

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-MSCs) TERHADAP
EKSPRESI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA*
(TGF- β) DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH*
FACTOR (VEGF)**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Wistar
dengan Model Luka Bakar Derajat III)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Irfan Prasetya Yoga
MBK.24.23.010451

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

**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS (EH-*MSCs*) TERHADAP
EKSPRESI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA*
(*TGF-β*) DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH*
FACTOR (VEGF)**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Wistar
dengan Model Luka Bakar Derajat III)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Irfan Prasetya Yoga
MBK.24.23.010451

**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 *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* (TGF- β) DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR* (VEGF)

**(Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Wistar
Dengan Model Luka Bakar Derajat III)**

Disusun oleh :

**Irfan Prasetya Yoga
MBK 2423010451**

Yang dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 27 Agustus 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima.

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Dr.dr.Hj. Chodidjah, M.Kes
NIK. 210186023

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, 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 disuatu perguruan tinggi dan lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.



Semarang, Agustus 2025

Irfan Prasetya Yoga

MBK.24.23.010451

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Irfan Prasetya Yoga
Tempat / Tanggal lahir : Bantul, 29 September 1988
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. TK. PKK 21 : Lulus tahun 1994
2. SDN Monggang : Lulus tahun 2000
3. SLTPN 2 Bantul : Lulus tahun 2003
4. SMA 8 Yogyakarta : Lulus tahun 2006
5. S1 Fakultas Kedokteran UNS : Lulus tahun 2010
6. Profesi Dokter UNS : Lulus tahun 2013
7. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2024 – sekarang)

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Istri : Kris Nurhayati, S.Kep, M.M., Ns.
2. Nama Anak : - Chelsea Lakeisha Yoga
- Shaqueena Elshanum Yoga
- Axel Oscarrayan Yoga

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga tesis dengan judul “**PENGARUH PEMBERIAN *EXOSOME* *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* (TGF- β) DAN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR* (VEGF) (Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Wistar dengan Model Luka Bakar Derajat III)” ini dapat penulis selesaikan.**

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada:

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. H. Gunarto, SH, MH.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak DR. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH., sekaligus dosen penguji I, terimakasih atas segala masukan dan saran membangun dalam proses pembuatan Tesis.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS dan selaku dosen pembimbing I yang telah bersedia membimbing, mengarahkan, dan meluangkan waktu kepada penulis untuk berdiskusi selama proses penyusunan Tesis.

4. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
5. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes, selaku dosen penguji II, terimakasih atas segala masukan, arahan, dan kritik yang membangun dalam penulisan naskah Tesis ini.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes, selaku dosen penguji III, terimakasih atas segenap waktunya dalam memberikan kritik, beserta saran positif yang tentunya sangat berharga dalam proses penyusunan naskah Tesis ini.
7. Seluruh tenaga pendidik beserta seluruh staff administrasi Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, atas segala dukungannya.
8. Segenap staff dan dokter / dokter hewan di laboratorium Stem Cell & Cancer Research Center (SCCR) dan Animal Model Research Center Semarang.
9. Ucapan paling spesial untuk istriku tercinta, Kris Nurhayati, S.Kep, M.M, Ns., yang tak pernah lelah mendampingi, menguatkan, menyemangati, juga teruntuk ibu saya tercinta, Sumaryatun, S.Pd, M.Pd, juga almarhum ayah, Rochmadi, dan seluruh keluarga yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doa-doanya.
10. Dewi Fitrianingrum, Christiani Natalia Soemitha, Fanni Yuniar; rekan kelompok penelitian tesis ini, kalian dokter hebat yang tak akan pernah saya lupa. Semoga keberkahan gelar Magister Biomedik ini membersamai kita semua.

11. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

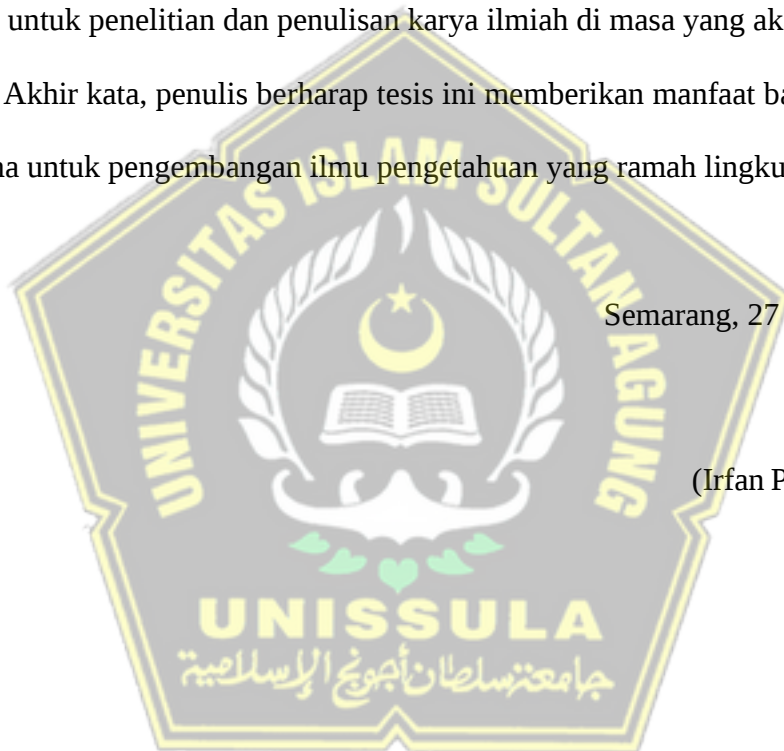
Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar proposal tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

Semarang, 27 Agustus 2025

Penulis

(Irfan Prasetya Yoga)



DAFTAR ISI

JUDUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN.....	iv
RIWAYAT HIDUP.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Umum	4
1.3.2 Khusus	4
1.4 Originalitas Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
1.5.1 Teoritis	6
1.5.2 Praktis	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 <i>Transforming Growth Factor Beta</i> (TGF- β)	8
2.2 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	10
2.3 Hubungan <i>Exosome EH-MSCs</i> (EH-MSC) dengan Ekspresi TGF- β dan VEGF.....	12
2.4 Luka Bakar	13
2.5 Luka Bakar Derajat III	19
2.6 Penyembuhan Luka.....	20
2.7 Terapi Standar Luka Bakar Derajat III.....	24

	2.8 Hypoxia	24
	2.9 Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSCs)	25
III.	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	30
	3.1 Kerangka Teori	30
	3.2 Kerangka Konsep	32
	3.3 Hipotesis.....	33
IV.	METODE PENELITIAN	34
	4.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian	34
	4.2 Variabel penelitian dan Definisi Operasional	35
	4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	38
	4.4 Besar sampel	39
	4.5 Alat dan Bahan	40
	4.6 Cara Penelitian.....	41
	4.7 Alur penelitian	44
	4.8 Analisa Data	44
	4.9 Tempat dan Waktu Penelitian.....	45
V.	HASIL PENELITIAN & PEMBAHASAN	46
	5.1 Hasil Penelitian	46
	5.1.1 Hasil Validasi EH-MSC.....	46
	5.1.2 Hasil Validasi Luka Bakar	48
	5.1.3 Ekspresi TGF- β	50
	5.1.4 Ekspresi VEGF	52
	5.2 Pembahasan Hasil Penelitian	54
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	57
	6.1 Kesimpulan	57
	6.2 Saran.....	58
	DAFTAR PUSTAKA	59
	Lampiran	69

DAFTAR SINGKATAN

CD9	:	<i>Cluster Of Differentiation 9</i>
CD63	:	<i>Cluster Of Differentiation 63</i>
CD81	:	<i>Cluster Of Differentiation 81</i>
DAMPS	:	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
EH	:	<i>Exosome Hipoxia</i>
EH-MSCs	:	<i>Exosome Hipoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
FBS	:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HIF-1 α	:	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i>
IL-1	:	<i>Interleukin 1</i>
IL-6	:	<i>Interleukin 6</i>
M1	:	<i>Macrophages 1</i>
M2	:	<i>Macrophages 2</i>
MAPK-ERK	:	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellular signal Regulated Kinase</i>
miRNA	:	<i>Micro Ribonucleic Acid</i>
MSC	:	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MSCs	:	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NF-kB	:	<i>Nuclear Factor-Kappa Beta</i>
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K-Akt	:	<i>Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Akt</i>
SMAD	:	<i>Sma and Mad-related proteins</i>
TGF- β	:	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TLR	:	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	:	<i>Tumor Necrosing Factor-alpha</i>
VEGF	:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.4 Originalitas Penelitian	5
Tabel 5.1 Hasil Deskripsi Rerata Ekspresi TGF- β dan Uji One Way Anova	50
Tabel 5.2 Uji Post Hoc Tamhane Ekspresi TGF- β	51
Tabel 5.3 Hasil deskripsi rerata Ekspresi VEGF dan uji One way Anova...	52
Tabel 5.4 Uji Post Hoc Tamhane Ekspresi VEGF	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Zona luka bakar	16
Gambar 2.2 Klasifikasi Luka Bakar	17
Gambar 2.3 Makro dan Mikroskopis Luka Bakar Derajat III	19
Gambar 2.4 Representasi Skematis Tahapan Penyembuhan Luka.....	21
Gambar 3.1. Kerangka Teori	32
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	32
Gambar 4.1. Rancangan Penelitian	34
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	44
Gambar 5.1 (A) Morfologi MSC (B) Analisis flow cytometry	47
Gambar 5.2. (A) Kemampuan MSCs berdiferensiasi (B) adiposit pada pewarna Oil-red O	48
Gambar 5.3 Kondisi permukaan kulit punggung tikus Wistar (B) tikus yang diinduksi luka bakar	49
Gambar 5.4 Hasil mikroskopik jaringan kulit tikus sehat vs luka bakar derajat III	50
Gambar 5.5 Gambar Grafik Ekspresi TGF- β	52
Gambar 5.6 Gambar Grafik Ekspresi VEGF.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Etik Penelitian	69
Lampiran 2. Surat Keterangan Hasil Penelitian	70
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian	73
Lampiran 4. Statistik Ekspresi TGF- β dan VEGF menggunakan SPSS	78



ABSTRAK

Latar Belakang: Luka bakar derajat III merupakan cedera jaringan hingga lapisan subkutis, sering menimbulkan komplikasi berupa infeksi, penyembuhan yang lambat, serta jaringan parut yang luas. Terapi cangkok kulit adalah pilihan, tetapi memiliki keterbatasan. *Exosome* dari *Mesenchymal Stem Cells* dalam kondisi hipoksia (EH-MSCs) mengandung miRNA dan *growth factors* yang berperan dalam modulasi inflamasi, stimulasi angiogenesis, dan remodeling jaringan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada model luka bakar derajat III tikus Wistar.

Metode: Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan *post-test only control group design* pada 30 ekor tikus Wistar jantan, dibagi menjadi lima kelompok: K1 (kontrol sehat), K2 (luka bakar + NaCl), K3 (luka bakar + SSD), K4 (luka bakar + EH-MSCs 100 $\mu\text{g/mL}$), dan K5 (luka bakar + EH-MSCs 200 $\mu\text{g/mL}$). Luka bakar derajat III dibuat secara termal, dan *exosome* diberikan injeksi sekitar lesi pada jam ke-1, 24, dan 72 pasca-luka. Analisis ekspresi TGF- β dan VEGF dilakukan pada hari ke-5 dengan qRT-PCR.

Hasil: Ekspresi TGF- β meningkat signifikan ($p < 0,05$) pada K4 dan K5 dibanding kontrol, menandakan peran EH-MSCs dalam mendukung fase proliferasi dan pergeseran makrofag M1 ke M2. Ekspresi VEGF meningkat signifikan pada K4, tetapi tidak pada K5, meskipun reratanya lebih tinggi.

Kesimpulan: Pemberian EH-MSCs dosis 100 $\mu\text{g/mL}$ efektif meningkatkan VEGF dan TGF- β , sedangkan dosis 200 $\mu\text{g/mL}$ hanya signifikan pada TGF- β . Temuan ini mendukung potensi EH-MSCs sebagai terapi adjuvan pada luka bakar derajat III.

Kata Kunci: *Exosome*, *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*, Luka Bakar Derajat III, TGF- β , VEGF.

ABSTRACT

Background: Third-degree burns are severe injuries that extend into the subcutaneous tissue, often complicated by infection, delayed healing, and excessive scarring. Skin grafting is a treatment option but has limitations. Exosomes derived from Mesenchymal Stem Cells under hypoxic conditions (EH-MSCs) contain miRNAs and growth factors that modulate inflammation, stimulate angiogenesis, and support tissue remodeling. This study evaluated the effect of EH-MSC exosomes on Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression in a third-degree burn model in Wistar rats.

Methods: An experimental study with a post-test only control group design was performed on 30 male Wistar rats, divided into five groups: K1 (healthy control), K2 (burn + NaCl), K3 (burn + SSD), K4 (burn + EH-MSCs 100 μ g/mL), and K5 (burn + EH-MSCs 200 μ g/mL). Burns were thermally induced, and exosomes were injected around the lesion at 1, 24, and 72 hours post-injury. On day 5, TGF- β and VEGF expression were analyzed using qRT-PCR.

Results: TGF- β expression significantly increased ($p < 0.05$) in both treatment groups (K4 and K5) compared with controls, suggesting EH-MSCs support the proliferative phase and macrophage polarization from M1 to M2. VEGF expression increased significantly in K4, but not in K5, despite higher mean values.

Conclusion: EH-MSCs at 100 μ g/mL effectively increased both VEGF and TGF- β , while the 200 μ g/mL dose was significant only for TGF- β . These findings highlight EH-MSCs as a potential adjuvant therapy for third-degree burn wounds.

Keywords: Exosome, Hypoxia Mesenchymal Stem Cells, Third-Degree Burns, TGF- β , VEGF.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka bakar derajat III memiliki karakteristik kerusakan yang menyeluruh dari seluruh lapisan kulit, bahkan sampai jaringan di bawahnya, hingga seringkali berujung pada pembentukan jaringan scars ataupun kejadian mati rasa akibat adanya kerusakan saraf.¹ Cangkok kulit seringkali diperlukan pada kondisi ini.² Namun, metode ini memiliki keterbatasan, mengingat sumber donor kulit autologous sangat terbatas, apalagi pada area luka bakar yang luas.³ Hal ini mendorong beragam upaya lain dalam memperbaiki tatalaksananya, termasuk penelitian terdahulu yang mengungkap potensi sel punca beserta *exosome*-nya, yang memiliki manfaat positif dalam penyembuhan luka^{4,5}, yang dalam prosesnya melibatkan beragam mekanisme kompleks, beberapa diantaranya yakni keberadaan sitokin sentral TGF- β yang mendorong proliferasi dan remodeling,⁶ serta VEGF yang memicu vaskulogenesis dan angiogenesis.⁷ Penggunaan *Exosome Hypoxia* (EH) dari sel punca tentunya kian meningkatkan efektifitas peranan ini.⁸ Meski demikian, belum dijumpai kajian peranan EH terhadap ekspresi TGF- β dan VEGF, khususnya pada luka bakar derajat III.

Data dari Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengungkapkan bahwa terdapat lebih dari 180.000 kasus kematian akibat luka bakar di dunia setiap tahunnya.⁹ Sedang *Bi-National Burn Repository of Australian and New Zealand Burn Association* (ANZBA) menunjukkan angka kejadian luka bakar dari tahun

2021-2024 mencapai 8.969 orang.¹⁰ Selain itu, lebih dari 30.000 kasus baru terjadi setiap hari.¹¹ Secara keseluruhan penyebab luka bakar 79.303 kasus (42,6%) disebabkan oleh api dan sebesar 63.247 kasus (34%) oleh cairan panas.¹² Sedangkan menurut data penelitian RS Cipto Mangunkusumo menunjukkan pada tahun 2013 hingga 2015, 82,3% korban luka bakar terjadi pada anak usia 1 hingga 4 tahun. Luka bakar yang paling banyak terjadi adalah luka bakar derajat II dengan prevalensi sebesar 73% dari seluruh luka bakar.¹³ Kejadian luka bakar derajat III diduga lebih sedikit terjadi dibandingkan luka bakar derajat II. Meski insiden luka bakar derajat III relatif lebih jarang terjadi, morbiditas dan mortalitas yang ditimbulkan ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan luka bakar derajat lain yang lebih rendah, potensi kondisi scar yang lebih berat,¹⁴ waktu penyembuhan luka yang lebih lama, sehingga mengakibatkan terjadinya peningkatan resiko infeksi,¹⁵ serta biaya yang cukup besar baik untuk perawatan, rekonstruksi fungsional, maupun estetikanya.¹⁶

Studi yang dilakukan oleh Han, G. *et al.* menyoroti peran utama TGF- β dalam memediasi penyembuhan luka bakar, khususnya yang diarahkan pada keratinosit dan respons fibroblas. Hasilnya menunjukkan kemampuan untuk meningkatkan pemulihan luka melalui migrasi epitel dan kontraksi dasar luka dapat secara signifikan meningkatkan hasil klinis luka.⁶ Di sisi lain, Ruan Q, *et al.* mengungkapkan bahwa VEGF merupakan mediator penting dari proses inflamasi, dan konsentrasi VEGF yang tinggi dikaitkan dengan tingkat disfungsi organ, dan peningkatan kadar VEGF dikaitkan dengan terjadinya kondisi luka bakar.⁷ Keduanya, baik TGF- β dan VEGF merupakan protein

penting yang berperan dalam proses penyembuhan luka. Penelitian terdahulu pada tikus yang dibuat luka bakar derajat III membuktikan bahwa terdapat perbaikan penyembuhan luka dengan menggunakan *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs).¹⁷ Meski demikian, belum ada penelitian menggunakan *exosome*, terutama *exosome hypoxia* MSCs (EH-MSCs), pada tikus dengan luka bakar derajat III, yang menyoroti ekspresi TGF- β dan VEGF.

Exosome yang disekresikan oleh MSCs berperan dalam memodulasi Ekspresi TGF- β dan VEGF selama proses penyembuhan luka bakar derajat III. Dengan mengatur ekspresi kedua faktor ini, *exosome* MSCs dapat mempercepat penyembuhan luka, mendorong angiogenesis, dan mencegah pembentukan jaringan parut yang berlebihan.^{18,19} Meski telah diketemukan bukti-bukti terkait peranan MSCs pada penyembuhan luka, hingga kini belum dijumpai penelitian-penelitian lanjutan menggunakan EH-MSCs terhadap luka bakar, terutama pada luka bakar derajat III. Guna menjawab tantangan ini, tentu diperlukan penelitian-penelitian yang berkontribusi dalam mengungkap peranan tersebut, dan penelitian yang akan dilakukan ini diharapkan dapat menjadi salah satu studi yang turut bersumbangsih dalam membuka wawasan terkait penggunaan EH-MSCs dalam potensinya terkait proses penyembuhan luka. Studi ini bermaksud membuktikan pengaruh EH-MSCs pada ekspresi TGF- β dan VEGF pada tikus wistar dengan model luka bakar derajat III.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β dan VEGF pada tikus wistar dengan 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 EH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β dan VEGF pada tikus wistar dengan model luka bakar derajat III.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi TGF- β antar kelompok EH-MSCs 100 μ g/ml dan 200 μ g/ml dengan kelompok kontrol pada tikus wistar dengan model luka bakar derajat III.
- Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan ekspresi VEGF antar kelompok EH-MSCs 100 μ g/ml dan 200 μ g/ml dengan kelompok kontrol pada tikus wistar dengan model luka bakar derajat III.

1.4 Originalitas Penelitian

Tabel 1.4 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 <i>hypoxia</i> 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, disamping 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 Priyadarsi, et al 2023	<i>Effect of combination of photobiomodulation 904 nm superpulsed laser therapy and Hippophae rhamnoides L. on third-degree burn wound healing</i>	Terapi fotobiomodulasi (PBMT) dan pemberian ekstrak <i>seabuckthorn</i> (SBTL-ALE)	Perawatan ganda (PBMT + SBTL-ALE) mempercepat penyembuhan luka bakar tingkat tiga pada tikus, yang dapat membuka jalan bagi strategi terapi multimode untuk penanganan luka bakar dan perawatan kosmetik kulit.
3.	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 kontrol dan kelompok yang diberi perawatan lainnya. Studi histologis menunjukkan peningkatan signifikan pada ketebalan total lapisan dermal dan epidermis kulit pada kelompok eksperimen ini 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 EH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β dan VEGF untuk penyembuhan luka bakar derajat III pada model 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 EH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β dan VEGF pada Tikus Wistar dengan model luka bakar derajat III.

1.5.2 Manfaat Praktis

- Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna bagi masyarakat mengenai kegunaan EH-MSCs untuk perlindungan kulit.
- Bagi praktisi kesehatan, temuan ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi EH-MSCs sebagai agen antiperadangan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

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

2.1.1. Definisi

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) adalah sekelompok protein yang memiliki andil penting dalam pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi sel.²⁰ TGF- β dijumpai dalam bentuk tiga isoform utama: TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3. Isoform-isoform ini memiliki ukuran molekul sekitar 25 kDa. Gen yang mentranskripsikan TGF- β adalah TGFB1, TGFB2, dan TGFB3 masing-masing untuk TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3. TGF- β merupakan bagian dari keluarga besar TGF- β *superfamily*, yang juga mencakup protein lain seperti *activins*, *inhibins*, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), dan *growth differentiation factors* (GDFs).^{21,22} Protein-protein ini terlibat dalam berbagai proses biologis, termasuk embriogenesis, homeostasis jaringan, dan respon imun.²³

2.1.2. Peran TGF- β Pada Luka Bakar

TGF- β adalah keluarga faktor pertumbuhan yang terlibat dalam sejumlah fungsi seluler penting. Tiga isoform TGF- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3) disekresikan sebagai prekursor laten tidak aktif yang memerlukan aktivasi sebelum mengikat reseptor TGF- β . TGF- β terlibat dalam sejumlah proses dalam penyembuhan luka: peradangan, stimulasi angiogenesis, proliferasi fibroblas, sintesis kolagen dan pengendapan dan pemodelan ulang matriks ekstraseluler baru.²⁴

TGF- β 1 merupakan isoform dominan pada sebagian besar jaringan dan sangat melimpah pada trombosit. Setelah cedera, Ekspresi TGF- β 1 dilepaskan dari trombosit yang mengalami degranulasi. Namun, Ekspresi TGF- β dalam jaringan luka kemudian diproduksi oleh sejumlah jenis sel lain yang ada dalam luka, termasuk makrofag, keratinosit, fibroblas, dan sel endotel. TGF- β bertindak melalui mekanisme autokrin dan parakrin untuk mengatur interaksi antara sel dan antara sel dan matriks dalam penyembuhan luka, yang melibatkan peradangan, angiogenesis, dan produksi matriks ekstraseluler. Aplikasi TGF- β eksogen-baik secara lokal maupun sistemik telah ditemukan dapat mempercepat penyembuhan, terutama pada luka kronis luka yang rusak.

TGF- β adalah keluarga faktor pertumbuhan yang terlibat dalam sejumlah fungsi seluler penting. Tiga isoform TGF- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3) disekresikan sebagai prekursor laten tidak aktif yang memerlukan aktivasi sebelum mengikat reseptor TGF- β . Ketiga isoform diyakini mengikat dan memberi sinyal melalui dua reseptor TGF- β (T β RI dan T β RII). T β RII difosforilasi secara konstitutif dan pada pengikatan ligan, memfosforilasi T β RI. Fosforilasi kompleks reseptor mengaktifkan jalur pensinyalan intraseluler SMAD melalui reseptor Smad (Smad-2 dan Smad-3) dan co-Smad 4. Reseptor SMAD dan Smad-4 melintasi membran nukleus tempat mereka mengatur sejumlah gen.²⁴

2.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

2.2.1. Definisi

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah keluarga glikoprotein homodimerik yang secara struktural terkait dengan faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit (PDGF), yang mencakup faktor pertumbuhan plasenta (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-E. Keluarga protein VEGF ini mengikat secara selektif dengan afinitas yang berbeda ke setidaknya lima reseptor yang berbeda. Tiga di antaranya termasuk dalam superfamili reseptor tirosin kinase dan disebut reseptor VEGF-1 (VEGFR-1), juga disebut Flt-1 (tirosin kinase 1 mirip fms), VEGFR-2, juga disebut KDR (*kinase insert-domain containing receptor*) pada manusia, dan Flk-1 (*fetal liver kinase 1*) pada hewan pengerat, masing-masing, serta VEGFR-3, juga disebut Flt-4. Reseptor keempat dan kelima adalah neuropilin-1 dan neuropilin-2.²⁵

2.2.2. Peran VEGF pada Penyembuhan Luka Bakar

Faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) diproduksi oleh berbagai jenis sel, termasuk monosit, makrofag, dan sel endotel. Menurut imunohistokimia, VEGF sebagian besar diekspresikan dalam monosit selama fase eksudasi luka bakar. Kemokin dan sitokin telah ditemukan sangat penting dalam tahap awal infiltrasi leukosit-endotel, dan VEGF telah terbukti meningkatkan fungsi monosit. Perlekatan sel endotel memungkinkan transmigrasi melintasi endotelium dan aktivasi respons inflamasi. Reseptor VEGF (VEGFR-1 dan VEGFR-2) sebagian besar

diekspresikan oleh sel endotel vaskular (EC) dan memediasi efek biologis VEGF. Ketika VEGF mengikat salah satu reseptor ini, ia menstimulasinya dan menyebabkan pensinyalan intraseluler. Meskipun VEGFR-1 memiliki afinitas tinggi terhadap VEGF, ia memiliki fosforilasi tirosin yang jauh lebih rendah sebagai respons terhadap VEGF daripada VEGFR-2; oleh karena itu, VEGFR-2 dianggap memediasi sebagian besar efek fungsionalnya.

Proliferasi keratinosit dan homeostasis sawar epidermis berpotensi dipengaruhi oleh VEGF. Penyembuhan luka bakar adalah proses biologis multistap yang mencakup hemostasis, inflamasi, proliferasi sel, dan diferensiasi. Angiogenesis/vaskulogenesis, permeabilitas vaskular, proliferasi dan migrasi sel endotel, serta perlekatan leukosit, semuanya dirangsang oleh kolagen VEGF.⁷

Selama penyembuhan luka, trombosit, makrofag, fibroblas, dan keratinosit mengeluarkan VEGF yang bekerja secara parakrin pada sel endotel, menginduksi dan mendukung angiogenesis luka. Aktivasi reseptor faktor pertumbuhan endotel vaskular 1 dan 2 oleh VEGF memicu beberapa kondisi agar angiogenesis berhasil selaman proses perbaikan cedera. Ini termasuk peningkatan permeabilitas vaskular; degradasi membran dasar oleh uPA dan aktivator plasminogen tipe jaringan, MMP-1 dan MMP-2; migrasi endotel yang dimediasi oleh reseptor integrin $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 1\beta 1$, dan $\alpha 2\beta 1$ dan ligannya dan proliferasi sel vaskular di dalam dasar luka.⁷ Faktor pertumbuhan endotel vaskular bersama dengan PLGF mengambil bagian

dalam mobilisasi sel progenitor endotel (EPC) yang mengekspresikan VEGFR-2 ke dalam sirkulasi.²⁶

2.3. Hubungan EH-MSCs dengan Ekspresi TGF- β dan VEGF

Exosome yang dihasilkan dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) dalam kondisi hipoksia diketahui membawa berbagai molekul bioaktif, termasuk microRNA (miRNA), protein, serta faktor pertumbuhan, yang berperan penting dalam proses regenerasi jaringan. Pada model luka bakar derajat III, kandungan tersebut terbukti mampu memodulasi ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), dua mediator kunci dalam penyembuhan luka.⁶⁻⁸

EH-MSCs mengandung miRNA yang berperan dalam menekan over-ekspresi TGF- β berlebih. Hal ini penting untuk mencegah terjadinya fibrosis yang berlebihan. Selain itu, jalur sinyal TGF- β melalui aktivasi SMAD2/3 mampu mendorong fibroblas memproduksi kolagen dan matriks ekstraseluler sehingga mempercepat fase remodeling luka.²⁴

Peningkatan VEGF. Kondisi hipoksia yang mendasari pembentukan EH-MSCs mendorong peningkatan *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α). Faktor ini menstimulasi produksi VEGF oleh fibroblas, makrofag, dan sel epitel, yang selanjutnya mengaktivasi jalur MAPK-ERK dan PI3K-Akt untuk mempercepat angiogenesis. Hasilnya adalah peningkatan perfusi jaringan dan percepatan perbaikan luka.²⁷⁻²⁹

Sejumlah penelitian mendukung peran EH-MSCs dalam modulasi TGF- β dan VEGF. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa EH-MSCs

dapat meningkatkan ekspresi TGF- β secara signifikan serta memberikan tren peningkatan VEGF pada luka bakar derajat III.¹⁷⁻¹⁹ Hasil ini sejalan dengan temuan Han G et al. yang menegaskan bahwa TGF- β berperan penting dalam migrasi epitel dan kontraksi dasar luka⁶, sedangkan Ruan Q et al. menekankan peran VEGF dalam angiogenesis pasca luka.⁷ Dengan demikian, exosome EH-MSCs berpotensi mempercepat peralihan fase inflamasi ke fase proliferasi, sekaligus memiliki kemungkinan menekan pembentukan jaringan parut berlebihan.

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 (*electric*), zat kimia (*chemical*), atau radiasi (*radiation*).³⁰ 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.³¹

2.4.2. Faktor-Faktor yang Dapat Menyebabkan Luka Bakar:³⁰

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 kontak 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.

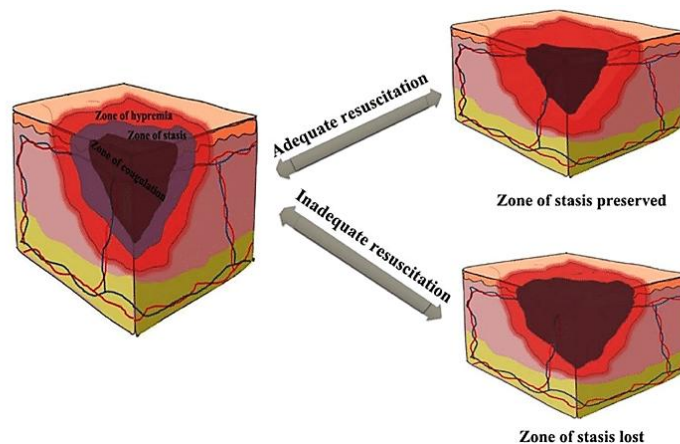
2.4.3. Etiopatogenesis Luka Bakar

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.³² 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.^{32,33} Fase lanjut berlangsung setelah fase subakut hingga pasien sembuh. Penyulit pada fase ini adalah parut yang hipertrofik, keloid gangguan pigmentasi, deformitas dan timbulnya kontraktur.³³

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:³



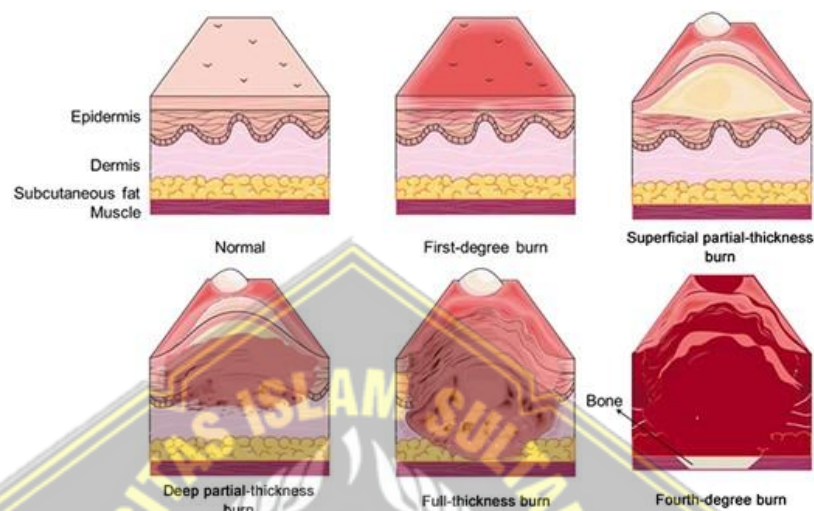
Gambar 2.1 Zona luka bakar ²⁰

- 1) Zona koagulasi, mewakili area nekrosis dengan kerusakan jaringan ireversibel yang terjadi pada saat cedera
- 2) 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
- 3) 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.³ 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 menurut Kriteria Luka Bakar Amerika.³⁴



Gambar 2.2 Klasifikasi Luka Bakar³⁵

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.³⁶

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.

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.³⁶

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.³⁶

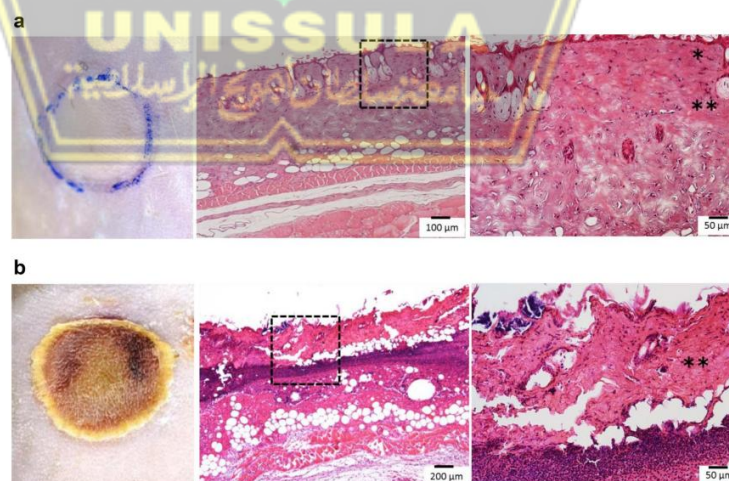
d. Luka bakar meluas ke jaringan yang lebih dalam (*Charring Injury*)

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.³

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.³⁷ Selain itu, luka bakar derajat III juga ditandai dengan adanya eskar.³⁸ 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 epitelialisasi secara spontan.³⁹ Berdasarkan alasan tersebut eskar harus dihilangkan atau dikelupas agar terjadi proses penyembuhan luka.³²

2.5.1. Gambaran histologis luka bakar derajat III.⁴⁰



Gambar 2.3 Makro dan mikroskopis luka bakar derajat tiga.⁴⁰

- 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.

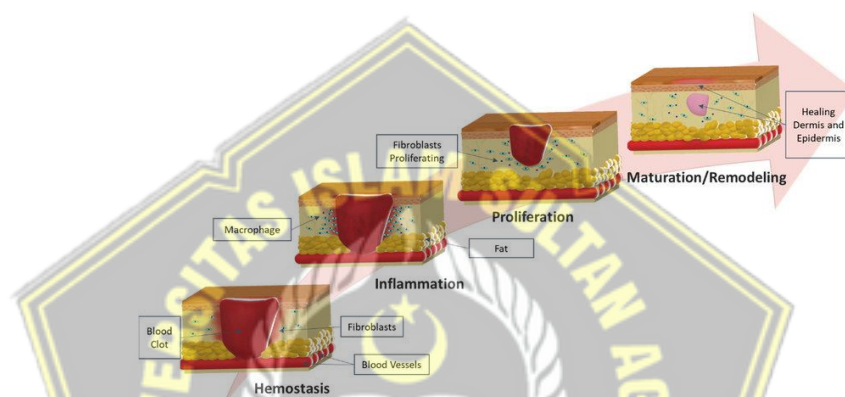
- b. Gambar diambil 7 hari setelah luka bakar derajat tiga.

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

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.⁴¹



Gambar 2.4. Representasi skematis tahapan penyembuhan luka.⁴²

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.⁴³

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.⁴²

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.⁴⁴

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*).⁴⁵ 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.⁴⁶ Namun, ada beberapa faktor yang juga dapat membuat penyembuhan luka menjadi terhambat antara lain: sistem imun, usia, stres, dan beberapa jenis penyakit.⁴⁷

2.7. Terapi Standar untuk Luka Bakar Derajat III

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'.⁴⁸

2.8. Hypoxia

Hypoxia merupakan kondisi dimana tidak terdapat pasokan oksigen ke jaringan, dampak negatif dari berbagai tipe sel yang terpapar *hypoxia* yang berkepanjangan dapat menyebabkan apoptosis sel. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa lingkungan *hypoxia* dapat mengakibatkan adhesi, proliferasi,

dan pembaharuan dari MSCs. Lingkungan *hypoxia* menyebabkan sintesis molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF), yang membantu MSCs memproduksi lebih banyak sitokin.⁸

2.9. Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cell (EH-MSCs)

2.8.1 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.⁴⁹⁻⁵¹

2.8.2 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.^{52,53}

b. Protein dan Enzim

Exosome MSC mengandung berbagai protein dan enzim yang mendukung regenerasi jaringan dan pertumbuhan sel.^{54,55}

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.¹⁹

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.^{56,57}

2.8.3 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.⁵⁸

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.⁵⁹

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*.⁵⁸

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.⁵⁸

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.⁵⁸

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.⁵⁸



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

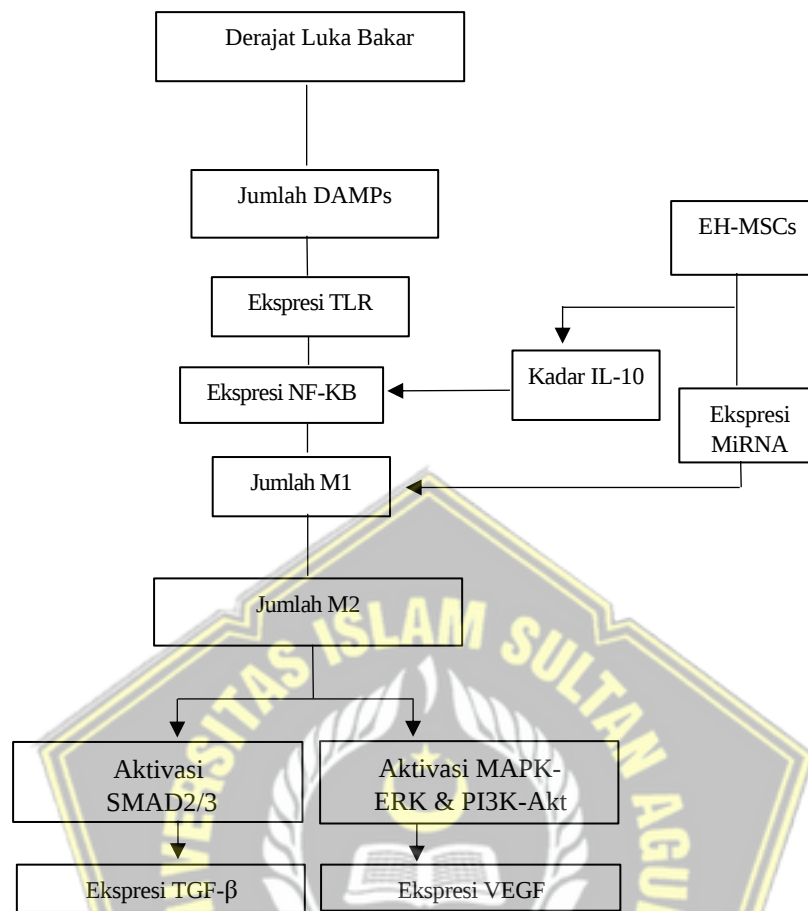
3.1. Kerangka Teori

Kerusakan jaringan yang terjadi pada Luka Bakar Derajat III melibatkan area menyeluruh pada lapisan kulit, mulai dari epidermis, dermis, hingga subkutis.¹ Kondisi demikian akan mendorong pelepasan beragam mediator inflamasi jaringan secara besar-besaran seiring teraktivasinya DAMP (*Damage Associate Molecular Pattern*) dalam upaya menjaga homeostasis.¹⁷ Beragam sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α , serta prostaglandin dan histamin akan dilepaskan di jaringan, seiring teraktivasinya jalur NF-kB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) melalui Toll-Like Reseptor (TLR), sehingga menarik kian banyak sel untuk lekas bermigrasi ke area luka, termasuk Trombosit dan Makrofag.^{1,60}

Makrofag bersama dengan trombosit melakukan fungsi fagositosis, sekaligus melepaskan TGF- β untuk mengikat reseptor TGF- β R yang mengaktivasi jalur SMAD2/3 yang dapat mendorong sel-sel fibroblast untuk lekas melakukan produksi kolagen dan matriks ekstraseluler.^{61,62} Di sisi lain, *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α) akan meningkat tajam dalam kondisi *hypoxia* akibat jejas luka bakar, sehingga mendorong produksi VEGF pada

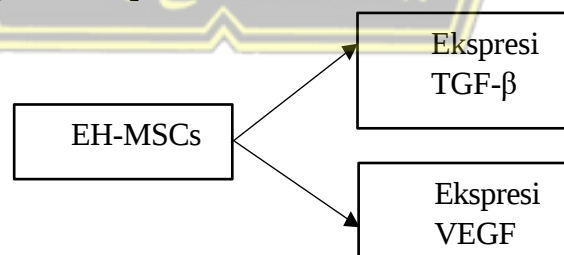
fibroblast, makrofag, dan sel-sel epitel, yang kemudian akan lekas mengaktivasi jalur *Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellular signal-Regulated Kinase* (MAPK-ERK) dan *Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Akt* (PI3K-Akt) agar proses angiogenesis lekas terjadi.²⁷⁻²⁹

Pemberian EH-MSCs disinyalir mampu memperbaiki kondisi jaringan pasca jejas Luka Bakar Derajat III, kandungan IL-10 dan miRNA dalam EH-MSCs dapat menekan inflamasi agar tidak terlalu berlebihan di fase awal dan peningkatan TGF- β dan VEGF sejak dini akan mendorong fase inflamasi untuk lekas bergeser masuk fase proliferasi. Pemberian EH-MSCs memungkinkan regulasi proliferasi dan angiogenesis yang lebih baik sehingga menekan terjadinya jaringan parut yang berlebihan. Dengan demikian, EH-MSCs dimungkinkan untuk menjadi kandidat terapi yang menjanjikan dalam percepatan penyembuhan luka bakar derajat III dengan memodulasi ekspresi TGF- β dan VEGF untuk mencapai keseimbangan antara regenerasi jaringan dan kontrol fibrosis.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β pada Tikus Wistar dengan model luka bakar derajat III.
2. Terdapat pengaruh pemberian EH-MSCs terhadap ekspresi VEGF pada Tikus Wistar dengan model luka bakar derajat III.

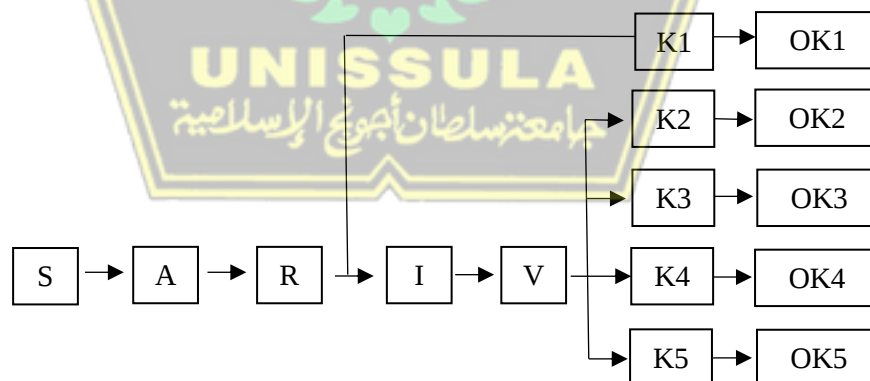


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini direncanakan akan dikerjakan secara eksperimental *in vivo*, yakni secara “*Post Test only Control Group Design*”, yang akan menggunakan metode rancangan acak lengkap pada tiap perlakuannya. Desain ini dimaksudkan untuk memudahkan peneliti membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrolnya, disamping memudahkan pula dalam evaluasi efek perlakuan yang diberikan. Sampel diambil dengan prinsip *non-probability sampling* secara *consecutive sampling*. Sampel pada penelitian ini yakni kulit luka bakar dari model tikus Wistar dengan luka bakar derajat III. Adapun rancangan penelitiannya yakni sebagai berikut:



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

S = Sampel

A = Aklimatisasi

- R = Randomisasi
- I = Induksi luka bakar derajat III
- V = Validasi luka bakar derajat 3
- K1 = Tikus sehat yang tidak diberikan perlakuan
- K2 = Tikus dengan luka bakar derajat III yang diberi injeksi NaCl
- K3 = Tikus dengan luka bakar derajat III yang diberi perlakuan olesan *Silver Sulfadiazine* di sekeliling luka.
- K4 = Tikus dengan luka bakar derajat III yang diberi perlakuan injeksi intradermal EH-MSCs dosis 100 µg/ml.
- K5 = Tikus dengan luka bakar derajat III yang diberi perlakuan injeksi intradermal EH-MSCs dosis 200 µg/ml.
- OK1 = Observasi ekspresi TGF-β dan VEGF K1
- OK2 = Observasi ekspresi TGF-β dan VEGF K2
- OK3 = Observasi ekspresi TGF-β dan VEGF K3
- OK4 = Observasi ekspresi TGF-β dan VEGF K4
- OK5 = Observasi ekspresi TGF-β dan VEGF K5

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah EH-MSCs dengan dosis 100 µg/ml dan 200 µg/ml.
- b. Variabel Tergantung penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekspresi TGF-β dan VEGF.

- c. Variabel Prakondisi penelitian ini adalah paparan plat logam untuk membuat model luka bakar derajat III pada area punggung tikus Wistar.
- d. Variabel Terkendali penelitian ini yakni strain tikus Wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi / pakan tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2. Definisi Operasional

a. *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSCs)

Tipe eksosom yang diperoleh dari sel punca tali pusat tikus yang dikultur secara *hypoxia* (kadar Oksigen 1-5%) di laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*). EH-MSCs ini diisolasi dengan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF), media kultur disaring menggunakan filter 100 kDa dan 500 kDa, dan divalidasi dengan *flow cytometry* menggunakan penanda CD81, CD63, dan CD9, serta disimpan di tabung 2,5 mL pada suhu 2-8 °C. EH-MSc akan digunakan untuk perlakuan injeksi intradermal pada luka bakar derajat III pada tikus model, dengan dosis 100 µg/ml dan 200 µg/ml.

Skala: Rasio

b. Ekspresi TGF-β

Tingkat ekspresi protein TGF-β dalam jaringan luka bakar setelah pemberian EH-MSc di hari ke lima perlakuan. Pemeriksaan TGF-β diperiksa dengan cara menusuk sinus orbita tikus dengan mikrohematokrit dan diambil darahnya di daerah orbita sekitar 0,2 cc setelah sebelumnya tikus di anestesi dahulu dengan injeksi Ketamin dosis 4 mg/kg/ BB. Setelah darah dimasukkan ke dalam tabung conical lalu dilakukan sentrifugasi,

bagian supernatan diambil dan dicampur antibodi monoklonal TGF- β , lalu diukur menggunakan metode PCR (*polymerase chain reaction*).

Skala: Rasio

c. Ekspresi VEGF

Tingkat ekspresi protein VEGF dalam jaringan luka bakar tikus setelah pemberian EH-MSC di hari ke lima perlakuan. Pemeriksaan VEGF diperiksa dengan cara menusuk sinus orbita tikus dengan mikrohematokrit dan diambil darahnya di daerah orbita sekitar 0,2 cc setelah sebelumnya tikus di anestesi dahulu dengan injeksi Ketamin dosis 4 mg/kg/ BB. Setelah darah dimasukkan ke dalam tabung conical lalu dilakukan sentrifugasi, bagian supernatan diambil dan dicampur antibodi monoklonal VEGF, lalu diukur menggunakan metode PCR (*polymerase chain reaction*).

Skala: Rasio

d. Luka Bakar Derajat III

Kondisi luka bakar dengan kerusakan penuh pada epidermis dan dermis serta keterlibatan jaringan subkutis pada tikus Wistar yang telah dilakukan pemodelan luka bakar derajat III. Pemodelan ini dibuat menggunakan plat logam dengan ukuran 2 x 2 cm² dan tebal 3 mm, dipanaskan hingga menyala, lalu ditempelkan pada daerah yang sudah dibersihkan selama 15 detik. Kondisi luka bakar derajat III ini divalidasi dengan kenampakan luka dan pemeriksaan histologis dengan menggunakan pengecatan *Hematoxyline-Eosin* (HE).

Skala: Ordinal

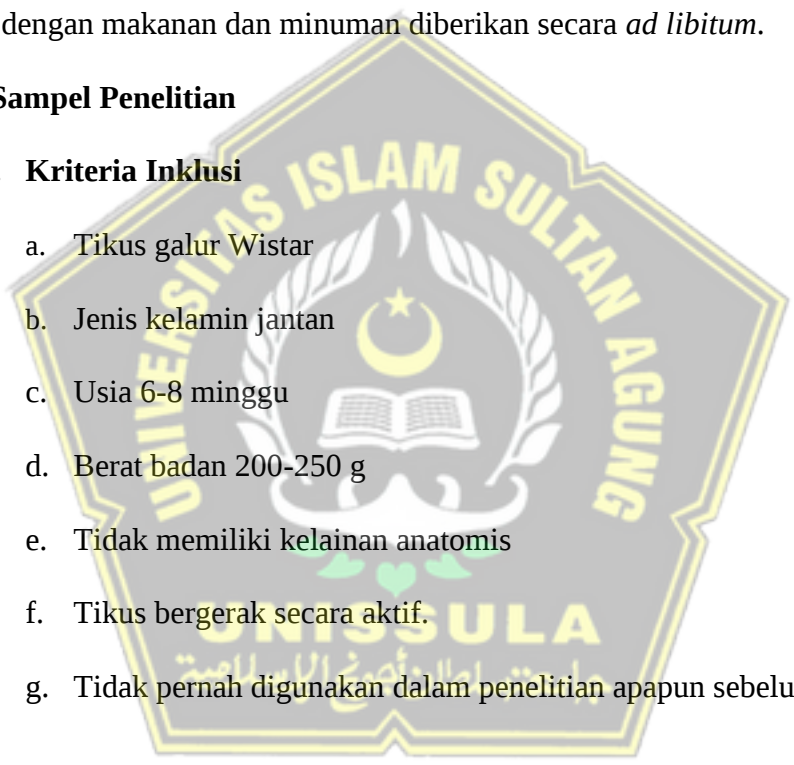
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Tikus jantan galur Wistar berusia 6-8 minggu dengan berat 200–250 gram dipilih untuk penelitian ini setelah dianggap 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*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

- 
- a. Tikus galur Wistar
 - b. Jenis kelamin jantan
 - c. Usia 6-8 minggu
 - d. Berat badan 200-250 g
 - e. Tidak memiliki kelainan anatomis
 - f. Tikus bergerak secara aktif.
 - g. Tidak pernah digunakan dalam penelitian apapun sebelumnya.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus mati selama aklimatisasi sebelum penelitian dimulai.
- b. Tikus menunjukkan tanda-tanda indikasi sakit selama masa aklimatisasi.
- c. Tikus mengalami gagal induksi luka bakar derajat III.

4.3.2.3. Kriteria *drop out*

- a. Terjadi kematian tikus sejak diberikan perlakuan hingga sebelum terminasi dilakukan.
- b. Tikus mengalami cedera tambahan atau trauma lain di luar perlakuan penelitian.
- c. Luka bakar yang diinduksi tidak sesuai kriteria derajat III berdasarkan validasi klinis maupun histopatologi.

4.4. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan besaran sampel dihitung menggunakan rumus Federer, dimana t adalah jumlah kelompok perlakuan, dan n adalah jumlah sampel perkelompoknya. Sehingga diperoleh perhitungan besaran sampel:

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

Berdasarkan perhitungan tersebut, penelitian menggunakan 5 ekor sampel perkelompok perlakuan. Sebagai antisipasi kemungkinan terjadinya *drop out*, maka ditambahkan 1 ekor sampel perkelompok perlakuan, sehingga jumlah total sampel yang digunakan adalah $(5 \times 5) + 5$ ekor, yakni 30 ekor tikus.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. 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*.

4.5.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian meliputi bahan kultur yang terdiri dari *Cell Storage: Mesenchymal stem cell* Isolasi Mice *Umbilical Cord*, *Antibodi Monoclonal: CD 90^o, CD 105', CD 34"*, *Growth Factor: Fetal Bovine Serum (FBS)*, *Substance: Medium Alpha Mem*, *penstrep*, *trypsin*, *fungizin*, *70% alcohol*, *Imunostaining: Blocking serum*, *universal link*, *Streptavidin*, *DAB*. Reagen terdiri dari *Phospat Buffer Saline*

(PBS), HEPES, Trypsin, Penstrep, *Fungizone*, Kolagenase tipe I, Kolagenase tipe IV, *Tryptofan Blue*, DMSO, MTT, *Stropper*.

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian meliputi Teknik isolasi Bahan-bahan yang diperlukan untuk analisis PCR antara lain PCR Kit TGF- β dan VEGF.

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. *Ethical clearance*

Setelah mendapatkan persetujuan dari pembimbing dan penguji *Ethical clearance* penelitian diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

4.6.2. Pembuatan EH-MSC

Seluruh prosedur pembuatan EH-MSC dari tahapan isolasi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) *Umbilical Cord* tikus Wistar, kultur dan penghitungan jumlah sel, serta diferensiasi sel MSC hingga diperoleh EH-MSC dilakukan oleh pihak *Stem Cell and Cancer Research Center* (SCCR).

4.6.3. Pembuatan luka bakar derajat III dan pemberian perlakuan pada subjek percobaan

- a. Di tahapan awal, bulu di sekitar punggung dicukur.
- b. Kemudian tikus dianestesi dengan ketamin dosis 7mg/kgBB sampai tikus pingsan.
- c. Luka bakar dibuat menggunakan lempeng logam berbentuk persegi yang sudah dipanasi dengan api hingga menyala merah terang (durasi pemanasan ± 10 detik) supaya kedalaman luka sama, luas luka 2x2 cm².

- d. Kemudian lempeng logam ditempelkan pada kulit punggung tikus selama 15 detik sampai terbentuk luka bakar derajat III.

4.6.4. Perlakuan (pemberian EH-MSD pada luka bakar)

- Kelompok 1 : Tikus sehat dan tanpa perlakuan.
- Kelompok 2 : Punggung tikus diberi luka bakar derajat III lalu diberikan injeksi NaCl di sekeliling luka (injeksi intradermal tepian luka dan injeksi intralesi di area luka bakar).
- Kelompok 3 : Punggung tikus diberi luka bakar derajat III lalu diberikan *Silver Sulfadiazine* secara oles di sekeliling luka.
- Kelompok 4 : Punggung tikus diberi luka bakar derajat III lalu diberikan injeksi EH-MSD dosis 100 µg/ml di sekeliling luka (injeksi intradermal tepian luka dan injeksi intralesi di area luka bakar).
- Kelompok 5 : Punggung tikus diberi luka bakar lalu di berikan injeksi EH-MSD dosis 200 µg/ml di sekeliling luka (injeksi intradermal tepian luka dan injeksi intralesi di area luka bakar).

Selama perlakuan semua tikus mendapat diet standar selama 5 hari. Pada hari ke 5 tikus dikorbankan dengan cara dibius menggunakan eter dan diambil jaringan kulit di bagian lukanya untuk dibuat sediaan preparat parafin (untuk melihat tampilan jaringan mikroskopik). Pada hari ke 5 neovaskularisasi mulai banyak dijumpai seiring jaringan granulasi mengisi area ruang luka, serabut kolagen menjadi lebih berlimpah dan mulai menjembatani luka. Preparat diambil dari luka

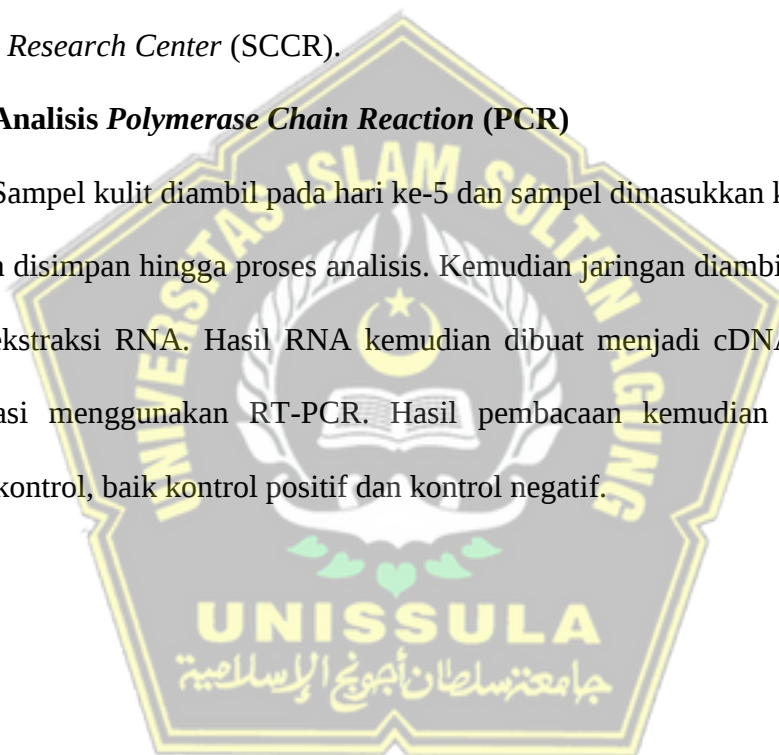
bakar tikus seluas $2 \times 2 \text{ cm}^2$ pada semua tikus percobaan baik tikus kelompok kontrol maupun tikus kelompok perlakuan.

4.6.5. Pembuatan Preparat Jaringan

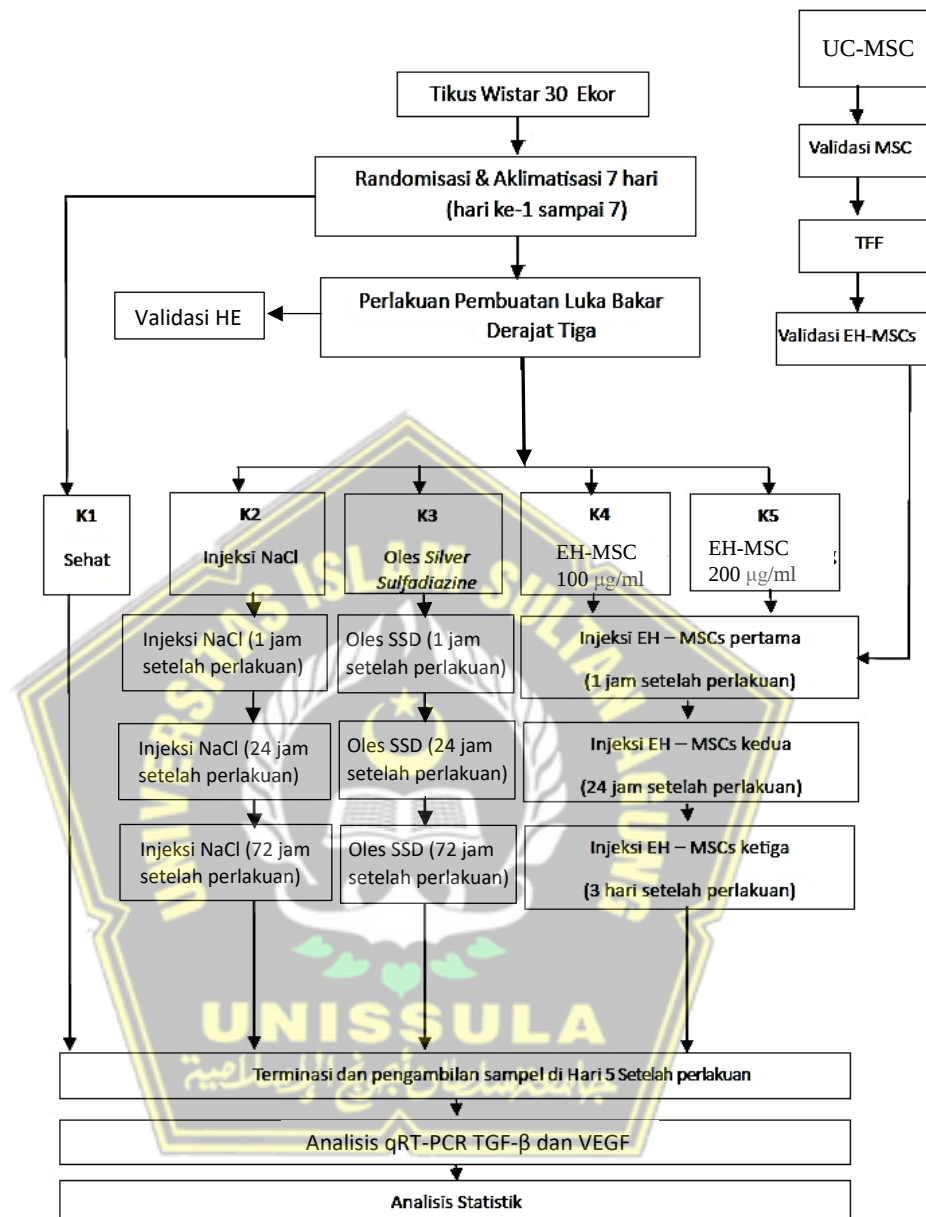
Setelah terminasi, dilakukan pembuatan preparate jaringan histologis area perlakuan dengan pengecatan *Hematoxyline Eosine* (HE guna pengamatan mikroskopis di area luka. Seluruh prosedur dilakukan oleh pihak *Stem Cell and Cancer Research Center* (SCCR).

4.6.6. Analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sampel kulit diambil pada hari ke-5 dan sampel dimasukkan ke dalam RNA later dan disimpan hingga proses analisis. Kemudian jaringan diambil 10 mg untuk proses ekstraksi RNA. Hasil RNA kemudian dibuat menjadi cDNA sintesis dan direplikasi menggunakan RT-PCR. Hasil pembacaan kemudian dibandingkan dengan kontrol, baik kontrol positif dan kontrol negatif.



4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.8. Analisa Data

Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis normalitas dan variasi data menggunakan uji Shapiro-Wilk dan Levene's Test. Pada ekspresi TGF- β diperoleh data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$), namun tidak homogen ($p < 0,05$). Hasil dari uji statistik parametrik One-Way ANOVA

menunjukkan adanya signifikansi antar kelompok ($p < 0,05$), yang kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tamhane, sehingga diketahui signifikansi terjadi antara Kelompok K2 dengan K4, dan Kelompok K2 dengan K5 ($p < 0,05$). Nilai mean ekspresi TGF- β juga terlihat kian meningkat secara berurutan dari K2 menuju K5.

Di sisi lain, dijumpai hasil uji Shapiro-Wilk dan Levene's Test pada ekspresi VEGF diperoleh data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$), namun juga tidak homogen ($p < 0,05$). Hasil dari uji statistik parametrik One-Way ANOVA menunjukkan adanya signifikansi antar kelompoknya ($p < 0,05$), yang kemudian dilanjutkan pula dengan uji Post Hoc Tamhane, sehingga diketahui signifikansi terjadi antara Kelompok K2 dengan K4 ($p < 0,05$). Kelompok K5 terlihat memiliki nilai mean di atas K4, tetapi ternyata tidak signifikan secara statistik. Meski nilai mean ekspresi VEGF juga terlihat berurutan mengalami peningkatan dari K2 menuju K5.

4.9. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang meliputi pembuatan EH-MSCs, perlakuan hewan coba hingga analisis variabel terikat ini dilakukan di Laboratorium SCCR (*Stem Cell and Cancer Research*) Semarang, pada Bulan April sampai dengan Mei 2025.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

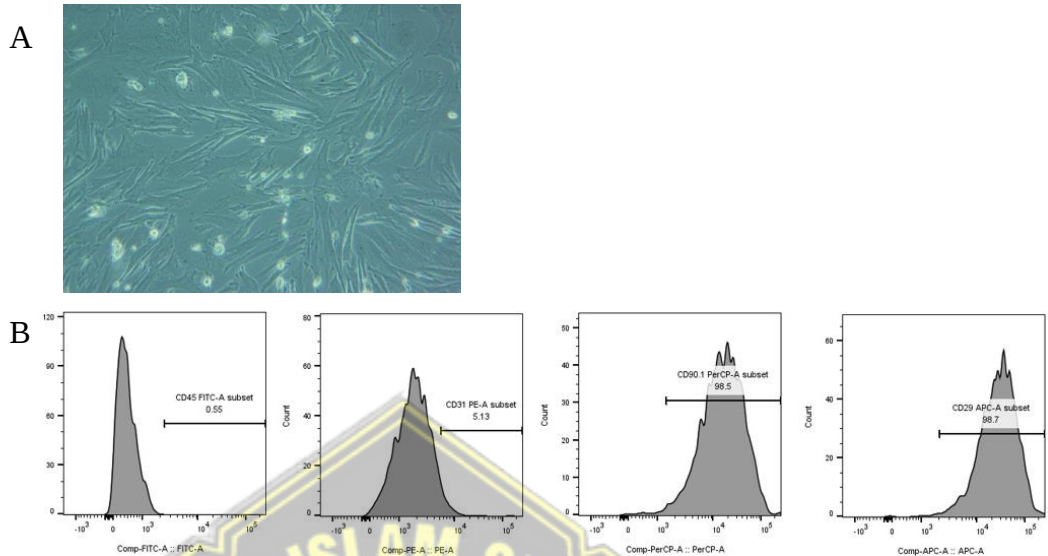
5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bermaksud mengevaluasi efek terapi eksosom yang berasal dari EH-MSC terhadap ekspresi TGF- β dan VEGF pada luka bakar derajat III pada hewan coba tikus Wistar jantan. Eksosom disuntikkan secara sistematis pada waktu 1 jam, 24 jam, dan 72 jam pasca luka diinisiasi, dan terminasi dilakukan pada hari ke-5 guna melihat perubahan pada ekspresi TGF- β dan VEGF dibandingkan dengan kontrol positif (pemberian *Silver Sulfadiazine*) dan kontrol negatif (pemberian NaCl). Kondisi ini juga diamati dengan membandingkannya dengan ekspresi pada tikus sehat sebagai data *baseline*. Analisis data mencakup validasi bahan biologis dan model luka, deskripsi data ekspresi molekul target, serta pengujian statistik meliputi uji normalitas, homogenitas, ANOVA, dan uji lanjutan Post Hoc Tamhane untuk melihat perbedaan antar kelompok.

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

Mesenchymal stem cells (MSCs) 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 *Alpha Minimum Essential Medium* (α -MEM). Setelah mencapai pasase kelima, analisis morfologi sel, menunjukkan terdapat sel yang menyerupai *spindle* saat diamati dengan

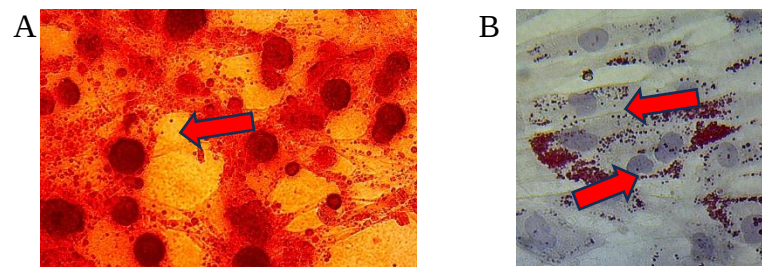
mikroskop dan melekat di atas permukaan flask (Gambar 5.1A).



Gambar 5.1 Morfologi MSC. (A) Morfologi MSC Fase 1 (Normoxic 24 jam) (40x). (B) Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi penanda permukaan spesifik MSC seperti CD45, CD31, CD90, dan CD29.

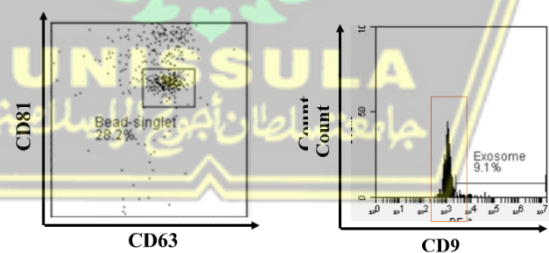
Analisis identitas sel menggunakan *surface marker* MSC menggunakan metode *flow cytometry* menunjukkan bahwa sel yang dikultur secara kuat mengekspresikan CD29 (98,7%) dan CD90 (98,5%) dan hanya sedikit mengekspresikan CD31 (5,13%) dan CD45 (0,55%) (Gambar 5.1B). Hal ini menunjukkan bahwa sel yang dikultur dari tali pusar memiliki karakteristik MSCs.

Penelitian juga memastikan kapasitas MSC dalam diferensiasi menjadi berbagai jenis sel dewasa seperti sel osteoblast dan sel adiposity yaitu dengan cara memberi medium spesifik menginduksi diferensiasi, baik menjadi osteoblast maupun adiposit. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu mengalami diferensiasi menjadi osteoblast dan adiposity yang terlihat oleh Alizarin-red dan Oil-red O.



Gambar 5.2. (A) Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteoblast pada pewarna alizarin-red dan (B) adiposit pada pewarna Oil-red O (ditunjukkan dengan panah, perbesaran 10x4)

Setelah tervalidasi, MSCs kemudian dilakukan inkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% dalam durasi 24 jam menggunakan *box* hipoksia. Setelah itu, medium kultur MSCs yang mengandung sekretom MSCs dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF dengan ukuran 100-500 kDa sehingga dapat diperoleh EH-MSC. Setelah diisolasi kadar eksosom dianalisis menggunakan metode *flowcytometry* dan didapatkan bahwa kadar eksosom yang didapatkan sebesar $0.75 \text{ ug}/100 \text{ uL} = 7.5 \text{ ug/mL}$ (Gambar 5.3)



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

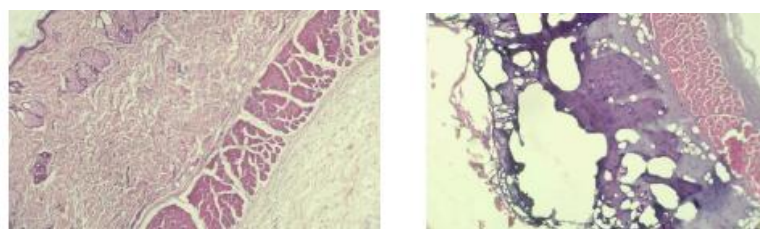
5.1.2 Hasil Validasi Luka Bakar

Model luka bakar derajat III pada tikus dilakukan validasi dengan membandingkan kondisi permukaan kulit hewan yang sehat dan permukaan kulit yang diinduksi luka menggunakan plat besi panas. Hasil pengamatan menunjukkan

bahwa tikus sehat memiliki struktur jaringan kulit normal, di mana epidermis, dermis, serta jaringan subkutan tersusun rapi, tanpa indikasi inflamasi atau kerusakan jaringan, sedangkan tikus yang diinduksi luka menggunakan besi panas menunjukkan jaringan pasca-luka bakar dengan tanda-tanda nekrosis koagulatif, kerusakan menyeluruh pada epidermis dan dermis, terbentuknya vakuolisasi, dan hilangnya struktur jaringan normal. Tampak pula keterlibatan jaringan subkutan hingga mendekati otot, yang merupakan ciri khas luka bakar derajat 3, sebagaimana terlihat dalam Gambar 5.4.



Gambar 5.3 Kondisi permukaan kulit punggung tikus Wistar, yang sehat vs yang diberikan luka bakar derajat III. (A) memperlihatkan permukaan kulit hewan yang telah dicukur dan diberi penandaan area luka berbentuk persegi berukuran sekitar 2×2 cm. Penandaan ini bertujuan untuk menjamin keseragaman lokasi dan luas luka antar individu. Sedangkan (B) tikus yang diinduksi luka bakar menunjukkan tahapan 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 3. Secara makroskopis, luka tampak kering, berbatas tegas, dan mengalami kerusakan menyeluruh hingga ke lapisan subkutan.



Sehat

Luka Bakar

Gambar 5.4 Hasil mikroskopik jaringan kulit tikus sehat vs luka bakar derajat III

Setelah tikus tervalidasi mengalami luka bakar derajat III, tikus yang tanpa perlakuan digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan tikus yang mengalami luka bakar derajat tiga dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (kontrol negatif; tikus luka bakar derajat III dengan diberi injeksi NaCl di sekeliling luka), K3 (kontrol positif; tikus luka bakar derajat III dengan diberikan *Silver Sulfadiazine* oles di sekeliling luka), K4 dan K5 (tikus luka bakar derajat III dengan injeksi EH-MSD dengan dosis masing-masing 100 µg/ml dan 200 µg/ml di sekeliling luka). Penginjeksian di sekeliling luka yang dimaksud adalah injeksi intradermal di sekeliling luka dan injeksi intralesi di area luka.

5.1.3 Ekspresi TGF-β

Tabel 5.1 Hasil deskripsi rerata Ekspresi TGF-β dan uji One way ANOVA

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	<i>p value</i>
Ekspresi TGF-β						
Mean	1.0000	0.6541	1.0258	1.2977	1.5726	
SD	0.0000	0.18059	0.59433	0.29481	0.39568	
Shapiro-Wilk	0.0000	0.74	0.626	0.103	0.680	
Levene Test						0.01
One way anova						0.02

Keterangan: Shapiro-Wilk : Normal ($p > 0,05$)
 Levene's Test : Homogen ($p > 0,05$)
 One way anova : Signifikan ($p < 0,05$)

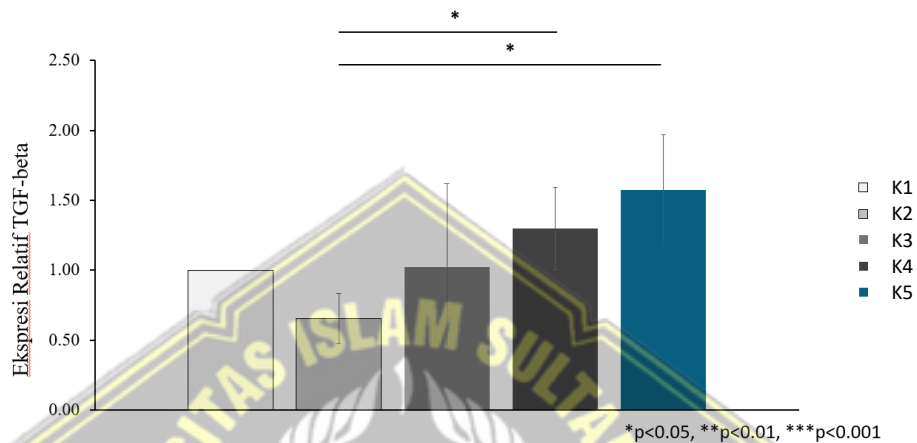
Tabel ini menunjukkan bahwa ekspresi TGF- β meningkat secara bertahap dari K1 ke K5. Ini mengindikasikan bahwa terapi yang diberikan terutama pada kelompok K5 berhasil meningkatkan ekspresi TGF- β , yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka bakar dan regenerasi jaringan.

Analisis distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa distribusi data pada setiap kelompok adalah normal ($p > 0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas varians menggunakan Levene's Test mengonfirmasi bahwa data ekspresi TGF- β tidak homogen, sehingga diperlukan uji Anova yang dilanjutkan dengan Uji Post Hoc Tamhane. Hasil Anova mengungkapkan nilai signifikan $P < 0.05$, sehingga guna mencari signifikansinya dilakukanlah Uji Post Hoc Tamhane yang hasilnya adalah sebagai berikut:

Tabel 5.2 Uji Post Hoc Tamhane Ekspresi TGF- β

Kelompok	Kelompok Perbandingan	<i>p</i> (value)
K1	K2	0.053
	K3	1
	K4	0.44
	K5	0.153
K2	K3	0.884
	K4	0.17
	K5	0.13
K3	K4	0.986
	K5	0.63
K4	K5	0.899

Dari uji Post Hoc Tamhane terlihat bahwa signifikansi diperoleh dari pemberian eksosom dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ (K4) dan 200 $\mu\text{g/ml}$ (K5) terhadap kelompok kontrol negatif (K2). Hal ini dapat dilihat pada grafik berikut:



Gambar 5.5 Grafik Ekspresi TGF- β
Terjadi peningkatan bertahap ekspresi TGF- β

5.1.4 Ekspresi VEGF

Tabel 5.3 Hasil deskripsi rerata Ekspresi VEGF dan uji One way ANOVA

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	p value
Ekspresi VEGF						
Mean	1.0000	0.6808	1.0028	1.3940	1.7263	
SD	0.0000	0.34692	0.28146	0.33610	0.61419	
Shapiro-Wilk	0.0000	0.332	0.164	0.532	0.088	
Levene's Test						0.01
One way anova						0.01

Keterangan:

Shapiro-Wilk : Normal ($p > 0,05$)

Levene's Test : Homogen ($p > 0,05$)

One way Anova : Signifikan ($p < 0,05$)

Tabel ini digunakan untuk melihat rata-rata dan sebaran data masing-masing kelompok sebelum melakukan analisis lebih lanjut. Data menunjukkan peningkatan ekspresi relatif VEGF pada kelompok perlakuan dibandingkan kontrol negatif. Kelompok perlakuan K5 menunjukkan ekspresi tertinggi, diikuti dengan kelompok K4, K3, dan K2. Hasil uji normalitas dengan Shapiro-Wilk menunjukkan data terdistribusi normal ($P > 0,05$), dan uji homogenitas Levene's Test menunjukkan data tidak homogen ($P \leq 0,05$), sehingga digunakan uji ANOVA dengan Uji Post Hoc Tamhane.

Tabel 5.4 Uji Post Hoc Tamhane Ekspresi VEGF

Kelompok	Kelompok Perbandingan	<i>p</i> (value)
K1	K2	0.536
	K3	1.000
	K4	0.299
	K5	0.292
K2	K3	0.685
	K4	0.046
	K5	0.066
K3	K4	0.429
	K5	0.294
K4	K5	0.962

Hasil Uji Post Hoc Tamhane menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan injeksi EH-MSC dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ (K4) dengan kelompok kontrol negatif (K2). Namun, kelompok perlakuan injeksi EH-MSC dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ (K5) ternyata tidak menunjukkan signifikansi ini, meski secara numerik ekspresinya lebih tinggi daripada kelompok injeksi EH-MSC dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ (K4). Kondisinya dapat disimak dalam grafik berikut:



Gambar 5.6 Grafik Ekspresi VEGF
Terjadi peningkatan bertahap ekspresi VEGF secara bertahap

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Eksosom yang disekresikan oleh MSCs berperan dalam memodulasi Ekspresi TGF- β dan VEGF selama proses penyembuhan luka bakar derajat III. Dengan mengatur ekspresi kedua faktor ini, eksosom MSCs dapat mempercepat penyembuhan luka, mendorong angiogenesis, dan mencegah pembentukan jaringan parut yang berlebihan.^{18,19} Pemberian EH-MSCs disinyalir mampu memperbaiki kondisi jaringan pasca jejas Luka Bakar

Derajat III, kandungan IL- 10 dan miRNA dalam EH-MSCs dapat menekan inflamasi agar tidak terlalu berlebihan di fase awal dan peningkatan TGF- β dan VEGF sejak dini akan mendorong fase inflamasi untuk lekas bergeser masuk fase proliferasi.

Eksosom MSC mengandung sejumlah miRNA yang diketahui mengatur ekspresi gen dan memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel.^{52,53} Peran utama TGF- β dalam memediasi penyembuhan luka bakar, khususnya yang diarahkan pada keratinosit dan respons fibroblas. Hasilnya menunjukkan kemampuan untuk meningkatkan pemulihan luka melalui migrasi epitel dan kontraksi dasar luka dapat secara signifikan meningkatkan hasil perbaikan klinis luka.⁶ Di sisi lain, Ruan Q, *et al.* mengungkapkan bahwa VEGF merupakan mediator penting dari proses inflamasi, dan konsentrasi VEGF yang tinggi dikaitkan dengan terjadinya perbaikan kondisi luka bakar.⁷

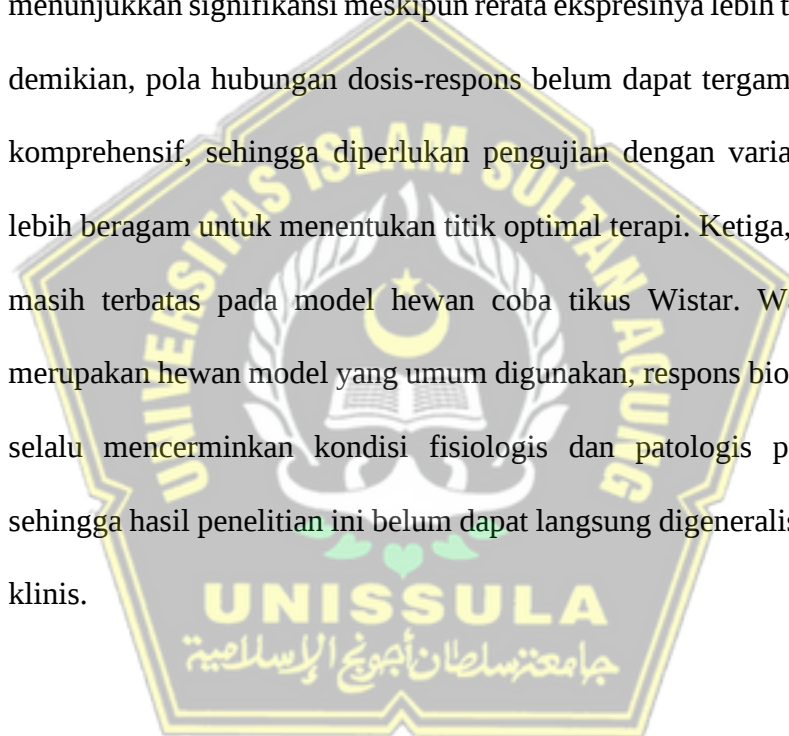
Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EH-MSC mampu meningkatkan ekspresi TGF- β dan VEGF pada model hewan luka bakar derajat III, baik pada dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ maupun 200 $\mu\text{g/ml}$. Terlepas pada variasi signifikansi statistiknya, pemberian EH-MSC dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan ekspresi yang lebih tinggi untuk TGF- β dan VEGF dibandingkan dosis 100 $\mu\text{g/ml}$. Tren peningkatan ekspresi TGF- β dan ekspresi VEGF seiring peningkatan dosis EH-MSC menunjukkan bahwa EH-MSC memiliki andil dalam mempercepat proses penyembuhan luka melalui jalur regeneratif dan angiogenik. Hal penting dari penelitian ini

adalah hasil ekspresi TGF- β kian meningkat dari kelompok K4 ke K5, keduanya juga signifikan secara statistik. Temuan menariknya justru didapati pada variabel VEGF, dimana pemberian dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ (K4) memang terjadi signifikansi pada ekspresi VEGF, tetapi pada pemberian dosis 200 $\mu\text{g/ml}$, hasilnya justru tidak signifikan, meskipun secara numerik ekspresi VEGF pada dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ lebih tinggi nilainya dibandingkan dengan kelompok dosis 100 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini harus ditelaah lebih lanjut, mengingat pemberian perlakuan pada penelitian ini hanya terbatas pada 1 jam pertama, 24 jam berikutnya, dan 72 jam pasca inisiasi luka bakar derajat III, penelitian lanjutan sangat terbuka untuk evaluasi ulang dalam hal dosis, waktu pemberian, dan efektivitas biologis yang ditimbulkan. Terlepas dari perbedaan pada signifikansinya, peningkatan ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa pemberian EH-MSC tetap memiliki potensi dalam merangsang angiogenesis, sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka bakar derajat III.⁶³

Secara keseluruhan, penelitian ini membuktikan bahwa pemberian EH-MSC mampu meningkatkan ekspresi TGF- β secara signifikan dan memberikan tren peningkatan ekspresi VEGF secara biologis. Hal ini menunjukkan bahwa EH-MSC memiliki potensi besar sebagai agen terapi regeneratif pada kasus luka bakar derajat III, terutama dalam mempercepat proses penyembuhan jaringan melalui peningkatan faktor pertumbuhan.

Meski demikian, penelitian ini juga memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Pertama, waktu observasi hanya dilakukan hingga

hari ke-5 pasca induksi luka bakar, sehingga hasil yang diperoleh belum sepenuhnya menggambarkan dinamika ekspresi TGF- β dan VEGF pada fase proliferasi lanjut maupun fase remodeling jaringan. Kedua, variasi dosis exosome yang digunakan dalam penelitian ini relatif terbatas, yaitu hanya pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ dan 200 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menjadi penting karena pada dosis 200 $\mu\text{g/mL}$, peningkatan ekspresi VEGF tidak menunjukkan signifikansi meskipun rerata ekspresinya lebih tinggi. Dengan demikian, pola hubungan dosis-respons belum dapat tergambarkan secara komprehensif, sehingga diperlukan pengujian dengan variasi dosis yang lebih beragam untuk menentukan titik optimal terapi. Ketiga, penelitian ini masih terbatas pada model hewan coba tikus Wistar. Walaupun tikus merupakan hewan model yang umum digunakan, respons biologisnya tidak selalu mencerminkan kondisi fisiologis dan patologis pada manusia, sehingga hasil penelitian ini belum dapat langsung digeneralisasi ke tingkat klinis.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi EH-MSC di sekeliling luka terhadap peningkatan ekspresi TGF- β dan VEGF pada tikus jantan galur Wistar dengan model luka bakar derajat III menunjukkan hal-hal berikut:

- a. Pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC) dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 200 $\mu\text{g/ml}$ berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi TGF- β pada tikus wistar dengan model luka bakar derajat III, kedua dosis menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik.
- b. Pemberian *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* (EH-MSC) dosis 100 $\mu\text{g/mL}$ dan 200 $\mu\text{g/mL}$ berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi VEGF pada tikus wistar dengan model luka bakar derajat III, namun signifikansi statistik hanya ditemukan pada dosis 100 $\mu\text{g/mL}$. Pada dosis 200 $\mu\text{g/mL}$, meskipun secara numerik ekspresinya lebih tinggi, ternyata tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik.

6.2 Saran

a. Perpanjangan waktu observasi

Disarankan penelitian berikutnya melakukan pengukuran ekspresi TGF- β dan VEGF tidak hanya pada hari ke-5, tetapi juga pada fase proliferasi lanjut dan fase remodeling (misalnya hari ke-7, 14, hingga 28), sehingga dinamika penyembuhan luka dapat tergambarkan lebih lengkap.

b. Penggunaan variasi dosis yang lebih beragam

Karena dosis 200 $\mu\text{g/mL}$ tidak menunjukkan peningkatan signifikan pada ekspresi VEGF meskipun reratanya lebih tinggi, penelitian mendatang perlu mengeksplorasi variasi dosis yang lebih luas (misalnya 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$). Hal ini penting untuk mengetahui pola hubungan dosis-respons secara lebih jelas dan menentukan dosis optimal yang memberikan efek terapeutik paling konsisten.

c. Uji translasi pada model hewan yang lebih kompleks

Penelitian lanjutan sebaiknya tidak hanya terbatas pada tikus Wistar, tetapi juga dilakukan pada hewan model yang lebih besar atau fisiologisnya lebih dekat dengan manusia, seperti kelinci atau babi. Langkah ini diperlukan sebelum dilakukan uji pra-klinik dan uji klinis pada manusia agar hasil penelitian memiliki relevansi yang lebih tinggi terhadap aplikasi klinis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Roberto A RVC, Juan C BG, Marcos A AS, Leslie E LR, Nahomi S SC, Alicia GA, et al. *Comprehensive Care for Burn Patients. International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*. 2024 Aug 15;4(08). Available at: https://www.researchgate.net/publication/383148164_Comprehensive_Care_for_Burn_Patients [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.47191/ijmscrs/v4-i08-07.
2. **Lestari T, Syukur S, Revilla G, Sukma Rita R, Rustini R.** The burn wound healing process: a review. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*. 2023 Aug;40(1):77–88. Available at: <https://ijpsat.org/index.php/ijpsat/article/view/5565> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.52155/ijpsat.v40.1.5565.
3. Żwierello W, Piorun K, Skórka-Majewicz M, Maruszewska A, Antoniewski J, Gutowska I. Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Feb 13;24(4):3749. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/4/3749> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3390/ijms24043749.
4. **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. *International Journal of Biological Sciences*. 2023 Feb 27;19(5):1430–1454. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37056923/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.7150/ijbs.80430.
5. Liu G, Zhou Y, Zhang X, Guo S. Advances in hydrogels for stem cell therapy: regulation mechanisms and tissue engineering applications. *J Mater Chem B*. 2022;10(29):5520–5536. Available at: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/tb/d2tb01044e> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1039/D2TB01044E.
6. **Khan I, Rahman SU, Tang E, Engel K, Hall B, Kulkarni AB, Arany PR.** Accelerated burn wound healing with photobiomodulation therapy involves activation of endogenous latent TGF- β 1. *Scientific Reports*. 2021 Jun 28;11(1):13371. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34183697/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1038/s41598-021-92650-w.
7. **L Abdulazeem, A Tariq, S Abdalkareem Jasim.** An investigation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR-1 and VEGFR-2) in burn wound healing. *Arch Razi Inst*. 2022 Apr 30;77(2):747–751. Available at:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36284951/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.22092/ARI.2022.356981.1954.
8. **Madrigal M, Rao KS, Riordan NH.** *A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods.* *Journal of Translational Medicine.* 2014;12:260. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25304688/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1186/s12967-014-0260-8.
 9. **World Health Organization.** *Burns.* Newsroom, Fact Sheets. 13 October 2023. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> [Accessed 1 Sep 2025].
 10. **Burns Registry of Australia and New Zealand Project Team.** *Burns Registry of Australia and New Zealand: 15th Annual Report, July 2023 – June 2024.* Melbourne (AU): School of Public Health and Preventive Medicine, Monash University; 2025 Apr 15. Available from: https://www.monash.edu/data/assets/pdf_file/0006/3966522/BRANZ-15th-Annual-Report-Jul-23-Jun-24-PUBLIC.pdf [Accessed 1 Sep 2025].
 11. **Stokes MAR, Johnson WD.** Burns in the Third World: an unmet need. *Ann Burns Fire Disasters.* 2017 Dec 31;30(4):243–246. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29983673/> [Accessed 1 Sep 2025]. PMID: 29983673; PMCID: PMC6033471.
 12. **Soedjana H, Hasibuan L, Muliawan B.** Peningkatan pengetahuan luka bakar melalui penyuluhan mengenai pencegahan dan penanganan dini pada luka bakar. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat.* 2019;3(2):106–112. Available from: <https://jurnal.unpad.ac.id/pkm/article/view/20366> [Accessed 1 Sep 2025].
 13. Widiyanti P, Firza, Siswanto. *Methylcellulose-AgNPs-oat hydrogel as a wound dressing for burn wound.* In: Amrillah T, Prihandana GS, Prastio RP, Megantoro P, Fahmiyah I, editors. *AIP Conference Proceedings.* Vol. 3047, No. 1; 2024 Jan 29. Article 050004. Available from: <https://doi.org/10.1063/5.0193673> [Accessed 1 Sep 2025].
 14. **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. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26546385/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1016/j.burns.2015.06.019.
 15. **Timby BKK, Smith NE.** *Introductory medical-surgical nursing.* 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. e-book, xxix, 1303 p. Available from: WorldCat (OCLC 1263809127) [Accessed 1 Sep 2025].

16. **Chirongoma F, Chengetanai S, Tadyanemhandu C.** First aid practices, beliefs, and sources of information among caregivers regarding paediatric burn injuries in Harare, Zimbabwe: a cross-sectional study. *Malawi Medical Journal*. 2017 Jun;29(2):151–154. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28955424/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.4314/mmj.v29i2.14.
17. **Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al.** Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS One*. 2014 Feb 20;9(2):e88348. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24586314/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1371/journal.pone.0088348.
18. **Rizkiyani EM, Putra A, Retno A.** Pengaruh MSC hipoksia terhadap kadar TGF- β pada penyembuhan luka fase proliferasi dan remodeling: studi eksperimental *in vivo* pada tikus galur Wistar jantan yang dieksisi pada hari ke-12, 18, dan 24. In: *Prosiding Konstelasi Ilmiah Mahasiswa Unissula (KIMU) 7*; 2022 Jan 19; Semarang, Indonesia. Semarang: Universitas Islam Sultan Agung; 2022. p. 29-41. Available from: <https://jurnal.unissula.ac.id/index.php/kimukes/article/view/20276/6481> [Accessed 1 Sep 2025].
19. **Wulandari P, Hutagalung MR, Perdanakusuma DS.** DETEKSI KADAR TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF- β) PADA LUKA AKUT. *Jurnal Rekonstruksi dan Estetik*. 2021 Jun;6(1):1–13. Available from: <https://e-journal.unair.ac.id/JRE/article/view/28225> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.20473/jre.v6i1.28225.
20. **Abazari M, Ghaffari A, Rashidzadeh H, Momeni Badeleh S, Maleki Y.** A systematic review on classification, identification, and healing process of burn wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2022 Mar;21(1):18–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32524874/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1177/1534734620924857.
21. Czerniak P, Bartusik-Aebischer D, Aebischer D. Transforming growth factors (TGFs). In: *The Biochemical Guide to Proteins*. 2023. p. 7–10. Nova Medicine and Health: Nova Science Publishers; 2023 Feb 15. 174 p. ISBN 979-8886974935. Available from: <https://novapublishers.com/shop/the-biochemical-guide-to-proteins/> [Accessed 1 Sep 2025].
22. **Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB.** Matrix control of transforming growth factor- β function. *J Biochem*. 2012 Oct;152(4):321–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22923731/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1093/jb/mvs089.

23. **Ding Z, Jiang M, Qian J, Gu D, Bai H, Cai M, Yao D.** Role of transforming growth factor- β in peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res.* 2024 Feb;19(2):380–386. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37488894/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.4103/1673-5374.377588.
24. **Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ.** The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma.* 2012 Feb;2(1):18–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22928164/> [Accessed 1 Sep 2025]. PMID: 22928164.
25. **Harrison S, Sinclair R.** Telogen effluvium. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2002 Jul;27(5):389–395. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12190639/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1046/j.1365-2230.2002.01080.x.
26. **Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM.** Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care.* 2012 Jul;25(7):304–314. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22713781/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.
27. **Liu Z, Liu L, Cheng X, Gao L.** Expression and predictive value of HIF-1 α and VEGF in patients with burns following treatment. *Exp Ther Med.* 2020 Dec;20(6):141. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33093879/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3892/etm.2020.9270.
28. **Zimna A, Kurpisz M.** Hypoxia-Inducible Factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:549412. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26146622/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1155/2015/549412.
29. **Ahluwalia A, Tarnawski AS.** Critical role of hypoxia sensor—HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Current Medicinal Chemistry.* 2012;19(1):90–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22300081/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.2174/092986712803413944.
30. **Rahayuningsih T.** Penatalaksanaan luka bakar (combustio). *Profesi.* 2012;8 (Feb–Sep). Available from: <https://www.neliti.com/publications/161583/penatalaksanaan-luka-bakar-combustio> [Accessed 1 Sep 2025].

31. **Żwierello W, Piorun K, Skórka-Majewicz M, Maruszewska A, Antoniewski J, Gutowska I.** Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Feb 13;24(4):3749. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9959609/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3390/ijms24043749. PMCID: PMC9959609; PMID: 36835171.
32. Yefta Moenajat. Luka Bakar: Pengetahuan Klinis Praktis. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2003.
33. Sjamsuhidayat R, de Jong W. Buku Ajar Ilmu Bedah. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2007. p. 94–117.
34. **Lars H Evers, Dhaval Bhavsar, Peter Mailänder.** The biology of burn injury. *Experimental Dermatology*. 2010 Sep;19(9):777–783. Epub 2010 Jul 14. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20629737/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x.
35. **Pengju Zhang, Bingwen Zou, Yih-Cherng Liou, Canhua Huang.** The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury. *Burns & Trauma*. 2021 Feb 4;9:tkaa047. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654698/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1093/burnst/tkaa047.
36. **Warby R, Maani CV.** Burn Classification. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; updated 26 Sep 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539773/> [Accessed 1 Sep 2025].
37. **Farrell M, Dempsey J, eds.** *Smeltzer and Bare's Textbook of Medical-Surgical Nursing*. 2nd ed. Volume 1. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. Available from: https://books.google.co.id/books/about/Smeltzer_and_Bare_s_Textbook_of_Medical.html?hl=id&id=tCT4ZwEACAAJ&redir_esc=y [Accessed 1 Sep 2025].
38. Hudak, Gallo. Keperawatan Kritis: Pendekatan Asuhan Holistik. Vol. 1. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, EGC; 2012.
39. **Anggowarsito JL.** Luka Bakar Sudut Pandang Dermatologi. *Jurnal Widya Medika (Surabaya)*. 2014 Okt;2(2):115–120. Available from: <http://journal.wima.ac.id/index.php/JWM/article/view/852/824> [Accessed 1 Sep 2025].
40. **Oba J, Okabe M, Yoshida T, Soko C, Fathy M, Amano K, Kobashi D, Wakasugi M, Okudera H.** Hyperdry human amniotic membrane application as a wound dressing for a full-thickness skin excision after a third-degree

- burn injury. *Burns & Trauma*. 2020 Jul 27;8:tkaa014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32733973/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1093/burnst/tkaa014.
41. **Wallace HA, Basehore BM, Zito PM.** Wound Healing Phases. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; updated 12 Jun 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/> [Accessed 1 Sep 2025].
 42. **Bernardes BG,** Del Gaudio P, Alves P, Costa R, García-González CA, Oliveira AL. Bioaerogels: Promising nanostructured materials in fluid management, healing and regeneration of wounds. *Molecules*. 2021 Jun 23;26(13):3834. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34201789/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3390/molecules26133834.
 43. Ninan N, Thomas S, Grohens Y. Penyembuhan luka dalam urologi. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Maret; 82-83 :93-105.
 44. **L G Bowden, H M Byrne, P K Maini, D E Moulton.** A morphoelastic model for dermal wound closure. *Biomech Model Mechanobiol*. 2016 Jun;15(3):663–681. Epub 2015 Aug 12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26264498/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1007/s10237-015-0716-7.
 45. **Rahmi NR.** Pembuatan film balutan primer yang mengandung kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) dalam penyembuhan luka bakar. *eSkripsi Universitas Andalas*. Padang: Universitas Andalas; 2017. Available from: <http://scholar.unand.ac.id/26120/> [Accessed 1 Sep 2025].
 46. **Reinke JM, Sorg H.** Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 2012;49(1):35–43. Epub 11 Jul 2012. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22797712/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1159/000339613.
 47. **Mathen C,** Sawant MG, Gupta R, Dsouza W, Krishna SG. 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 Tissues Organs*. 2021;210(1):31–44. Epub 2021 Apr 19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33873188/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1159/000513895.
 48. **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. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126813/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1016/j.burns.2016.03.029.
49. **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 Rev Rep.* 2021 Apr;17(2):369–378. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32772239/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1007/s12015-020-10014-9.
 50. **Novello S, Pellen-Mussi P, Jeanne S.** Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles as cell-free therapy: perspectives in periodontal regeneration. *J Periodontal Res.* 2021 Jun;56(3):433–442. Epub 28 Feb 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33641196/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1111/jre.12866.
 51. **Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G.** *Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing.* *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2020 Mar 3;8:146. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32195233/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3389/fbioe.2020.00146.
 52. **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 Jan 7;11(2):202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35053317/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3390/cells11020202.
 53. **Zhang X, Bao P, Zheng Q, Chu M, Liang C, Guo X, Wu X, He M, Pei C, Yan P.** Comparative Analysis of mRNA and miRNA Expression between Dermal Papilla Cells and Hair Matrix Cells of Hair Follicles in Yak. *Cells.* 2022 Dec 9;11(24):3985. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36552749/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3390/cells11243985.
 54. **Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ.** Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology.* 2010 Sep 20;190(6):1079–1091. Epub 2010 Sep 13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20837771/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1083/jcb.201002049.
 55. **Choi JS, Yoon HI, Lee KS, Choi YC, Yang SH, Kim I-S, Cho YW.** Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *Journal of Controlled Release.* 2016 Jan 28;222:107–115. Epub 2015 Dec 14. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26264498/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.018.
56. **Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, Wang Y, Zhao T, Kim HW, Xu M, Millard RW, Wen Z, Wang Y.** Exosomes secreted from CXCR4-overexpressing mesenchymal stem cells promote cardioprotection via Akt signaling pathway following myocardial infarction. *Stem Cells Int.* 2015;2015:659890. Epub 5 May 2015. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26074976/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1155/2015/659890.
 57. **Qu Q, Pang Y, Zhang C, Liu L, Bi Y, et al.** 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 Mar 23;11(1):133. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-01639-1> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1186/s13287-020-01639-1.
 58. **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 May;238(5):1203–1217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33372709/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1111/joa.13365.
 59. **Haraszi 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. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30341012/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1016/j.ymthe.2018.09.015.
 60. **Zhou C, Zhang B, Yang Y, Jiang Q, Li T, Gong J, Tang H, Zhang Q, et al.** Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing. *Stem Cell Research & Therapy.* 2023 Apr 26;14(1):107. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37101197/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1186/s13287-023-03345-0.
 61. **Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, Correll RN, Fu X, Schips T, Vagnozzi RJ, Liu R, Huynh T, Lee SJ, Karch J, Molkentin JD.** Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest.* 2017 Oct 2;127(10):3770–3783. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28891814/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.1172/JCI94753.

62. **Shi X, Young CD.** Transforming growth factor- β signaling in fibrotic diseases and cancer-associated fibroblasts. *Biomolecules*. 2020 Dec 12;10(12):1666. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33322749/> [Accessed 1 Sep 2025]. doi:10.3390/biom10121666.
63. Han Y, Ren J, Bai Y, Pei X, Han Y. Corrigendum to “Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R” [Int. J. Biochem. Cell Biol. 109 April (2019) 59–68]. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2020;126:105805. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272520301229> [Accessed 1 Sep 2025].

