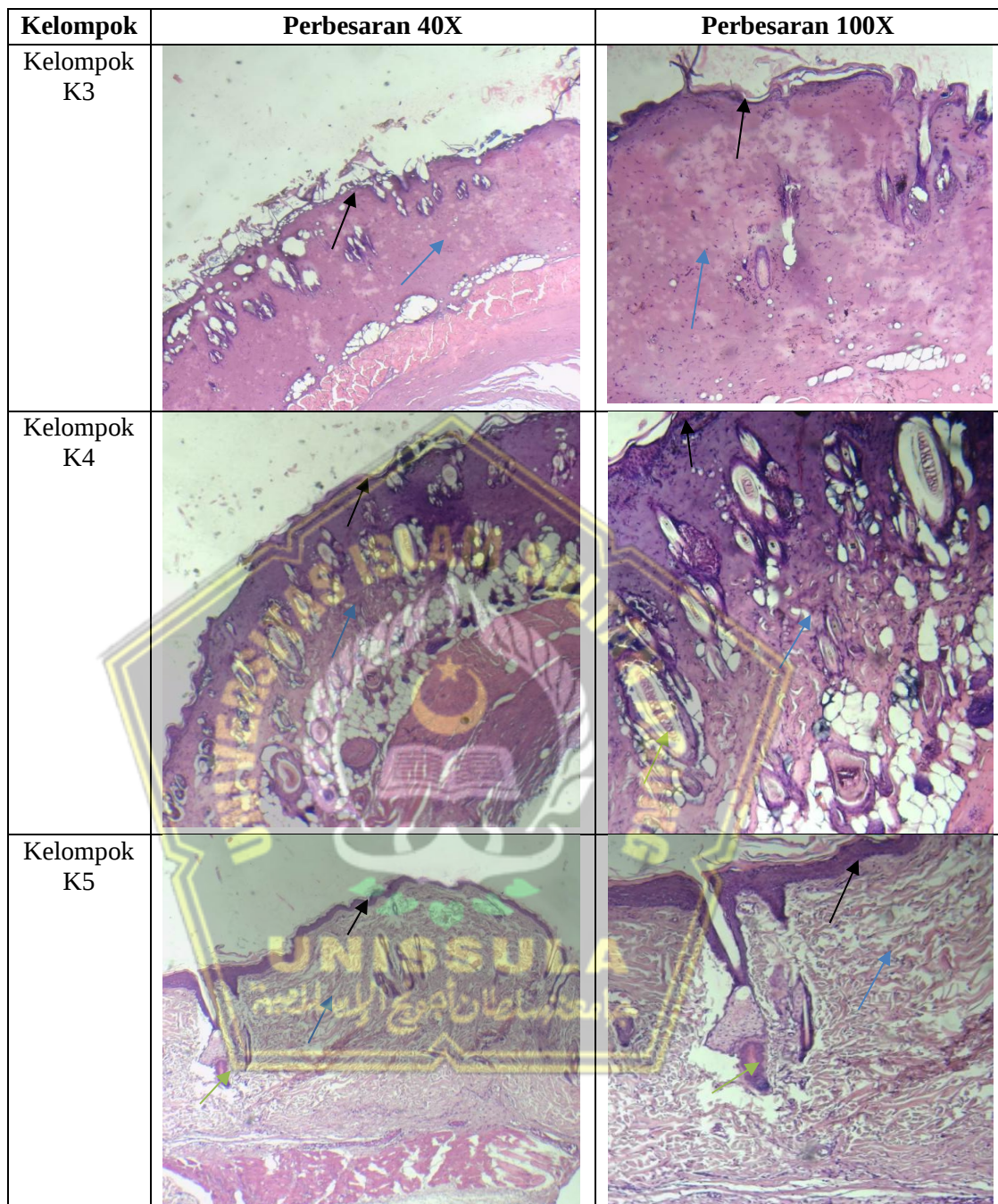
setiap perlakuan yang diberikan. Kelompok tikus sehat tanpa paparan luka bakar (K1) memiliki rata-rata ekspresi COX-2 sebesar $1,02 \pm 0,24$, sementara kelompok tikus yang dipapar luka bakar derajat III dan diberikan injeksi NaCl (K2) sedikit lebih Tinggi yaitu $3,35 \pm 0,40$.

Pemberian krim *Silver sulfadiazine* (K3) memiliki rata-rata ekspresi COX-2 sebesar $2,34 \pm 0,43$ sementara K5 lebih rendah yaitu memiliki nilai rata-rata ekspresi COX2 sebesar $1,45 \pm 0,34$ mempunyai perbedaan yang signifikan.

5.1.5 Hasil Pemeriksaan Histologi Luka Bakar

Tabel 5.5 Perbandingan Makroskopis Histologi Jaringan Kulit Tikus Luka Bakar Derajat III

Kelompok	Perbesaran 40X	Perbesaran 100X
Kelompok K1		
Kelompok K2		



Dari pemeriksaan diatas Analisis histologi dilakukan untuk mengevaluasi kondisi kulit pada kelompok sehat, kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), perlakuan 1 (EH-MSC 100 μ L), dan perlakuan 2 (EH-MSC 200 μ L).

Pada kelompok sehat, lapisan epidermis utuh dari stratum basale hingga stratum korneum lengkap tanpa celah antara epidermis dan dermis. Vaskularisasi dermis normal dengan kapiler dan pembuluh darah terdistribusi merata. Tidak ditemukan infiltrasi sel radang, distribusi fibroblas normal dengan morfologi fusiform teratur, tidak ada nekrosis, dan kolagen di dermis padat, tersusun paralel, serta eosinofilik tebal.

Kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan pembentukan lapisan epidermis baru, area luka hanya tertutup debris jaringan dan eksudat kering. Vaskularisasi minimal akibat kerusakan jaringan, dengan infiltrasi sel radang (PMN dan makrofag) yang jelas di sekitar jaringan nekrotik. Fibroblas sangat sedikit tanpa tanda proliferasi, area nekrosis mendominasi lebih dari 70% permukaan luka, struktur dermis dan epidermis hilang, dan hampir tidak ada deposisi kolagen baru.

Kelompok kontrol positif memperlihatkan epidermis baru yang hampir menutup seluruh luka, disertai pembentukan pembuluh darah kecil baru di dermis papiler dengan distribusi moderat. Masih ditemukan infiltrasi PMN dan mononuklear di jaringan granulasi, meskipun berkurang dibandingkan kontrol negatif. Fibroblas aktif dengan orientasi sejajar menandakan fase proliferasi. Area nekrosis berkurang menjadi kurang dari 20% dan mulai terbentuk bundel kolagen eosinofilik yang masih imatur.

Kelompok perlakuan 1 (EH-MSC 100 μ L) menunjukkan epidermis baru yang hampir menutup seluruh luka namun tebalnya belum seragam. Terlihat banyak pembuluh darah baru di dermis papiler dan retikuler atas, dengan

penurunan signifikan infiltrasi sel radang yang didominasi sel mononuklear. Proliferasi fibroblas aktif, nekrosis minimal (<10%), dan bundel kolagen lebih rapat dibanding kontrol positif, sebagian mulai matang.

Kelompok perlakuan 2 (EH-MSK 200 µL) memiliki lapisan epidermis baru yang utuh, tebal, dan matur, menutupi 100% area luka. Angiogenesis sangat aktif dengan kapiler baru yang padat di dermis papiler. Hampir tidak ada infiltrasi sel radang, jumlah fibroblas tinggi dan tersusun sejajar, tidak ditemukan nekrosis, dan bundel kolagen tebal, eosinofilik, serta terorganisasi matang.

Tabel 5.6. Perbandingan Hasil Analisis Histologi Jaringan Kulit Tikus Luka Bakar Derajat III

Parameter	Kelompok				
	K1 (Sehat)	K2 (NaCl)	K3 (SSD)	K4 (Exosome 100 µg)	K5 (Exosome 200 µg)
Re-epitelisasi	Utuh, lengkap dari stratum basale hingga stratum korneum tanpa celah dengan dermis	Tidak terbentuk, area luka tertutup debris jaringan dan eksudat kering	Baru hampir menutup seluruh luka	Baru hampir menutup seluruh luka, tebal belum seragam	Utuh, tebal, matur, menutupi 100% luka
Akumulasi Kolagen	Padat, paralel, eosinofilik tebal	Hampir tidak ada deposisi baru	Bundel kolagen eosinofilik imatur mulai terbentuk	Bundel kolagen rapat, sebagian matang	Bundel kolagen tebal, eosinofilik, matang, terorganisasi
Jumlah Fibroblas	Distribusi normal, morfologi fusiform teratur	Sangat sedikit, tanpa proliferasi	Aktif, orientasi sejajar	Proliferasi aktif	Tinggi, tersusun sejajar
Infiltrasi Sel Radang	Tidak ada	Jelas, dominan PMN dan makrofag	Masih ada, dominan PMN dan mononuklear, berkurang dari K-	Minimal, dominan sel mononuklear	Hampir tidak ada
Nekrosis	Tidak ada	>70% area luka	<20% area luka	<10% area luka	Tidak ada

Parameter	Kelompok				
	K1 (Sehat)	K2 (NaCl)	K3 (SSD)	K4 (Exosome 100 µg)	K5 (Exosome 200 µg)
Vaskularisasi	Normal, kapiler dan pembuluh darah merata di dermis	Minimal akibat kerusakan jaringan	Pembentukan pembuluh darah kecil baru di dermis papiler	Banyak pembuluh darah baru di dermis papiler dan retikuler atas	Angiogenesis sangat aktif, kapiler padat di dermis papiler

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Luka bakar derajat III menyebabkan kerusakan total pada epidermis dan dermis bahkan dapat mencapai jaringan subcutan, ciri khasnya adalah nekrosis jaringan, kehilangan struktur pembuluh darah dermis, kerusakan matrik kolagen, hilangnya sel penghasil growth factor (keratinosit, fibroblast dermis) akibat kerusakan massif ini proses penyembuhan luka tergantung pada stimulasi factor pertumbuhan serta control inflamasi.³

FGF pada Fase Awal (Inflamasi) luka bakar, kerusakan sel membuat ekspresi FGF menurun drastis karena sumbernya (fibroblas, keratinosit, sel endotel) banyak yang mati. FGF masih dilepaskan dalam jumlah kecil oleh fibroblas dan makrofag di tepi luka, tetapi jumlahnya tidak cukup untuk memulai proliferasi jaringan baru secara optimal.³³ Fase proliferasi FGF merangsang proliferasi fibroblast untuk meningkatkan sintesis kolagen dan matriks seluler, mengaktifkan angiogenesis agar terbentuk pembuluh darah baru untuk suplay oksigen dan nutrisi jaringan, meningkatkan migrasi keratinosit untuk membantu re-epitelisasi luka.²⁶ Fase Remodeling FGF tetap berperan dalam pengaturan deposisi kolagen dan menjaga keseimbangan antara kolagen tipe III (awal) dan

tipe I (matang), mencegah pembentukan jaringan parut yang kaku. FGF juga mengatur degradasi kolagen lama melalui aktivasi matrix metalloproteinases (MMPs).⁸⁴

COX-2 pada Fase Awal (Inflamasi) adalah enzim inducible yang diinduksi cepat setelah luka melalui aktivasi NF- κ B akibat stres oksidatif, sitokin proinflamasi (IL-1 β , TNF- α), dan DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). Fungsi awal COX-2 adalah Mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin (PGE₂, PGI₂) yang memicu vasodilatasi, peningkatan permeabilitas kapiler, dan rekrutmen leukosit.⁸⁴ Memfasilitasi respon imun awal untuk membersihkan debris dan mencegah infeksi. Fase Inflamasi Berkepanjangan pada Luka Bakar Pada luka bakar derajat III menyebabkan kerusakan jaringan luas memicu produksi COX-2 berlebihan dan berkepanjangan. Hal ini menyebabkan, Inflamasi kronis, Kerusakan jaringan baru akibat mediator inflamasi, Hambatan transisi ke fase proliferasi. Fase Proliferasi Kadar COX-2 seharusnya mulai turun agar fibroblas dan sel endotel dapat bekerja membentuk jaringan granulasi. Jika COX-2 tetap tinggi akan terjadi keterlambatan pembentukan jaringan baru dan risiko pembentukan jaringan parut abnormal meningkat. Makadari itu pada luka bakar derajat 3 ekspresi COX-2 harus segera diturunkan.³³

Pada penelitian ini, ekspresi FGF kelompok K1 dan K3 hampir sama tidak ada perbedaan signifikan, K4 dan K5 lebih tinggi dari kelompok K1 dimungkinkan pada K4 dan K5 masih fase proliferasi sehingga ekspresi FGF lebih tinggi dari kelompok sehat (K1). Ekspresi FGF pada K2 paling rendah dan

terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok sehat karena K2 mendapatkan induksi luka bakar derajat III dan setelah diberi EH-MSCs ekspresi FGF naik terlihat pada K4 dan K5, K3 sama dengan kelompok sehat, K4 dan K5 lebih tinggi dari kelompok lainnya, ini menandakan bahwa EH-MSCs meningkatkan ekspresi FGF secara signifikan, sehingga fase proliferasi berlangsung lebih cepat dan berkualitas.

Ekspresi COX-2 pada K2 meningkat dan berbeda signifikan dengan K1, karena K2 mendapatkan induksi luka bakar derajat III sehingga terjadi inflamasi maka ekspresi COX-2 meningkat dan setelah diberikan EH-MSCs, ekspresi COX-2 menurun dan yang paling rendah pada K5 yang secara statistik sudah hampir menyamai dengan kelompok sehat (K1). Ekspresi COX-2 pada kelompok K3, K4, K5 menurun dibandingkan K2. Pada penelitian ini menandakan bahwa EH-MSCs dosis 200µg menurunkan ekspresi COX-2 secara signifikan, sehingga dengan penurunan COX-2 ini akan mempercepat peralihan dari fase inflamasi ke fase proliferasi. Apabila COX-2 diturunkan secara cepat maka penyembuhan akan berlangsung secara optimal.

Hasil analisis histologi menunjukkan bahwa pemberian eksosom, khususnya pada dosis 200 µg (K5), memberikan efek perbaikan jaringan kulit paling optimal dibandingkan kelompok kontrol negatif (K2), kontrol positif (K3 : sulfadiazine), dan kelompok perlakuan 100 µg (K4). Perbaikan tersebut dapat diamati pada keempat parameter histologis yang diukur: re-epitelisasi, akumulasi kolagen, jumlah fibroblas, dan infiltrasi sel radang.

1. Re-epitelisasi

Re-epitelisasi merupakan salah satu indikator penting pada proses penyembuhan luka yang menggambarkan pembentukan kembali lapisan epidermis di atas luka. Pada K2, kerusakan jaringan epidermis dan dermis tidak diikuti pembentukan epitel baru, mengindikasikan proses penyembuhan yang terhambat. Pada K3, terjadi perbaikan epitel meskipun tipis. K4 menunjukkan lapisan epitel yang lebih baik dibandingkan K3, sementara K5 hampir mencapai struktur kulit normal. Perbaikan pada kelompok eksosom, terutama K5, kemungkinan disebabkan oleh kandungan microRNA dan growth factor di dalam eksosom MSC, seperti miR-21, miR-29, dan vascular endothelial growth factor (VEGF), yang dapat merangsang proliferasi keratinosit dan migrasi sel epitel (Shabbir et al., 2015; Hu et al., 2016).

2. Akumulasi Kolagen

Kolagen merupakan komponen utama matriks ekstraseluler yang memberi kekuatan mekanik pada jaringan baru. Pada K2, kolagen sangat sedikit, sedangkan K3 mulai menunjukkan pembentukan kolagen namun jumlahnya rendah. K4 menunjukkan kolagen yang masih longgar dengan ukuran folikel rambut yang besar, menandakan jaringan masih berada pada fase inflamasi. K5 memperlihatkan kolagen yang lebih rapat dan merata, walaupun masih terdapat sedikit area longgar. Peningkatan sintesis kolagen pada kelompok eksosom diduga terkait peran Transforming Growth Factor- β (TGF- β) yang dibawa eksosom dalam mengaktivasi fibroblas untuk memproduksi kolagen tipe I dan III (Zhang et al., 2015).

3. Jumlah Fibroblas

Fibroblas adalah sel utama yang berperan dalam pembentukan matriks ekstraseluler dan remodeling jaringan. Jumlah fibroblas paling rendah ditemukan pada K1, sementara K5 memiliki jumlah fibroblas tertinggi dan distribusi yang merata. Peningkatan jumlah fibroblas pada kelompok eksosom konsisten dengan laporan bahwa eksosom MSC mengandung Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) dan miR-125b, yang dapat meningkatkan proliferasi fibroblas serta mempercepat transisi dari fase inflamasi ke fase proliferasi (Quiñones-Vico et al., 2021).

4. Infiltrasi Sel Radang

Pada fase inflamasi luka bakar, infiltrasi sel imun seperti neutrofil dan makrofag akan mendominasi jaringan luka. K2 menunjukkan akumulasi nanah sebagai tanda inflamasi berat, sedangkan K3 masih memiliki infiltrasi sel imun pada jaringan ikat. K4 hanya menunjukkan sedikit infiltrasi, dan K5 hampir tidak menunjukkan adanya infiltrasi sel imun. Hal ini sesuai dengan sifat imunomodulator eksosom MSC yang dapat menghambat aktivasi makrofag tipe proinflamasi (M1) serta meningkatkan peran makrofag antiinflamasi (M2) melalui transfer miR-146a dan TGF- β (Ti et al., 2015).

Secara keseluruhan, pemberian EH-MSCs, terutama pada dosis 200 μ L, mempercepat proses regenerasi jaringan melalui peningkatan re-epitelisasi, penataan ulang matriks kolagen, stimulasi pembentukan struktur kulit, dan penekanan respon inflamasi. Perbaikan histologis ini selaras dengan peningkatan ekspresi FGF dan penurunan ekspresi COX-2 yang ditemukan pada kelompok

perlakuan, menunjukkan bahwa efek EH-MSCs dimediasi oleh mekanisme pro-regeneratif dan antiinflamasi.

5.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan Penelitian

1. Model hewan percobaan

Penelitian menggunakan tikus Wistar sebagai model luka bakar derajat III. Hasil yang diperoleh mungkin tidak sepenuhnya merepresentasikan respons biologis pada manusia karena adanya perbedaan fisiologi kulit, ketebalan dermis, dan kapasitas regenerasi jaringan.

2. Durasi pengamatan terbatas

Evaluasi hanya dilakukan pada periode tertentu pasca luka. Penelitian ini belum menilai efek jangka panjang pemberian EH-MSCs terhadap pembentukan jaringan parut hipertrofik atau keloid.

3. Tidak dilakukan analisis molekuler lanjutan

Walaupun penelitian ini menilai ekspresi FGF dan COX-2, profil lengkap kandungan exosome (miRNA, protein, dan growth factors spesifik) tidak dianalisis. Hal ini membatasi pemahaman mekanisme molekuler secara detail.

4. Dosis dan frekuensi pemberian terbatas

Hanya digunakan dua dosis (100 µg dan 200 µg). Tidak dilakukan eksplorasi dosis optimal atau frekuensi pemberian yang paling efektif.

5. Tidak menilai interaksi dengan terapi standar

Penelitian ini belum membandingkan efek kombinasi EH-MSCs

dengan terapi luka bakar konvensional seperti balutan modern, atau skin graft, sehingga belum diketahui potensi sinergi atau antagonis.

6. Pengukuran hanya pada parameter tertentu

Variabel yang diukur terbatas pada ekspresi FGF, COX-2, dan histologi jaringan kulit. Parameter lain yang relevan seperti angiogenesis kuantitatif, kadar sitokin pro/anti-inflamasi, dan kekuatan mekanik kulit pasca sembuh belum dievaluasi.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi EH-MSC secara subcutan terhadap peningkatan ekspresi FGF dan penurunan ekspresi COX2 pada tikus jantan galur Wistar model luka bakar derajat III menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Terdapat pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap ekspresi FGF pada tikus wistar yang dipaparkan luka bakar derajat III.
- b. Pemberian EH-MSC dosis 100 μ dan 200 μ g secara subcutan berpengaruh terhadap Ekspresi FGF pada tikus wistar yang dipapar luka bakar derajat III.
- c. Terdapat pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap ekspresi COX-2 pada tikus wistar yang dipaparkan luka bakar derajat III.
- d. Pemberian EH-MSC 200 μ g secara subcutan berpengaruh terhadap Ekspresi COX-2 pada tikus wistar yang dipapar luka bakar derajat III.
- e. Pemberian EH-MSCs, secara histologi terutama pada dosis 200 μ L, mempercepat proses regenerasi jaringan melalui peningkatan re-epitelisasi, penataan ulang matriks kolagen, stimulasi pembentukan struktur kulit, dan penekanan respon inflamasi

6.2. Saran

- a. Translasi ke model manusia

Melakukan uji klinis bertahap pada manusia untuk mengevaluasi keamanan, dosis optimal, dan efektivitas EH-MSCs pada pasien luka bakar derajat III, mengingat perbedaan fisiologi kulit antara hewan coba dan manusia.

b. Pemanjangan periode pengamatan

Memperpanjang masa follow-up hingga fase remodeling akhir untuk menilai efek EH-MSCs terhadap pembentukan jaringan parut hipertrofik atau keloid, termasuk uji kekuatan mekanik kulit yang sembuh.

c. Analisis molekuler komprehensif

Melakukan profiling lengkap kandungan miRNA, protein, growth factors, dan lipid pada EH-MSCs menggunakan teknik seperti proteomik, RNA-seq, atau mass spectrometry untuk memahami mekanisme biologis secara detail.

d. Eksplorasi dosis dan regimen optimal

Menguji variasi dosis lebih luas, frekuensi pemberian berbeda, dan rute administrasi alternatif (topikal, intradermal, atau injeksi lokal) untuk menentukan protokol paling efektif dan efisien.

e. Kombinasi dengan terapi standar

Mengkaji potensi sinergi antara EH-MSCs dan metode penanganan luka bakar konvensional seperti balutan modern, agen topikal regeneratif, atau skin graft untuk mempercepat pemulihan dan mengurangi komplikasi.

f. Penambahan parameter penilaian

Memasukkan parameter tambahan seperti:

- 1) Profil sitokin pro/anti-inflamasi
- 2) Penilaian biomekanik kulit
- 3) Analisis histomorfometri untuk mengukur ketebalan lapisan kulit dan kepadatan kolagen secara objektif.



DAFTAR PUSTAKA

1. Bahçe ZŞ, Öztaş T. Epidemiological analysis of patients with burns in third-line hospitals in Turkey. *Int Wound J.* 2020 Oct;17(5):1439-1443. doi: 10.1111/iwj.13426. Epub 2020 Jun 9. PMID: 32515905; PMCID: PMC7948584.
2. WHO Media Center Fact Sheets: Burns [Internet]. 2018. Available from: <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/burns>
3. Ja, Garcia-Espinoza & Vb, Aguilar-Aragon & Eh, Ortiz-Villalobos & García-Manzano, Roberto & Aron, Jaime & García-Espinoza, Jaime. (2020). Burns: Definition, Classification, Pathophysiology and Initial Approach. *International Journal of General Medicine*. Volume 5. 2327-5146. 10.4172/2327- 5146.1000298.
4. Prihartini Widiyanti, Firza, Siswanto; Methylcellulose-AgNPs-oat hydrogel as a wound dressing for burn wound. *AIP Conf. Proc.* 29 January 2024; 3047 (1):050004. <https://doi.org/10.1063/5.0193673>
5. Rahmi, Nofita R. (2017) Pembuatan Film Balutan Primer Yang Mengandung Kolagen Kulit Ikan Gabus (*Channa Striata*) Dan Pengaruh Film Terhadap Penyembuhan Luka Bakar. Doctoral Thesis, Universitas Andalas. <http://scholar.unand.ac.id/id/eprint/26120>
6. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43. doi: 10.1159/000339613. Epub 2012 Jul 11. PMID:22797712.
7. Mathen, C., Mrunal, G.S., Raghubansh, G., Wilfrid, D., and Shilpa, G.K, 2021. Evaluation of potential application of Wharton's jelly-derived human mesenchymal stromal cells and its conditioned media for dermal regeneration using rat wound healing model. *Cells Tiss. Org*, 210(1), pp. 31–44.
8. Surowiecka A, Chrapusta A, Klimeczek-Chrapusta M, Korzeniowski T, Drukała J, Strużyna J. Mesenchymal Stem Cells in Burn Wound Management. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 5;23(23):15339. doi: 10.3390/ijms232315339. PMID: 36499664; PMCID: PMC9737138.
9. Zhou C, Zhang B, Yang Y, Jiang Q, Li T, Gong J, Tang H, Zhang Q. Stem cell- derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2023 Apr 26;14(1):107. doi: 10.1186/s13287-023-03345-0. PMID: 37101197; PMCID: PMC10134577.

10. Zeng QL, Liu DW. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: An emerging therapeutic strategy for normal and chronic wound healing. *World J Clin Cases*. 2021 Aug 6;9(22):6218-6233. doi: 10.12998/wjcc.v 9.i22.6218. PMID: 34434989; PMCID: PMC8362559.
11. Farooq M, Khan AW, Kim MS, Choi S. The Role of Fibroblast Growth Factor (FGF) Signaling in Tissue Repair and Regeneration. *Cells*. 2021 Nov 19;10(11):3242. doi: 10.3390/cells10113242. PMID: 34831463; PMCID: PMC8622657.
12. Mohammad Fathul Qorib, Abdul Khairul Rizki Purba1, Annete d'Arqom, Dinamika Ekspresi Cox1 dan Cox2 Sebagai Landasan Tatalaksana Nyeri dan Inflamasi. *Jurnal Kedokteran Unram* 2022,11(4):1233-1239 ISSN 2301-5977, e-ISSN 2527-7154
13. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, Zhang H, Hu Q, Du J. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS One*. 2014 Feb 20;9(2): e88348. doi: 10.1371/journal.pone.0088348. PMID: 24586314; PMCID: PMC3930522.
14. Rahayu, Tutik. "Penatalaksanaan Luka Bakar (Combustio)." *Profesi: Media Publikasi Penelitian*, vol. 8, Sep. 2012, doi:10.26576/profesi.11.
15. R Sjamsuhidajat, Wim De Jong, Buku Ajar Ilmu Bedah. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran, EGC; 2007
16. Moenajat, Yefta. *Luka Bakar : Pengetahuan Klinis Praktis*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2003
17. Zhang P, Zou B, Liou YC, Huang C. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury. *Burns Trauma*. 2021 Feb 4;9: tkaa047. doi: 10.1093/burnst/tkaa047. PMID: 33654698; PMCID: PMC7901709.
18. Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. Biologi luka bakar. *Exp Dermatol*. 2010 Sep; 19 (9):777-83.
19. Warby R, Maani CV. Klasifikasi Luka Bakar. [Diperbarui 26 September 2023]. Dalam: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan- Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539773/>
20. Abazari, Morteza & Ghaffari, Azadeh & Rashidzadeh, Hamid & Badeleh, Safa & Maleki, Yaser. (2020). A Systematic Review on Classification, Identification, and Healing Process of Burn Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 21. 153473462092485. 10.1177/1534734620924857.

21. Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Fase Penyembuhan Luka. [Diperbarui 12 Juni 2023]. Dalam: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>
22. Ninan N, Thomas S, Grohens Y. Penyembuhan luka dalam urologi. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Mar; 82-83 :93-105.
23. Bowden LG, Byrne HM, Maini PK, Moulton DE. Model morfoelastis untuk menutup luka dermal. *Mekanobiol Model Biomekan.* Juni 2016; 15 (3):663-81.
24. G. Bernardes, Beatriz & Del Gaudio, Pasquale & Alves, Paulo & Costa, Raquel & García-González, C.A. & Oliveira, Ana. (2021). Bioaerogels: Promising Nanostructured Materials in Fluid Management, Healing and Regeneration of Wounds. *Molecules.* 26. 3834. 10.3390/molecules26133834.
25. Farzin Sarkarat, Roozbeh Kahali, Fat Graft with Growth Factors, *Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, Volume 26, Issue 1, 2018, Pages 33-39, ISSN 1061-3315, ISBN 9780323581448, <https://doi.org/10.1016/j.cxom.2017.10.003>.
26. Litwack G. Bab 16—Hormon Steroid. Dalam: Litwack G., editor. *Biokimia Manusia*. Academic Press; Cambridge, MA, AS: 2018. hlm. 467–506.
27. Katoh M. Therapeutics Menargetkan Jaringan Sinyal FGF pada Penyakit Manusia. *Trends Pharmacol. Sci.* 2016;37: 1081-1096. doi: 10.1016/j.tips.2016.10.003.
28. DiPietro LA Angiogenesis dan perbaikan luka: Saatnya sudah cukup. *J. Leukoc. Biol.* 2016;100:979–984. doi: 10.1189/jlb.4MR0316-102R.
29. Chuma H., Mizuta H., Kudo S., Takagi K., Hiraki Y. Paparan FGF-2 selama satu hari cukup untuk perbaikan regeneratif cacat ketebalan penuh pada tulang rawan artikular pada kelinci. *Osteoarthr. Cartil.* 2004;12:834–842. doi: 10.1016/j.joca.2004.07.003.
30. Zhang C., Wang J., Xie Y., Wang L., Yang L., Yu J., Miyamoto A., Sun F. Pengembangan membran berserat poliuretan berbasis air elektrospun yang diisi FGF-2 untuk regenerasi tulang. *Regen. Biomater.* 2021;8:rbaa046. doi: 10.1093/rb/rbaa046.
31. Geesala, Ramasatyaveni et al. Cox-2 inhibition potentiates mouse bone marrow stem cell engraftment and differentiation-mediated wound repair, *Cytotherapy*, Volume 19, Issue 6, 756 - 770

32. Fu, R., Zhou, S., Liu, C. *dkk*. Pemberian kombinasi siRNA COX-2/TGF- β 1 menginduksi apoptosis fibroblas jaringan parut hipertrofik melalui jalur kaspase yang dimediasi TP53. *Sci Rep* **14** , 26427 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77756-1>
33. He LK, Liu LH, Hahn E, Gamelli RL. The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E2 in neutrophils after burn injury and infection. *J Burn Care Rehabil.* 2001 Jan-Feb;22(1):58-64. doi: 10.1097/00004630-200101000-00012. PMID: 11227686.
34. An T, Chen Y, Tu Y, Lin P. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Application and Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2021.
35. 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* [Internet]. 2021 Jun;56(3):433–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jre.12866>
36. Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(March):1–19.
37. Kazi T, Nagata A, Nakagawa T, Matsuzaki T, Inui S. Dermal Papilla Cell-Derived Extracellular Vesicles Increase Hair Inductive Gene Expression in Adipose Stem Cells via β -Catenin Activation. *Cells.* 2022;11(2).
38. Zhang X, Bao P, Zheng Q, Chu M, Liang C, Guo X, et al. Comparative Analysis of mRNA and miRNA Expression between Dermal Papilla Cells and Hair Matrix Cells of Hair Follicles in Yak. *Cells.* 2022;11(24).
39. Winkler I, Engler JB, Vieira V, Bauer S, Liu YH, Di Liberto G, et al. MicroRNA- 92a-CPEB3 axis protects neurons against inflammatory neurodegeneration. *Sci Adv.* 2023;9(47).
40. Liao Z, Zheng R, Shao G. Mechanisms and application strategies of miRNA - 146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). Vol. 51, *International Journal of Molecular Medicine.* 2023.
41. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol.* 2010;190(6):1079–91.
42. Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim IS, et al. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells

and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016;

43. Ruvolo PP, Jacamo R, Ruvolo VR, Burks JK, Battula VL, McQueen T, et al. Exosomes Mediate Communication Between the Microenvironment and Leukemic Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2012;120(21):3469–3469.
44. Qu Q, Pang Y, Zhang C, Liu L, Bi Y. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1).
45. Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, et al. Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction. *Stem Cells Int*. 2015;2015.
46. González-Cubero E, González-Fernández ML, Gutiérrez-Velasco L, Navarro-Ramírez E, Villar-Suárez V. Isolation and characterization of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*. 2021;238(5):1203–17.
47. Mingyao Wang, Xinxuan Xu, Xiongxin Lei, Jie Tan, Huiqi Xie, Mesenchymal stem cell-based therapy for burn wound healing, *Burns & Trauma*, Volume 9, 2021, tkab002,
48. Qu Q, Liu L, Wang L, Cui Y, Liu C, Jing X, Xu X. Exosomes derived from hypoxic mesenchymal stem cells restore ovarian function by enhancing angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2024 Dec 21;15(1):496. doi: 10.1186/s13287-024-04111-6. PMID: 39709481; PMCID: PMC11663355.
49. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar, 2013.
50. Gee Kee EL, Kimble RM, Cuttle L, Stockton KA. Scar outcome of children with partial thickness burns: A 3 and 6 month follow up. *Burns*. 2016 Feb;42(1):97-103. doi: 10.1016/j.burns.2015.06.019. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26546385.
51. Timby, Barbara and Smith, Nancy E. 2014. Introductory Medical Surgical Nursing Eleventh Edition. China: Lippincott William & Wilkins
52. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, Huang F, Zhang H, Chen L. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*. 2016 Sep 12;6:32993. doi: 10.1038/srep32993. Erratum in: *Sci Rep*. 2020 Apr 16;10(1):6693. doi: 10.1038/s41598-020-63068-7. PMID: 27615560;

PMCID: PMC5018733.

53. Ozaki-Okayama Y, Matsumura K, Ibuki T, Ueda M, Yamazaki Y, Tanaka Y, et al. Burn injury enhances brain prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase in cerebral vascular endothelial cells in rats. *Crit Care Med.* 2004;32:795–800.
54. Allahham A, Rowe G, Stevenson A, Fear MW, Vallence AM, Wood FM. The impact of burn injury on the central nervous system. *Burns Trauma.* 2024 Feb 1;12:tkad037. doi: 10.1093/burnst/tkad037. PMID: 38312739; PMCID: PMC10835674.
55. Liu J.-F., Crépin M., Barritault D., Ledoux D. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;293:1174–1182. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00350-9.
56. Abdelhakim M., Lin X., Ogawa R. The Japanese Experience with Basic Fibroblast Growth Factor in Cutaneous Wound Management and Scar Prevention: A Systematic Review of Clinical and Biological Aspects. *Dermatol. Ther.* 2020;10:569–587.
57. Jimi S., Jaguparov A., Nurkesh A., Sultankulov B., Saparov A. Sequential Delivery of Cryogel Released Growth Factors and Cytokines Accelerates Wound Healing and Improves Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:345.
58. Lee, BC., Kim, HS., Shin, TH. et al. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact. *Sci Rep* 6, 26298. 2016.
59. Wu L, Leijten J, van Blitterswijk CA, Karperien M. Fibroblast growth factor-1 is a mesenchymal stromal cell-secreted factor stimulating proliferation of osteoarthritic chondrocytes in co-culture. *Stem Cells Dev.* 2013 Sep 1;22(17):2356-67. doi: 10.1089/scd.2013.0118. Epub 2013 May 29. PMID: 23557133; PMCID: PMC3749707.
60. Jeschke, M.G., van Baar, M.E., Choudhry, M.A. et al. Burn injury. *Nat Rev Dis Primers* 6, 11 (2020).
61. Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, Sere YY, Coles A, Didiot MC, Wollacott R, Sapp E, Dubuke ML, Li X, Shaffer SA, DiFiglia M, Wang Y, Aronin N, Khvorova A. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Mol Ther.* 2018 Dec 5;26(12):2838-2847. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.015. Epub 2018 Sep 22. PMID: 30341012; PMCID: PMC6277553.
62. Farreell, Maureen. 2016. Smeltzer & Bare Textbook of MedicalSurgical

Nursing. New Zealand: Wolters Kluwer.

63. Hudak dan Gallo. 2012. Keperawatan Kritis: Pendekatan Asuhan Holistik Vol. 1. Jakarta: EGC.
64. Anggowarsito, Jose L. 2014. Luka Bakar Sudut Pandang Dermatologi. Jurnal Widya Medika Surabaya. 2(2): 115-120.
65. Moenadjat, Yefta. 2009. Luka Bakar: Masalah dan Tatalaksana. Jakarta: FKUI.
66. Oba, Jiro & Okabe, Motonori & Yoshida, Toshiko & Soko, Chika & Fathy, Moustafa & Amano, Koji & Kobashi, Daisuke & Wakasugi, Masahiro & Okudera, Hiroshi. (2020). Hyperdry human amniotic membrane application as a wound dressing for a full-thickness skin excision after a third-degree burn injury. *Burns & trauma*. 8. tkaa014. 10.1093/burnst/tkaa014.
67. Heyneman A, Hoeksema H, Vandekerckhove D, Pirayesh A, Monstrey S. The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. *Burns*. 2016 Nov;42(7):1377-1386. doi: 10.1016/j.burns.2016.03.029. Epub 2016 Apr 26. PMID:27126813.
68. Radzikowska-Büchner E, Łopuszyńska I, Flieger W, Tobiasz M, Maciejewski R, Flieger J. Gambaran Umum Perkembangan Terkini dalam Penatalaksanaan Cedera Luka Bakar. *Jurnal Internasional Ilmu Molekuler* . 2023; 24(22):16357.
69. A., Ruiz & C., Bracamontes-Gutierrez & A., Acosta & E., Leiva-Rodríguez & S., Siordia-Cruz & Alicia, Guerrero-Andrade & R., Banuelos-Castro & D., Romero-Rodríguez & J., Zavala-Mejía & Ericel, Hernández-Olivera. (2024). Comprehensive Care for Burn Patients. *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*. 04.
70. Wibowo, Erwin, et al. "Pengaruh Kombinasi Suplementasi Omega 3 dengan Kalori Restriksi terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Tikus Sprague Dawley Kajian pada: Tumor Nekrosis Faktor - Alfa dan Perbaikan Luas Luka Bakar." *Medica Hospitalia*, vol. 7, no. 1, 18 May. 2020, pp. 75-81, doi:10.36408/mhjcm. V7i1.432.
71. Jara CP, Wang O, Paulino do Prado T, et al. Novel fibrinfibronectin matrix accelerates mice skin wound healing[J]. *Bioact Mater*, 2020,5(4):949-962
72. Leong M, Phillips LG, 2012. Wound Healing. Dalam: *Sabiston Textbook of Surgery*. Edisi ke-19. Amsterdam: Elsevier Saunders; h. 984-92

73. Yang G, Waheed S, Wang C, Shekh M, Li Z, Wu J. Exosomes and Their Bioengineering Strategies in the Cutaneous Wound Healing and Related Complications: Current Knowledge and Future Perspectives. *Int J Biol Sci*. 2023 Feb 27;19(5):1430-1454. doi: 10.7150/ijbs.80430. PMID: 37056923; PMCID: PMC10086759.
74. Zhao B, Zhang Y, Han S, Zhang W, Zhou Q, Guan H. et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J Mol Histol*. 2017;48:121–32
75. Shi H, Wang M, Sun Y, Yang D, Xu W, Qian H. Exosomes: Emerging Cell-Free Based Therapeutics in Dermatologic Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:736022.
76. Uswatun Hasanah, Andi Alamsyah Irwan, Rusli Malli, Tingkat pengetahuan tentang penanganan luka bakar pada Tim Bantuan Medis, <https://jurnal.arkainstitute.co.id/index.php/florona/index>
77. Amira Allahham, Grant Rowe, Andrew Stevenson, Mark W Fear, Ann-Maree Vallence, Fiona M Wood, Dampak luka bakar pada sistem saraf pusat, *Luka Bakar & Trauma*, Volume 12, 2024, tkad037, <https://doi.org/10.1093/burnst/tkad037>
78. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Pengembangan dan penggunaan biomaterial sebagai terapi penyembuhan luka. *Trauma Luka Bakar*. 2019;7(2) doi: 10.1186/s41038-018-0139-7.
79. Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Fibroblas dermal dalam perkembangan dan penyembuhan kulit. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018;7(e307) doi: 10.1002/wdev.307.
80. Zhuang S, Chai J, Liu L, Yin H, Yu Y. Effect of celecoxib in treatment of burn-induced hypermetabolism. *Biosci Rep*. 2020 Apr 30;40(4):BSR20191607. doi: 10.1042/BSR20191607. PMID: 32285919; PMCID: PMC7189361.
81. Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Fase Penyembuhan Luka. [Diperbarui 12 Juni 2023]. Dalam: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>
82. Deng, C., Dong, K., Liu, Y. dkk. Eksosom turunan sel punca mesenkimal hipoksia meningkatkan kelangsungan hidup flap kulit setelah cedera iskemia-reperfusi melalui jalur mTOR/ULK1/FUNDC1. *J Nanobiotechnol* 21, 340 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02098-5>

83. Tran-Nguyen TM, Le KT, Nguyen LT, Tran TT, Hoang-Thai PC, Tran TL, Tan SL, Tran-Van H. Third-degree burn mouse treatment using recombinant human fibroblast growth factor 2. *Growth Factors*. 2020 Dec;38(5-6):282-290. doi: 10.1080/08977194.2021.1967342. Epub 2021 Aug 20. PMID:34415815.
84. Hahn EL, Tai HH, He LK, Gamelli RL. Burn injury with infection alters prostaglandin E2 synthesis and metabolism. *J Trauma*. 1999 Dec;47(6):1052-7; discussion 1057-9. doi: 10.1097/00005373-199912000-00010. PMID:10608532.
85. Li X, Liu L, Yang J, Yu Y, Chai J, Wang L, Ma L, Yin H. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine*. 2016 Jun;8:72-82. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.030. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27428420; PMCID: PMC4919539.
86. Romana-Souza B, Santos JS, Bandeira LG, Monte-Alto-Costa A. Selective inhibition of COX-2 improves cutaneous wound healing of pressure ulcers in mice through reduction of iNOS expression. *Life Sci*. 2016 May 15;153:82-92. doi: 10.1016/j.lfs.2016.04.017. Epub 2016 Apr 14. PMID: 27091651.

