



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENGARUH PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL
DAN BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL
TERHADAP SEKRESI TGF-B, VEGE DAN EKSPRESI
KOLAGEN TIPE I, INTEGRIN $\alpha 2\beta 1$ PADA
PENYEMBUHAN LUKA BAKAR**

DISERTASI



**GUSTI REVILLA
0931202005**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
2014**

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan hati yang bersujud kepada Allah SWT seraya mengumandangkan shalawat serta salam kepada Nabi Muhammad SAW dan keluarganya, penulis mengucapkan puji syukur yang sedalam-dalamnya kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah dan inayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian disertasi serta seluruh rangkaian kegiatan akademik pada Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Unand Padang.

Penulis sangat menyadari bahwa selama proses penulisan disertasi ini tidak terlepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, maka perkenankanlah penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA (K) atas kesediaan beliau sebagai promotor yang telah dengan sabar dan ikhlas ditengah kesibukannya, telah berkenan memberikan bimbingan serta selalu memotivasi penulis untuk memperluas wawasan keilmuan sehingga menjadi dorongan yang sangat berarti bagi penulis untuk menyelesaikan disertasi ini.

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh atas kesediaan beliau menjadi co-promotor yang dengan kesabaran memberikan dorongan, bimbingan, membantu dalam penelitian dan memberikan dorongan semangat serta sumbangan pemikiran yang berharga sampai selesainya penelitian dan disertasi ini.

Prof.. Dr. dr. Yanwirasti, PA (K) atas kesediaan beliau menjadi co-promotor yang dengan keikhlasan dan kesabaran memberikan bimbingan dan memberikan

dorongan semangat serta sumbangan pemikiran yang berharga mulai saya memasuki program pendidikan doktor sampai selesainya disertasi ini.

Rektor Universitas Andalas yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti kuliah di program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Prof. Dr. Syafruddin Karimi, SE, MA Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas tahun 2012 sampai sekarang dan Prof. Dr. Ir. Novirman Jamarun Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas tahun 2008 - 2012 yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program ini.

Prof. Dr, dr, Yanwirasti, PA (K) selaku ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Andalas yang telah memberikan dorongan serta motivasi agar penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini dengan baik.

Bapak Dekan Dr. dr. Masrul, MSc yang telah membuka peluang bagi penulis untuk meneruskan pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Kepada dosen penguji Prof. Dr. dr. Nasrul Zubir, SpPD KGEH, Dr. dr. Hafni Bachtiar MPH, Prof. Dr. dr. Darwin Amir SpS (K), Prof. Dr. dr. Menker Manjas, SpB SpOT. FICS yang telah memberikan masukan untuk kesempurnaan disertasi ini.

Kepada Dr. dr. I Ketut Sugiana, Msi sebagai penguji tamu yang telah memberikan masukan untuk kesempurnaan disertasi ini.

Kepada seluruh staf pengajar di Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bekal ilmiah dan arahan dalam penyelesaian disertasi ini.

Kepala laboratorium ITD Kampus C FK Unair Surabaya, Dr. dr. Purwati Sp.PD beserta seluruh staf yang telah memberikan izin kepada penulis untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin dalam isolasi sel punca dan pengukuran kadar pertumbuhan sehingga penelitian ini bisa selesai sesuai dengan yang diharapkan.

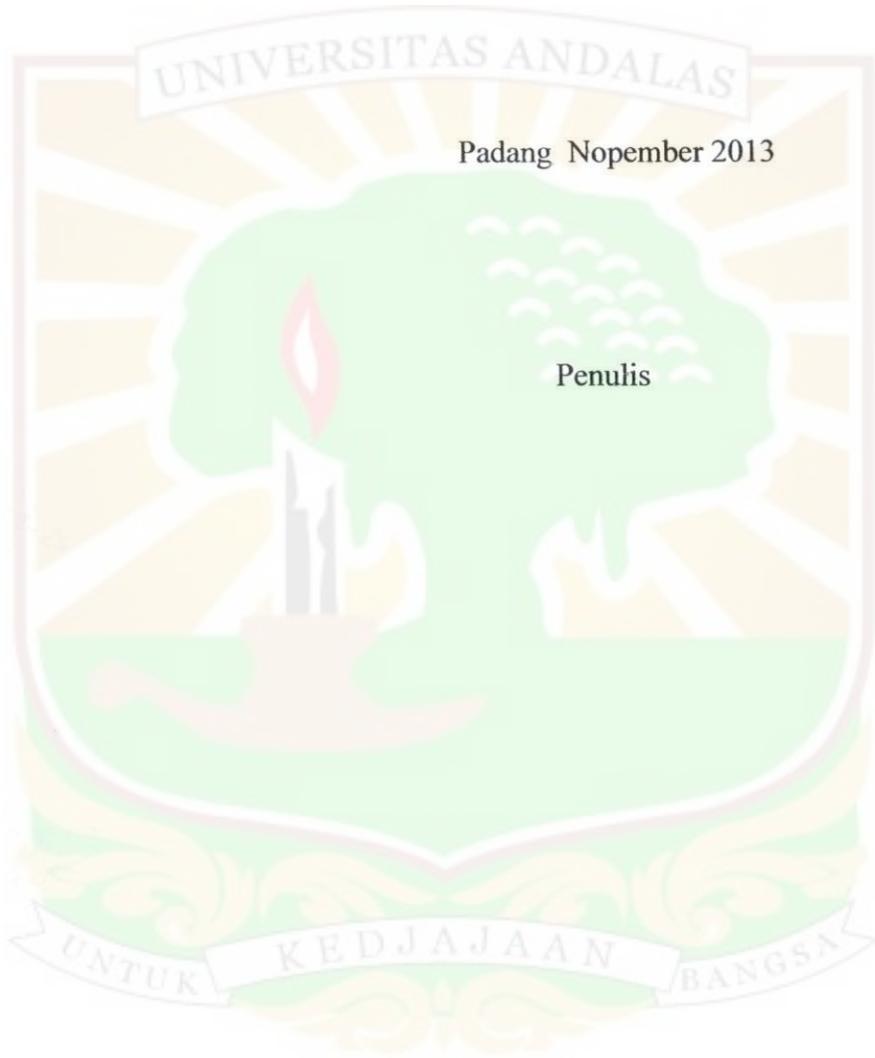
. Kepala laboratorium Biomedik FK Unair Surabaya beserta seluruh staf yang telah memberikan izin kepada penulis untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin untuk pembuatan pewarnaan imunohistokimia sehingga penelitian ini bisa selesai sesuai dengan yang diharapkan

Ketua Bagian Anatomi dr. M. Setia Budi Zain PA beserta seluruh staf pengajar Anatomi yang memberikan bantuan dan motivasi serta kerjasama yang baik selama pendidikan sampai selesainya penelitian ini. Terimakasih atas semua yang diberikan.

Semua rekan-rekan peserta S3 di Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas angkatan 2009, terimakasih penulis ucapkan atas segala bantuan dan doanya, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Kepada semua pihak, handai taulan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu , yang telah memberikan dorongan selama penulis menempuh pendidikan Doktor ini, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih.

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran, masukan maupun kritikan yang membangun demi kesempurnaan disertasi ini. Mudah-mudahan semua yang dituangkan dalam disertasi ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Amin



RINGKASAN

PENGARUH PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC) DAN BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC) TERHADAP SEKRESI TGF- β , VEGF DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I, INTEGRIN α 2 β 1 PADA PENYEMBUHAN LUKA BAKAR

Gusti Revilla

Luka bakar merupakan salah satu masalah kesehatan yang serius bagi masyarakat negara berkembang, karena luka bakar akan menimbulkan kerusakan fisik, bahkan menimbulkan kematian dan memerlukan perawatan yang lama serta biaya yang besar. Luka bakar dapat disebabkan oleh suhu panas (thermal), kimia, elektrik, dan radiasi. Kerusakan yang terjadi tergantung pada letak, kedalaman dan luas dari luka bakar.

Kedalaman luka bakar tergantung pada tingginya suhu dan lamanya terpapar dengan suhu yang panas. Berdasarkan kedalamannya luka bakar dibagi menjadi tiga bagian yaitu derajat satu (*superficial*), derajat dua (*partial*), dan derajat tiga (*full thickness*) yang mengenai seluruh lapisan epidermis dan dermis. Keadaan ini memerlukan penanganan yang tepat, baik dan mencegah komplikasi, sehingga mempercepat penyembuhan luka.

Penyembuhan luka bakar merupakan suatu proses yang kompleks melibatkan beberapa tahap yang saling berkaitan yaitu inflamasi, proliferasi (pembentukan jaringan granulasi, reepitelisasi, pembentukan matriks ekstraseluler) dan *remodelling*. Ke tiga fase penyembuhan luka ini akan melibatkan proses vaskuler, seluler dan aktivitas biokimia. Proses penyembuhan luka dapat berlangsung dengan baik tergantung dari interaksi beberapa sitokin, molekul adhesi, faktor pertumbuhan dan *protein matrix extracellular*. Molekul adhesi yang terlibat dalam penyembuhan luka adalah E dan P selektin, *intercellular adhesion molecule* (ICAM), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) dan integrin. Faktor pertumbuhan yang berperan pada penyembuhan luka jumlahnya cukup banyak, diantaranya adalah FGF, TGF- β , VEGF, EGF dan PDGF. TGF- β merupakan faktor pertumbuhan yang bersifat multifungsional, diantaranya regulasi pertumbuhan sel, diferensiasi dan pembentukan matriks ekstraseluler termasuk kolagen dan fibronectin yang memperkuat penyembuhan luka. VEGF merupakan faktor pertumbuhan yang berperan dalam angiogenesis dengan cara meningkatkan proliferasi dan migrasi sel endotel, mengontrol dengan kuat interaksi mediator angiogenik dan nonangiogenik, mengawali kemotaksis monosit dan sebagai faktor *survive* untuk sel endotel. Peran VEGF ini sangat penting dalam proses fisiologi normal dari penyembuhan luka. *Protein matrix extracellular* diantaranya adalah kolagen I yang sangat berperan dalam setiap fase penyembuhan luka mulai dari homeostasis sampai *remodelling*.

Penanganan luka yang dalam telah dilakukan dengan berbagai cara diantaranya adalah pencangkokan kulit, pemberian faktor pertumbuhan, dan

belum memberikan hasil yang memuaskan, karena perbaikan kulit belum sempurna. Untuk itu, diperlukan pengobatan untuk membangun kembali struktur jaringan dan fungsi kulit yang normal. Saat ini penggunaan stem sel dalam penelitian menjadi prioritas dalam pengobatan berbagai penyakit diantaranya luka bakar.

Stem sel dapat berasal dari sumsum tulang, jaringan lemak, *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) dan sel darah tali pusat. Stem sel yang berasal dari sumsum tulang dapat berupa stem sel hematopoetik dan *mesenchymal stem cell* (MSC). Bila terjadi kerusakan maka ada usaha penyembuhan dari PBMC dan MSC endogen melalui efek parakrin dan transdiferensiasi, namun jika kerusakan terlalu besar maka stem sel endogen tidak mampu memperbaiki kerusakan maka diperlukan pemberian stem sel eksogen. Penelitian stem sel PBMC dan MSC untuk penyembuhan luka sudah dilakukan dimana stem sel mampu mempercepat penyembuhan luka dengan cara mengurangi infiltrasi sel inflamasi kedalam luka, mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan meningkatkan reepitelisasi. Walaupun demikian mekanisme terjadi perubahan tersebut belum banyak yang diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian stem sel PBMCs dan BM-MSC terhadap proses penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan. Jenis penelitian adalah eksperimental dengan desain *the post test only control*, dengan menggunakan 24 ekor tikus Wistar dan dibagi atas 4 kelompok tikus yaitu 1) kelompok kontrol, yang hanya diberi PBS, 2) kelompok perlakuan I diberi stem sel PBMC, 3) kelompok perlakuan II diberi sel punca BM-MSC dan 4) kelompok perlakuan III diberi kombinasi sel punca PBMC dengan BM-MSC. Sel punca diberikan satu kali selama penelitian secara subkutan ditempat luka dengan dosis 2×10^6 sel/ml. Masing-masing tikus dianestesi dengan menggunakan xylazine dan ketamin kemudian tikus dibuat luka bakar dengan cara memanaskan plat tembaga dengan berat 150 g dalam air panas suhu 100°C dan plat tersebut ditempelkan bagian dorsal (punggung) tikus selama 20 detik, sehingga tikus menderita luka bakar *full thickness*. Pada hari ke 3 dan ke 7 di ambil darah lewat vena orbita dimana serum yang didapatkan digunakan untuk mengukur kadar TGF- β 1 dan VEGF-A. Pada hari ke 14 setelah luka bakar, diambil jaringan kulit untuk melihat ekspresi kolagen dan integrin $\alpha 2\beta 1$ dengan menggunakan metode imunohistokimia. Hasil penelitian dianalisis dengan uji oneway Anova dan uji lanjut Tukey. Penelitian ini sudah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Hasil penelitian menunjukkan, pemberian sel punca berpengaruh terhadap penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan, dimana PBMC dan kombinasi PBMC dan BM-MSC dapat meningkatkan kadar TGF- β 1, VEGF-A, ketebalan kolagen dan persentase integrin $\alpha 2\beta 1$ sedangkan BM-MSC menurunkan kadar TGF- β 1, VEGF-A dan meningkatkan ketebalan kolagen dan persentase integrin $\alpha 2\beta 1$.

Rata-rata kadar sekresi TGF- β 1 pada kelompok kontrol adalah 797,267 pg/ml, PI 821,100 pg/ml, PII 553,350 pg/ml, dan PIII 826,100 pg/ml. Pada hari ke 7 rata-rata kadar sekresi TGF- β 1 pada kelompok kontrol adalah 669,850 pg/ml, PI 956,100 pg/ml, PII 696,100 pg/ml, dan PIII 777,850 pg/ml. Dari hasil uji ANOVA

diperoleh bahwa *p value* pada hari ke 3 dan ke 7 sebesar 0,003 dan 0,008 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap kadar TGF- β 1. Untuk melihat signifikansi antara kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Kadar sekresi TGF- β 1 pada hari ke 3 dan ke 7 pada kelompok yang diberi PBMC dan kombinasi PBMC dan BM-MSC lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol sedangkan kelompok yang diberi BM-MSC kadar TGF- β 1 menurun. Peningkatan sekresi kadar TGF- β 1 pada ke dua kelompok tersebut mungkin disebabkan karena PBMC merupakan sel hematopoitik yang berperan untuk menghasilkan sitokin dan faktor pertumbuhan diantaranya TGF- β dan hasil ini menunjukkan kerja sinergis stem sel PBMC dengan BM-MSC. Penurunan kadar TGF- β 1 setelah diberi BM-MSC ini disebabkan karena BM-MSC berperan sebagai antiinflamasi dan stem sel ini berdiferensiasi menjadi sel fibroblast dan endotel. Faktor pertumbuhan ini terlibat dalam meregulasi fase penyembuhan luka mulai dari inflamasi sampai *remodelling*.

Rata-rata kadar sekresi VEGF pada kelompok kontrol adalah 61,667 pg/ml, PI 82,542 pg/ml, PII 12,875 pg/ml, dan PIII 37,042 pg/ml. Pada hari ke 7 rata-rata kadar sekresi VEGF pada kelompok kontrol adalah 200,042 pg/ml, PI 90,583 pg/ml, PII 23,917 pg/ml, dan PIII 22,250 pg/ml. Dari hasil uji ANOVA diperoleh bahwa *p value* pada hari ke 3 dan ke 7 sebesar 0,005 dan 0,008 ($p < 0,025$) yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap kadar VEGF. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Sekresi kadar VEGF-A pada hari ke 3 setelah diberi PBMC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi pada kelompok BM-MSC dan kombinasi PBMC dan BM-MSC kadar VEGF menurun. Penurunan kadar VEGF setelah diberi BM-MSC dan kombinasi mungkin disebabkan karena sel punca ini berdiferensiasi menjadi sel endotel, fibroblast dan miofibroblast sehingga mempercepat penyembuhan luka bakar.

Pemeriksaan imunohistokimia terlihat bahwa rata-rata ketebalan kolagen tipe I pada kelompok kontrol adalah 0,475 μ , PI 0,860 μ , PII 0,977 μ , dan PIII 1,395 μ . Dari hasil uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Ini menunjukkan bahwa sel punca PBMC dan BM-MSC mampu meningkatkan ketebalan kolagen I dan menunjukkan perbedaan yang bermakna dari ke 3 kelompok sehingga mempercepat penyembuhan luka dan lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Persentase integrin $\alpha 2\beta 1$ setelah pemberian PBMC dan BM-MSC belum menunjukkan ekspresi yang bermakna dibandingkan dengan kontrol, ini disebabkan karena ada molekul adhesi lain yang berperan dalam penyembuhan luka.

Kesimpulan penelitian ini bahwa pemberian stem sel PBMC dan BM-MSC berperan mempercepat penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan.

SUMMARY

THE EFFECT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC) AND BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC) on the TGF- β 1, VEGF SECRETION AND COLLAGEN TYPE I, INTEGRIN α 2 β 1 EXPRESSION TO BURN WOUND HEALING

Gusti Revilla

A burn is a serious problem for the community in developing countries because it can cause physical damage or even death and it requires longer treatment and high cost. A burn is a type of injury caused by heat, chemicals, electricity and radiation. The damage and the severity of burns depend on the sites, depth and extent of injuries.

Temperature and duration of contact have a synergistic effect in depth of burn. Burns are classified as first-degree (superficial), second-degree (partial -thickness) and third-degree (full-thickness) depending on how deep and severe they penetrate the skin's surface. A full-thickness burn destroy epidermis and dermis layer. Therefore, of all burn injuries, the third-degree of burns have higher morbidity and deformity, require high cost due to intensive treatment in a specialized unit as well.

The wound-healing is a complex process involving several phases hemostasis, inflammation, proliferation and tissue remodeling and that overlap in time. The three phases of the wound healing will involve vascular, cellular and biochemist activities. Wound healing can take place depending by interactions cytokine, adhesion molecules, growth factors and extracellular matrix. Adhesion molecules in wound healing involves E and P selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM), vascular cell adhesion molecule (VCAM) and integrin. Growth factors a role in wound healing such as FGF, TGF- β , VEGF, EGF and PDGF. TGF- β is a multifunctional regulator of cell-growth, differentiation and extracellular matrix formation composed primarily of collagen and fibronectin. VEGF is a growth factor crucially involved in the process angiogenesis with enhancing migration and proliferation of endothelial cells, increasing vascular permeability, strongly controlling interaction between angiogenic and non-angiogenic mediators, initiating monocyte migration and acting as a survival factor for endothelial cells. Collagen I which are major components of the extracellular matrix protein is role in every phase of wound healing from homeostasis to remodelling.

A proper for deep wound has been in various such as skin transplant, growth factors, but it hasn't provided satisfactory results, for skin repair will not be perfect. For that they need treatment to rebuild the anatomy and normal skin function. Current use of stem cells in research is priority in the treatment of various diseses including burned.

Stem cells can be resource from bone marrow, fat tissue, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cord blood cells. There are two stem cells in the bone marrow is hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (BM-MSCs). If there is damage stem cells endogen (PBMC and BM-MSCs) can contribute to the repair through mechanisms a paracrine function and transdifferentiation, but if the damage is too large stem cells endogen are not able to repair so that require exogenous stem cells.

PBMCs and BM-MSCs have been shown to participate in to accelerate wound healing by reducing infiltration of inflammatory cells, accelerate the formation granulation tissue and reepithelization. Nevertheless, the mechanism change occurs are unknown.

This study was aimed to know the effects of PBMC and BM-MSCs to the wound healing process of burn on rats.

The research is experimental design with the post test only control, using 24 wistar rats which were divided into four groups :1 control, group was given PBS, treatment group I was given PBMC, treatment group II was given BM-MSCs and treatment group III was given a combination of PBMC with BM-MSCs. Stem cells had given once during the study subcutaneous with a dose of 2×10^6 cell/ml. Each rats anesthetized with xylazine and cetamine and then the rat a full thickness burns was made by placing a hot boiled metal for 20 seconds on their shaved dorsum. At day 3 and 7, levels of TGF- β and VEGF serum obtained from rat's eye was measured by ELISA. At day 14 after burn skin was collected to see the expression of collagen I and $\alpha 2\beta 1$ integrin by immunohistochemical staining. This study was approved by Ethical clearance from Faculty of Medicine at Andalas University. The result was analyzed using one way ANOVA and Tukey's or LSD test for multiple comparisons.

The levels of TGF- β at day 3 and 7 in the group was given PBMC and combination group was higher than in control group, while the group was given BM-MSCs the levels of TGF- β decreased. Increased levels of TGF- β might be due to PBMC are hematopoietic cell induces the release of cytokines and growth factor such as TGF- β . The result showed a synergistic effect PBMC with BM-MSCs stem cells. Decreased levels of TGF- β after given BM-MSCs because this stem cells a role as antiinflammatory and stem cells that have been shown to differentiate into fibroblast and endothelial cells. The growth factor are involved in regulating the overall process of wound healing from the start of inflammation to the remodeling.

The levels of VEGF-A at day 3 and 7 in the group was given PBMC was higher than in control group, but the group was given BM-MSCs and combination group PBMC with MSC levels of VEGF-A decreased. Decreased levels of VEGF after given BM-MSCs because this stem cells a role as cells that have been shown to differentiate into endothelial, fibroblast and myofibroblast cells, so that to accelerate wound healing.

Immunohistochemical evaluation confirmed of the thickness of collagen I seen that PBMC and BM-MSCs stem cells can increase the thickness of collagen I and

showed had significantly difference higher from three group so that to accelerate and more perfect wound healing than the control group. Percentage of $\alpha 2\beta 1$ integrin after was given PBMC and BM-MSc yet to show significant expression compared to control, this is because a lot of other adhesion molecules that play a role in wound healing.

The conclusion of this study found that stem cells PBMC and BM-MSc to accelerate burn wound healing on rats.



ABSTRAK

PENGARUH *PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL* (PBMC) DAN *BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL* (BM-MSC) TERHADAP SEKRESI TGF- β , VEGF DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I, INTEGRIN α 2 β 1 PADA PENYEMBUHAN LUKA BAKAR

Gusti Revilla

Luka bakar merupakan masalah kesehatan dimasyarakat karena luka bakar akan menimbulkan kecacatan fisik dan kematian sehingga diperlukan penanganan yang baik. Pada saat ini banyak penelitian difokuskan dengan menggunakan sel punca. Pemberian PBMC dan MSC dapat mempercepat penyembuhan luka dengan mengurangi infiltrasi sel inflamasi, mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan meningkatkan reepitelilasi, namun mekanisme terjadi perubahan tersebut belum banyak diketahui.

Penelitian bersifat eksperimental dengan desain *the post test only control*, menggunakan 24 ekor tikus Wistar. Tikus dibagi atas 4 kelompok yaitu kontrol (PBS), perlakuan I (PBMC), perlakuan II (BM-MSC) dan Perlakuan III diberi kombinasi (PBMC dengan BM-MSC). Sel Punca diberikan subkutan dosis 2×10^6 sel/ml. Sebelum diperlakukan tikus dianestesi dengan menggunakan xylazine dan ketamin kemudian tikus dibuat luka bakar di bagian punggung dengan derajat *full thickness*. Pada hari ke 3 dan ke 7 di ambil darah dan serum yang didapatkan untuk mengukur kadar TGF- β 1 dan VEGF-A dengan metode ELISA. Pada hari ke 14 diambil jaringan kulit untuk melihat ekspresi kolagen dan integrin α 2 β 1 dengan metode imunohistokimia. Hasil penelitian dianalisis dengan uji oneway Anova dan uji lanjut Tukey.

Kadar TGF- β 1 hari ke 3 dan hari ke 7 pada kelompok yang diberi PBMC dan kombinasi PBMC dan BM-MSC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol sedangkan kelompok yang diberi BM-MSC kadar TGF- β 1 menurun. Kadar VEGF-A pada hari ke 3 setelah diberi PBMC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi pada kelompok BM-MSC dan kelompok kombinasi kadar VEGF menurun. Pemeriksaan imunohistokimia terhadap kolagen terlihat bahwa PBMC dan BM-MSC mampu meningkatkan ketebalan kolagen I dan berbeda bermakna dari ke 3 kelompok. Persentase integrin α 2 β 1 setelah pemberian PBMC dan BM-MSC belum menunjukkan persentase yang bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Kesimpulan penelitian ini bahwa pemberian PBMC dan BM-MSC dapat mempercepat penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan.

Kata Kunci: Stem sel PBMC dan MSC, TGF- β 1, VEGF-A, Kolagen tipe I, Integrin α 2 β 1

Abstract

THE EFFECT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC) AND BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC) ON THE TGF- β 1, VEGF SECRETION AND COLLAGEN TYPE I, INTEGRIN α 2 β 1 EXPRESSION TO BURN WOUND HEALING

Gusti Revilla

A burn is a serious problem for the community in developing countries because it can cause physical damage or even death so that requires a right medical care. For that they need treatment to rebuild the anatomy and normal skin function and current use of stem cells. PBMCs and BM-MSC have been shown to participate in to accelerate wound healing by reducing infiltration of inflammatory cells, accelerate the formation granulation tissue and reepithelization. Nevertheless, the mechanism change occurs are unknown.

The research is experimental design with the post test only control, using 24 wistar rats which were divided into four groups :1 control, group was given PBS, treatment group I was given PBMC, treatment group II was given MSC and treatment group III was given a combination of PBMC with BM-MSC. Stem cells had given once during the study subcutaneous with a dose of 2×10^6 cell/ml. Each rats anesthetized with xylazine and cetamine and then the rat a full thickness burns. At day 3 and 7, levels of TGF- β and VEGF serum obtained from rat's intracardiac was measured by ELISA. At day 14 after burn skin was collected to see the expression of collagen I and α 2 β 1 integrin by immunohistochemical staining. The result was analyzed using one way ANOVA and Tukey's or LSD test for multiple comparisons.

The levels of TGF- β at day 3 and 7 in the group was given PBMC and combination group was higher than in control group, while the group was given BM-MSC the levels of TGF- β decreased. The levels of VEGF-A at day 3 in the group was given PBMC was higher than in control group, but the group was given BM-MSC and combination group PBMC with BM-MSC levels of VEGF-A decreased. Immunohistochemical evaluation confirmed of the thickness of collagen I seen that PBMC and BM-MSC stem cells can increase the thickness of collagen I and showed had significantly difference higher from three group. Percentage of α 2 β 1 integrin after was given PBMC and this circumstances with accelerate the wound healing.

The conclusion of this study found that stem cells PBMC and This circumstances with accelerate the wound healing process from the inflammatory to the phase of remodelling MSC to accelerate burn wound healing on rats.

Key Word: Stem cells PBMC and MSC, TGF- β 1, VEGF-A, Collagen I, Integrin α 2 β 1

showed had significantly difference higher from three group so that to accelerate and more perfect wound healing than the control group. Percentage of $\alpha 2\beta 1$ integrin after was given PBMC and BM-MSK yet to show significant expression compared to control, this is because a lot of other adhesion mollecules that play a role in wound healing.

The conclusion of this study found that stem cells PBMC and BM-MSK to accelerate burn wound healing on rats.



ABSTRAK

PENGARUH PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC) DAN BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC) TERHADAP SEKRESI TGF- β , VEGF DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I, INTEGRIN α 2 β 1 PADA PENYEMBUHAN LUKA BAKAR

Gusti Revilla

Luka bakar merupakan masalah kesehatan dimasyarakat karena luka bakar akan menimbulkan kecacatan fisik dan kematian sehingga diperlukan penanganan yang baik. Pada saat ini banyak penelitian difokuskan dengan menggunakan sel punca. Pemberian PBMC dan MSC dapat mempercepat penyembuhan luka dengan mengurangi infiltrasi sel inflamasi, mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan meningkatkan reepitelisasi, namun mekanisme terjadi perubahan tersebut belum banyak diketahui.

Penelitian bersifat eksperimental dengan desain *the post test only control*, menggunakan 24 ekor tikus Wistar. Tikus dibagi atas 4 kelompok yaitu kontrol (PBS), perlakuan I (PBMC), perlakuan II (BM-MSC) dan Perlakuan III diberi kombinasi (PBMC dengan BM-MSC). Sel Punca diberikan subkutan dosis 2×10^6 sel/ml. Sebelum diperlakukan tikus dianestesi dengan menggunakan xylazine dan ketamin kemudian tikus dibuat luka bakar di bagian punggung dengan derajat *full thickness*. Pada hari ke 3 dan ke 7 di ambil darah dan serum yang didapatkan untuk mengukur kadar TGF- β 1 dan VEGF-A dengan metode ELISA. Pada hari ke 14 diambil jaringan kulit untuk melihat ekspresi kolagen dan integrin α 2 β 1 dengan metode imunohistokimia. Hasil penelitian dianalisis dengan uji oneway Anova dan uji lanjut Tukey.

Kadar TGF- β 1 hari ke 3 dan hari ke 7 pada kelompok yang diberi PBMC dan kombinasi PBMC dan BM-MSC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol sedangkan kelompok yang diberi BM-MSC kadar TGF- β 1 menurun. Kadar VEGF-A pada hari ke 3 setelah diberi PBMC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi pada kelompok BM-MSC dan kelompok kombinasi kadar VEGF menurun. Pemeriksaan imunohistokimia terhadap kolagen terlihat bahwa PBMC dan BM-MSC mampu meningkatkan ketebalan kolagen I dan berbeda bermakna dari ke 3 kelompok. Persentase integrin α 2 β 1 setelah pemberian PBMC dan BM-MSC belum menunjukkan persentase yang bermakna dibandingkan dengan kontrol.

Kesimpulan penelitian ini bahwa pemberian PBMC dan BM-MSC dapat mempercepat penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan.

Kata Kunci: Stem sel PBMC dan MSC, TGF- β 1, VEGF-A, Kolagen tipe I, Integrin α 2 β 1

Abstract

THE EFFECT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC) AND BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC) ON THE TGF- β 1, VEGF SECRETION AND COLLAGEN TYPE I, INTEGRIN α 2 β 1 EXPRESSION TO BURN WOUND HEALING

Gusti Revilla

A burn is a serious problem for the community in developing countries because it can cause physical damage or even death so that requires a right medical care. For that they need treatment to rebuild the anatomy and normal skin function and current use of stem cells. PBMCs and BM-MSC have been shown to participate in to accelerate wound healing by reducing infiltration of inflammatory cells, accelerate the formation granulation tissue and reepithelization. Nevertheless, the mechanism change occurs are unknown.

The research is experimental design with the post test only control, using 24 wistar rats which were divided into four groups :1 control, group was given PBS, treatment group I was given PBMC, treatment group II was given MSC and treatment group III was given a combination of PBMC with BM-MSC. Stem cells had given once during the study subcutaneous with a dose of 2×10^6 cell/ml. Each rats anesthetized with xylazine and cetamine and then the rat a full thickness burns. At day 3 and 7, levels of TGF- β and VEGF serum obtained from rat's intracardiac was measured by ELISA. At day 14 after burn skin was collected to see the expression of collagen I and α 2 β 1 integrin by immunohistochemical staining. The result was analyzed using one way ANOVA and Tukey's or LSD test for multiple comparisons.

The levels of TGF- β at day 3 and 7 in the group was given PBMC and combination group was higher than in control group, while the group was given BM-MSC the levels of TGF- β decreased. The levels of VEGF-A at day 3 in the group was given PBMC was higher than in control group, but the group was given BM-MSC and combination group PBMC with BM-MSC levels of VEGF-A decreased. Immunohistochemical evaluation confirmed of the thickness of collagen I seen that PBMC and BM-MSC stem cells can increase the thickness of collagen I and showed had significantly difference higher from three group. Percentage of α 2 β 1 integrin after was given PBMC and this circumstances with accelerate the wound healing.

The conclusion of this study found that stem cells PBMC and This circumstances with accelerate the wound healing process from the inflammatory to the phase of remodelling MSC to accelerate burn wound healing on rats.

Key Word: Stem cells PBMC and MSC, TGF- β 1, VEGF-A, Collagen I, Integrin α 2 β 1

DAFTAR ISI

	Halaman
KULIT LUAR	i
KULIT DALAM	ii
HALAMAN PERSYARATAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
UCAPAN TERIMAKASIH	v
RINGKASAN	viii
SUMMARY	xi
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xvi
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR TABEL	xxvii
DAFTAR SINGKATAN	xxix
DAFTAR LAMPIRAN	xxxi
BAB I : PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.3.1 Umum	9
1.3.2 Khusus	9
1.4 Manfaat Penelitian	10

BAB II :	TINJAUAN PUSTAKA	
2.1	Luka Bakar	11
2.1.1	Epidemiologi Luka bakar	11
2.1.2	Patofisiologi Luka Bakar	12
2.2	Penyembuhan Luka	18
2.2.1	Fase Hemostasis dan Inflamasi	19
2.2.2	Fase Proliferasi atau Fibroplasia	22
	1. Fibroplasia	23
	2. Pembentukan Jaringan Granulasi	23
	3. Kontraksi	24
	4. Epitelisasi	25
	5. Angiogenesis	26
2.3.3	Fase Remodelling	27
2.3	Faktor Pertumbuhan	29
2.3.1	<i>Transforming growth factor-beta</i> (TGF- β)	30
	a. Pembentukan dan Jenis dari TGF- β	30
	b. Fungsi TGF- β pada sel-sel yang terlibat	31
	Dalam penyembuhan luka	
	c. <i>Transforming growth factor-beta</i> 1 (TGF- β 1)	32
	Dan pengaruhnya pada fase penyembuhan luka	
2.3.2	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (PDGF)	35
2.3.3	<i>Vascular endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	36
	a. Peran VEGF dalam Fase Penyembuhan luka	38
	b. VEGF-A	39
2.3.4	Interaksi Faktor Pertumbuhan Pada Jaringan	41
	Luka	
2.4	Kolagen	42
2.4.1	Sintesis Kolagen	44
2.4.2	Kolagen Tipe I	46

2.4.3 Peranan Kolagen Dalam Penyembuhan Luka	46
2.5 Molekul Adhesi	48
2.5.1 Integrin	49
2.5.2 Peran Integrin pada Penyembuhan luka	51
2.5.3 Integrin $\alpha 2\beta 1$	52
2.6 Stem Sel	54
2.6.1 Stem Sel ” <i>Niche</i> ” dan <i>Homing</i>	57
2.6.2 Stem Sel PBMC	59
2.6.3 Stem Sel Mesenkimal (MSC)	61
2.6.3.1 Biologi Stem Sel Mesenkimal	61
2.6.3.2 Peran Stem Sel Mesenkimal dalam Penyembuhan Luka	64
Fase Inflamasi	64
Fase Proliferasi	65
2.6.4 Interaksi antara Integrin dengan Stem sel PBMC dan	68
BAB III : KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	69
3.2 Keterangan Bagan Kerangka Konsep	70
3.3 Hipotesis Penelitian	72
BAB IV: METODE PENELITIAN	73
4.1 Jenis dan Desain Penelitian	73
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	73
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian	74
4.4 Variabel Penelitian	75
4.5 Definisi Operasional	78
4.6 Kerangka Operasional	79
4.7 Bahan dan Alat yang digunakan	

4.8	Cara Pelaksanaan Penelitian	80
4.8.1	Isolasi Sel mononuclear PBMC Tikus	80
4.8.1.1	Perhitungan Jumlah Sel	81
4.8.2	Isolasi Stem sel Mesenkimal	82
4.8.3	Pelabelan MSC dan PBMC dengan PKH	82
4.8.3.1	Cara Pelabelan MSC dengan PKH2	82
4.8.3.2	Cara Pelabelan PBMC dengan PKH2	82
4.9	Persiapan hewan coba (tikus) untuk luka bakar	83
4.10	Pemeriksaan faktor pertumbuhan TGF- β 1 dan VEGF	85
4.11	Cara Pewarnaan Imunohistokimia Kolagen dan Molekul Adhesi	87
4.12	Cara Pengamatan Ekspresi Kolagen I dan Molekul Adhesi	88
4.13	Pemantapan Mutu	88
4.14	Etika Penelitian	90
4.15	Analisa Data	90
BAB V	: HASIL PENELITIAN	91
5.1	Kadar Faktor Pertumbuhan TGF- β 1 pada Serum Tikus Luka Bakar <i>Full Thickness</i> setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	91
5.2	Kadar Faktor Pertumbuhan VEGF pada Serum Tikus Luka Bakar <i>Full Thickness</i> setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	94
5.3	Ketebalan Kolagen Tipe 1 Pada Jaringan Kulit Luka Bakar setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	96
5.4	Persentase Integrin α 2 β 1 pada Jaringan Kulit Luka	101

Bakar setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi
antara PBMC dan MSC

BAB VI : PEMBAHASAN	107
6.1 Kadar Faktor Pertumbuhan TGF- β 1 pada Serum Tikus Luka Bakar <i>Full Thickness</i> setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	107
6.2 Kadar Faktor Pertumbuhan VEGF pada Serum Tikus Luka Bakar <i>Full Thickness</i> setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	113
6.3 Ketebalan Kolagen Tipe 1 Pada Jaringan Kulit Luka Bakar setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	117
6.4 Persentase Integrin α 2 β 1 pada Jaringan Kulit Luka Bakar setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	120
BAB VII : KESIMPULAN DAN SARAN	125
7.1 Kesimpulan	125
7.2 Saran	125
DAFTAR PUSTAKA	127
DAFTAR LAMPIRAN	141

DAFTAR GAMBAR

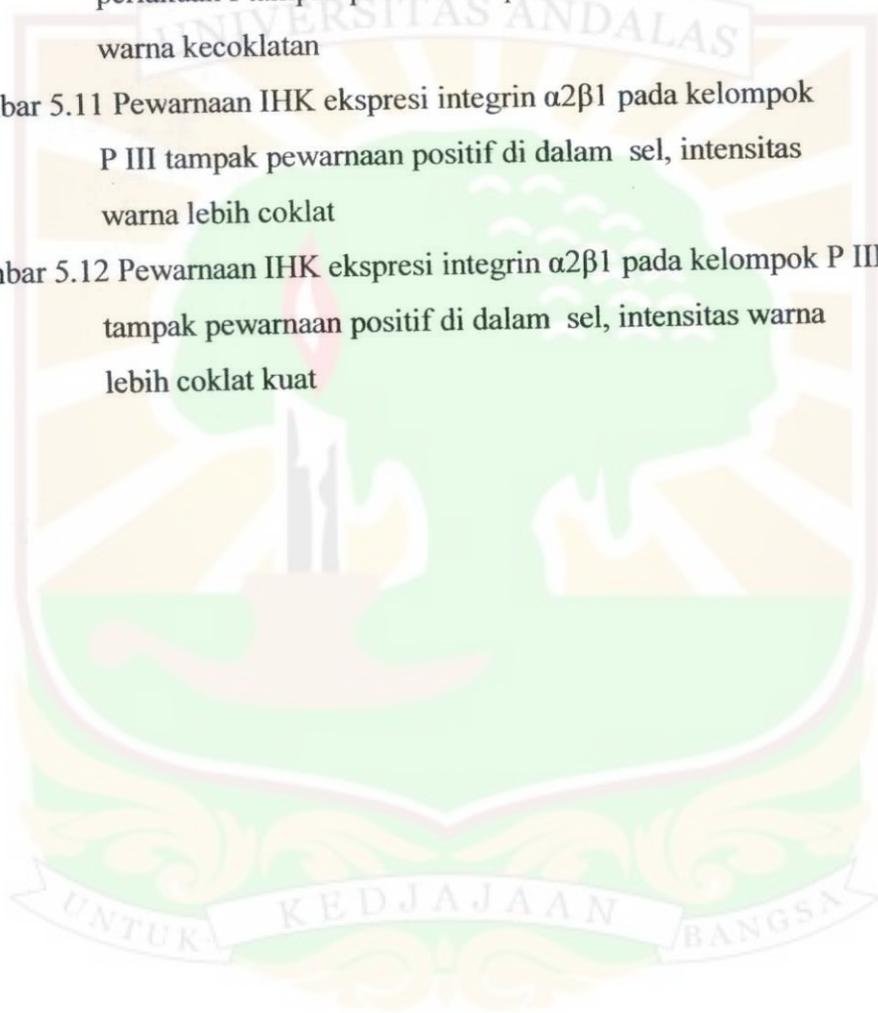
Halaman

Gambar 2.1	Derajat luka bakar kulit partial superficial	16
Gambar 2.2	Derajat luka bakar kulit partial dalam	17
Gambar 2.3	Derajat luka bakar kulit ketebalan penuh	18
Gambar 2.4	Fase-fase penyembuhan luka dan lamanya masing-masing fase	19
Gambar 2.5	Awal proses penyembuhan luka terjadi hemostasis dan terjadinya degranulasi platelet	21
Gambar 2.6	Dalam waktu 24 jam terlihat netrofil memasuki daerah luka dan keratinosit migrasi berada dimatriks sementara	21
Gambar 2.7	Pada hari ke 3 faktor pertumbuhan membantu sel Untuk migrasi ketempat luka sehingga fibroblast dan sel endotel migrasi	22
Gambar 2.8	Reepitelisasi dan neovaskularisasi pada hari ke 5	24
Gambar 2.9	Peran TGF- β selama proses penyembuhan luka yaitu dalam merekrut sel inflamasi, meningkatkan migrasi keratinosit dan meningkatkan produksi kolagen	34
Gambar 2.10	Sel-sel yang menghasilkan VEGF dan perannya sebagai autokrin dan parakrin	37
Gambar 2.11	Reseptor VEGF dan koreseptor yang membantu kerja dari faktor pertumbuhan VEGF selama angiogenesis	41
Gambar 2.12	Skema proses dari sintesis Kolagen	45
Gambar 2.13	Jenis molekul adhesi yang ditemukan pada permukaan sel	49
Gambar 2.14	Peran dari molekul adhesi mulai dari sel teraktivasi sampai sel migrasi di dalam pembuluh darah	52
Gambar 2.15	Peran dari molekul adhesi aktivitas interaksi antara	54

integrin $\alpha 2\beta 1$ dengan kolagen	
Gambar 2.16 Sel punca dan <i>niche</i> terlihat stem sel tidak aktif dan setelah terjadi trauma maka stem sel menjadi aktif	58
Gambar 2. 17 Peran stem sel monosit, hematopoitik stem sel dalam angiogenesis dan perbaikan jaringan	60
Gambar 2. 18 Kemampuan dari MSC untuk berdiferensiasi menjadi beberapa sel	62
Gambar 2. 19 Diferensiasi dari hematopoitik dan stromal stem cell	67
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual	69
Gambar 4.1 Skema kerangka operasional penelitian	78
Gambar 5.1 Grafik rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 3 dan 7	92
Gambar 5.2 Grafik rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 3 dan 7	94
Gambar 5.3 Grafik rata-rata kadar ekspresi kolagen tipe I pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 14	97
Gambar 5.4 Pewarnaan IHK serat kolagen I pada kelompok kontrol tampak pewarnaan positif tipis hanya berupa bayangan kecoklatan	99
Gambar 5.5 Pewarnaan IHK kolagen I pada kelompok perlakuan I tampak pewarnaan positif terlihat warna kecoklatan	99
Gambar 5.6 Pewarnaan IHK kolagen 1 pada kelompok P II tampak pewarnaan positif tipis berupa serat, intensitas warna lebih coklat	100
Gambar 5.7 Pewarnaan IHK kolagen 1 pada kelompok P III tampak pewarnaan positif tipis berupa serat, intensitas warna lebih coklat kuat	101
Gambar 5.8 Grafik rata-rata kadar ekspresi Integrin $\alpha 2\beta 1$ pada kelompok	102

kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 14

- Gambar 5. 9 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada kelompok kontrol tampak pewarnaan positif tipis di dalam sel hanya berupa bayangan kecoklatan 103
- Gambar 5.10 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada kelompok perlakuan I tampak pewarnaan positif di dalam sel terlihat warna kecoklatan 104
- Gambar 5.11 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada kelompok P III tampak pewarnaan positif di dalam sel, intensitas warna lebih coklat 105
- Gambar 5.12 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada kelompok P III tampak pewarnaan positif di dalam sel, intensitas warna lebih coklat kuat 106



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1	Derajat luka bakar	18
Tabel 2.2	Peran TGF- β terhadap sel-sel yang terlibat dalam penyembuhan luka	32
Tabel 2.3	Tipe-tipe dan lokasi dari Kolagen	43
Tabel 2.4	Jenis dan ligan integrin yang ditemukan pada vertebrata	50
Tabel 5.1	Kadar Rata-rata Faktor Pertumbuhan TGF- β 1 Serum Tikus Luka Bakar <i>full thickness</i> pada Hari ke 3 dan 7 setelah Pemeriksaan dengan Elisa	91
Tabel 5.2	Hasil Analisis kebermaknaan kadar TGF pada masing-masing Kelompok Perlakuan	93
Tabel 5.3	Kadar Rata-rata Faktor Pertumbuhan VEGF Serum Tikus Luka Bakar <i>Full Thickness</i> pada Hari ke 3 dan 7 setelah Pemeriksaan dengan Elisa	94
Tabel 5.4	Hasil Analisis kebermaknaan kadar VEGF pada masing-masing Kelompok Perlakuan	95
Tabel 5.5	Ketebalan Rata-rata Kolagen Tipe I (μ) pada Jaringan Kulit Luka Bakar setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC pada Hari Ke 14	97
Tabel 5.6	Hasil Analisis kebermaknaan ekspresi kolagen I pada masing-masing Kelompok Perlakuan	98
Tabel 5.7	Persentase Rata-rata Jumlah Sel yang Memberikan Reaksi Positif terhadap Integrin α 2 β 1 pada Jaringan Kulit Luka Bakar setelah Diberi PBMC, MSC dan Kombinasi antara PBMC dan MSC	102

DAFTAR SINGKATAN



APC	= Antigen presenting cell
ASC	= Adult stem cell
BMP	= Bone morphogenetic protein
BM-MSC	= Bone marrow mesenchymal stem cell
CCL	= Chemokines ligands
CCR	= Chemokine receptor
CD	= Cluster of differentiation
COX	= Cyclooxygenase
CTGF	= Connective tissue growth factor
DNA	= Deoxyribonucleic acid
ECM	= Extracellular matrix
EGF	= Epidermal growth factor
EMT	= Epithelial
EPC	= Endothelial progenitor cell
FGF	= fibroblast growth factor
GAG	= Glykosaminoglikan
GC-SF	= Granulocyte colony- stimulating factor
GMC-SF	= granulocyte macrophage colony stimulating factor
HGF	= Hepatocyte growth factor
HIF-1	= Hypoxia inducible factor-1
ICAM	= Intercellular adhesion molecule
IDO	= Indoleamine 2,3 dioxygenase
IFN γ	= Interferon gamma
IGF	= Insuline growth factor
IL-1	= Interleukin-1

IL-6	= interleukin-6
iNOS	= inducible Nitric oxide synthase
KDR	= Kinase insert-domain containing receptor
KGF	= Keratinosit growth factor
MCP-1	= Monocyte chemoattractan protein-1
MHC I	= Mayor histocompability class I
MMP	= Matrix metalloproteinase
mRNA	= messenger ribo nucleic acid
MSC	= Mesenchymal stem cell
NK sel	= Natural killer sel
NO	= Nitric oxide
NOS	= Nitric oxide synthase
PBMCs	= Peripheral blood mononuclear cells
PCR	= polymerase chain reaction
PDGF	= Plateled derived growth factor
PGE-2	= Prostaglandin-2
PMN	= Polimorphonuclear
RNA	= Ribo nucleic acid
RTK	= Receptor tyrosine kinase
SCF	= Stem cell factor
SDF	= Stromal derived factor
SLC	= Secondary lymphoid tissue chemokine
α SM actin	= α Smooth muscle actin
SSD	= Silver sulfadiazine
TEM	= Transitional epihtel-mesenchym
TNF- α	= Tumr necroosis factor-alfa
TGF- β	= transformingt growth factor -beta
TMMP	= Tissue inhibitor of Matrix metalloproteinase
VEGF	= Vascular endothelial growth factor

VCAM = Vascular cell adhesion molecule
VPF = Vascular permeability factor
VU = Venous ulcer



BAB I

Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Luka bakar merupakan salah satu masalah kesehatan yang serius bagi masyarakat, karena dapat mengakibatkan kerusakan fisik sampai pada kematian. Kerusakan fisik ini dapat berupa cacat tubuh yang akan mempengaruhi psikologis penderita (Evers *et al.*, 2010). Di Amerika Serikat diperkirakan 2,5 juta orang per tahun menderita luka bakar berat, dan lebih kurang 12.000 orang di antaranya meninggal (Mayhall, 2003). *World Health Organization's* (WHO) melaporkan pada tahun 2004, kejadian 110/100.000 orang mengalami luka bakar dan diperkirakan 310.000 orang dari jumlah penduduk di dunia meninggal akibat luka bakar. Di Negara Mediteranian Timur diperoleh data 187/100.000 orang per tahun, Asia Tenggara 243/100.000 orang pertahun (Othman *et al.*, 2010). Di Indonesia kasus luka bakar juga banyak namun data lengkap secara Nasional belum ada sedangkan data di RSUP DR. M. Jamil Padang pada tahun 2009, kasus luka bakar mencapai 91 orang dengan penyebabnya dari kompor dan sengatan listrik. Pada tahun 2010 ditemukan 84 kasus luka bakar dengan bermacam penyebab diantara, dari sengatan listrik 22 orang (26, 19%), siraman air panas 15 orang (17,86%) dan sisanya dari api, kompor gas, dan minyak panas (RSUP DR. M. Jamil, 2011).

Luka bakar merupakan suatu kerusakan jaringan yang kompleks baik secara lokal maupun sistemik. Luka bakar dapat disebabkan oleh suhu panas

(thermal), kimia, elektrik, dan radiasi. Kerusakan yang terjadi tergantung pada letak, kedalaman dan luas dari luka bakar. Luka bakar yang luas dan dalam akan menimbulkan kerusakan berbagai organ diantaranya kulit dan saluran nafas serta menimbulkan komplikasi yaitu infeksi dan *shock* (Evers *et al.*, 2010). Berat ringannya luka bakar tergantung pada dalam, luas, dan letak luka (Syamsuhidayat *et al.*, 2003). Untuk mengurangi risiko yang ditimbulkan oleh luka bakar yang cukup kompleks maka diperlukan penanganan yang tepat dan baik, sehingga tidak mempengaruhi penyembuhan luka (Evers, *et al.*, 2010).

Penyembuhan luka bakar seperti penyembuhan luka lain merupakan suatu proses yang kompleks melibatkan beberapa tahap yang saling berkaitan, termasuk inflamasi, proliferasi (pembentukan jaringan granulasi, reepitelisasi, pembentukan matriks ekstraseluler) dan *remodelling*. Ke tiga fase penyembuhan luka ini akan melibatkan proses vaskuler, seluler dan aktivitas biokimia. Proses penyembuhan luka dapat berlangsung dengan baik tergantung dari interaksi beberapa sitokin, molekul adhesi, faktor pertumbuhan dan *protein matrix extracellular*. Sitokin yang berperan sebagai proinflamasi adalah interleukin 1, interleukin 6 dan tumor necrosis factor (TNF), faktor pertumbuhan dan molekul adhesi merupakan respon kimia (Kumar *et al.*, 2004).

Molekul adhesi merupakan suatu komponen tempat perlekatan dalam jaringan endotel. Molekul adhesi yang berperan untuk membantu migrasi sel netrofil, keratinosit dan fibroblast. Ada beberapa jenis molekul adhesi yang terlibat dalam penyembuhan luka seperti E dan P selektin, *intercellular adhesion molecule* (ICAM), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) dan integrin (Lorenz

et al., 2003; Kotowiet *et al.*, 2000; Nagoka *et al.*, 2000). Integrin merupakan molekul adhesi reseptor transmembran yang terdiri atas subunit α dan β , dimana ke 2 sub unit ada yang bergabung dalam melakukan fungsinya. Pada saat ini telah ditemukan 24 jenis integrin. Gabungan integrin yang ditemukan berperan dalam penyembuhan luka diantaranya adalah integrin $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ dan $\alpha 4\beta 6$. Integrin juga diketahui berfungsi untuk adhesi stem sel hematopoetik dan mesenchymal stem cell/ MSC (Ellis *et al.*, 2010 ; Chamberlain *et al.*, 2007 dan Rasokat *et al.*, 2006). Peran integrin lain adalah untuk pengaturan sinyal faktor pertumbuhan diantaranya untuk merangsang TGF- β (Reynold *et al.*, 2005).

Faktor pertumbuhan yang berperan pada penyembuhan luka jumlahnya cukup banyak, diantaranya adalah *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *Vascular endothelial Growth Factor* (VEGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan *plateled derived growth factor* (PDGF). Faktor pertumbuhan ini berperan dalam migrasi, mitogen dan proliferasi dari sel keratinosit, fibroblast dan sel endotel yang ditemukan pada lapisan epidermis dan dermis kulit.

TGF- β merupakan faktor pertumbuhan yang bersifat multifungsional, diantaranya regulasi pertumbuhan sel, difensiasi dan pembentukan matriks ekstraselular termasuk kolagen dan fibronectin yang memperkuat penyembuhan luka (Cowin *et al.*, 2001; Jude *et al.*, 2002). TGF- β dapat menyebabkan apoptosis dari beberapa sel diantaranya sel B, epitel paru dan sel hematopoitik (Dennler *et al.*, 2002). Faktor pertumbuhan ini juga berperan untuk meningkatkan ekspresi integrin sehingga meningkatkan interaksi antara sel dengan matriks (Lorenz *et*

al., 2003). TGF- β 1 akan membantu migrasi sel endotel pembuluh darah dan membantu dalam pembentukan tabung pembuluh. Faktor pertumbuhan ini juga terlibat dalam meningkatkan regulasi faktor pertumbuhan angiogenik yaitu VEGF sehingga mempengaruhi proses angiogenesis (Werner *et al.*, 2003).

Peran faktor pertumbuhan pada penyembuhan luka sangat penting, sehingga dilakukan beberapa penelitian dengan memberikan faktor pertumbuhan untuk pengobatan luka seperti PDGF (Pierce *et al.*, 1991) dan bFGF (Fu *et al.*, 2000; Akita *et al.*, 2008). Pemberian lokal PDGF berperan dalam meningkatkan pembentukan jaringan granulasi dan proliferasi sel fibroblast dan makrofag, sedangkan FGF mampu mempercepat waktu penyembuhan luka bakar 2 - 4 hari dibandingkan dengan tindakan terapeutik standar.

Penyembuhan luka luka bakar membutuhkan penanganan yang baik, diawali dengan mengatasi komplikasi sistemik luka bakar dan dilanjutkan dengan penanganan pengobatan lokal terhadap luka bakar pada kulit. Beberapa senter luka bakar di rumah sakit memberikan obat topikal seperti burnazin, *sofratul*, *amion* dan *silver sulfa diazyne* (SSD). Jika luka bakar berat, maka dilakukan pencangkokan kulit. Namun hal ini belum memberikan hasil kosmetik yang memuaskan, sehingga perhatian para peneliti saat ini terfokus pada penggunaan *stem cell*/sel punca untuk mencapai penyembuhan luka yang sempurna (Metcalf *et al.*, 2007).

Stem cell atau sel punca adalah sel yang bisa memperbaharui dirinya sendiri, menghasilkan sel progenitor dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Sel punca dapat berasal dari embrionik dan sel induk dewasa. Sumber sel punca

yang sering digunakan adalah dari sumsum tulang, jaringan lemak, *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) atau sel induk darah tepi dan sel darah tali pusat. Sel punca yang berasal dari sumsum tulang dapat berupa sel punca hematopoetik dan *mesenchymal stem cell* (MSC). Sel punca PBMCs merupakan sel hematopoetik yang akan membentuk sel-sel darah, mengandung fibrosit dan endothelial progenitor sel (EPC). MSC merupakan sel punca yang bersifat multipotent progenitor sel dan berperan dalam perbaikan serta regenerasi sel pada jaringan yang rusak, termasuk regenerasi jaringan kulit (Kim *et al.*, 2007 cit Jeon *et al.*, 2010). MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteoblast, kondrosit dan secara *in vitro* MSC mampu berdiferensiasi menjadi sel endotel, sel neuron dan hepatosit. Penelitian kemampuan diferensiasi MSC lainnya yaitu menjadi keratinosit yang merupakan sel yang penting dalam penyembuhan luka (Wang *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2006 and Wu *et al.*, 2007).

Penelitian efek MSC terhadap beberapa penyakit sudah dilakukan diantaranya untuk penyembuhan fraktur tulang, iskemik serebral dan infark miokardial (Shake *et al.*, 2002 and Wang *et al.*, 2002) dan untuk penyembuhan luka. Penelitian MSC untuk penyembuhan luka bakar yang dalam pada tikus dan luka insisi yang diberikan secara injeksi ternyata mampu mempercepat penyembuhan luka dengan cara mengurangi infiltrasi sel inflamasi kedalam luka, mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan meningkatkan reepitelilisasi (Wu *et al.*, 2007 dan Jeon *et al.*, 2010). Penelitian lain dari MSC yang ditanamkan dalam *scaffold* pada babi luka bakar partial dalam, ternyata pada minggu ke empat terdapat kepadatan pembuluh darah yang signifikan pada MSC yang ditanamkan

dalam *scaffold* dibandingkan dengan yang diberi *scaffold* saja. Pada keadaan ini MSC berdiferensiasi menjadi sel endotel dan mempercepat penyembuhan luka (Liu *et al.*, 2008). Penelitian lain dari MSC secara *in vitro* terhadap kultur fibroblast, ternyata MSC dapat meningkatkan ekspresi kolagen I, III dan tenascin C, sehingga dapat digunakan untuk terapi pada kerusakan ligamen. Namun penelitian pengaruh seluler sel punca terhadap kadar pertumbuhan, molekul adhesi dan ekspresi dari kolagen setelah diberi MSC dikombinasikan dengan crud PBMC belum diungkapkan.

Penelitian crud sel punca PBMCs terhadap penyembuhan luka bakar sampai saat ini belum ditemukan, namun dari beberapa literatur secara jelas dikatakan bahwa sel punca hematopoietik baik dari sumsum tulang maupun PBMC berperan dalam angiogenesis (Takakura *et al.*, 2000), dimana fibrosit akan berdiferensiasi menjadi fibroblast dan miofibroblast yang menghasilkan faktor pertumbuhan dan kolagen yang sangat berperan dalam penyembuhan luka (Wu, *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2005 dan Abe *et al.*, 2001), sedangkan peran endotelial progenitor sel (EPC) pada penyembuhan luka dapat dilihat, dimana sel ini akan berdiferensiasi menjadi sel endotel dan mengawali vasculogenesis dan angiogenesis (Herdrick *et al.*, 2010 dan Rasokat *et al.*, 2006).

Penelitian sel punca PBMCs secara *in vitro* didapatkan bahwa sel ini mampu berdiferensiasi menjadi sel epitel (keratinosit) dan fibroblast pada kulit (Medina *et al.*, 2009), paru-paru, tractus digestivus, hepar, regenerasi myocardial, dan pembentukan neuron. Penelitian sel punca PBMCs pada luka kulit derajat dalam pada mencit diabetes didapatkan bahwa sel punca ini mampu mempercepat

pembentukan pembuluh darah baru dan pembentukan epidermis pada mencit (Rantam *et al.*, 2009). Kemampuan dari PBMC yang mengalami transdiferensiasi menjadi fibroblast dapat meningkatkan produksi kolagen dengan merangsang fibroblast sekitarnya dan matriks metaloproteinase (MMP). Keratinosit yang berasal dari transdiferensiasi PBMC ini bisa mempengaruhi fungsi dari fibrosit yaitu meningkatkan ekspresi MMP (Medina, *et al.*, 2009). Perangsangan fibroblast mungkin akan mempengaruhi produksi faktor pertumbuhan yang diperlukan selama proses penyembuhan luka.

Untuk dapat bekerja di jaringan, maka sel punca harus *homing* terlebih dahulu, kemudian baru dapat melakukan fungsinya. Untuk *homing* sel punca mengalami beberapa langkah yaitu kemoatraktan, adhesi, migrasi dan berdiferensiasi (Rasokat *et al.*, 2006). Sel punca hematopoitik melakukan *homing* dengan cara migrasi karena ada molekul adhesi selektin dan integrin, kemudian sel mengalami ekstravasasi dan selanjutnya mengalami proliferasi (Srouf *et al.*, 2001). MSC dalam melakukan *homing* juga mengalami langkah yang sama namun ada perbedaan dalam molekul adhesi. Untuk membantu *homing* MSC selain integrin dan selektin juga diperlukan ICAM (Chamberlain *et al.*, 2007).

Penelitian pada pasien luka bakar derajat dua dengan menggunakan stem sel yang berasal dari darah tali pusat, didapatkan bahwa sel punca mampu mempersingkat fase inflamasi, fase fibroplasia berjalan sesuai prediksi dan proses epitelisasi berlangsung pada daerah yang sulit serta epitel yang terbentuk lebih mendekati konfigurasi epitel normal (Moenadjat, 2009). Ini merupakan keunggulan dari sel punca, namun belum menjanjikan penyembuhan yang

sempurna, karena masih banyak hal yang belum diungkapkan dan perlu penelitian yang lebih mendalam mengenai peran sel punca dalam fase proses penyembuhan luka. Oleh karena itu, penting sekali dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai pengaruh sel punca dalam fase proses penyembuhan luka yang akan mempercepat penyembuhan luka bakar. Hal ini akan berakibat, baik efektif maupun efisiensi perawatan luka bakar.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka pada penelitian ini akan dikaji pengaruh dari sel punca PBMC, MSC dan kombinasi sel punca PBMCs dengan MCS terhadap penyembuhan luka bakar dengan mengukur kadar dari faktor pertumbuhan (TGF- β 1 dan VEGF), dan ekspresi dari kolagen tipe I dan molekul adhesi integrin α 2 β 1.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ada pengaruh pemberian PBMC, BM-MSC dan kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSC terhadap sekresi kadar TGF- β 1 pada tikus luka bakar ?.
2. Apakah ada pengaruh pemberian PBMC, BM-MSC dan kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSC terhadap sekresi kadar VEGF pada tikus luka bakar ?.
3. Apakah ada pengaruh pemberian PBMC, BM-MSC dan kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSC terhadap ekspresi kolagen tipe I pada tikus luka bakar ?.

4. Apakah ada pengaruh pemberian PBMC, BM-MSc dan kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSc terhadap ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada tikus luka bakar ?.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum Penelitian

Menganalisis pengaruh PBMCs dan BM-MSc terhadap sekresi TGF- β dan VEGF, ekspresi kolagen dan integrin $\alpha 2\beta 1$ pada proses penyembuhan luka bakar tikus.

Tujuan Khusus Penelitian

1. Menganalisis pengaruh pemberian PBMC, BM-MSc dan kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSc terhadap sekresi TGF- β 1 pada tikus luka bakar.
2. Menganalisis pengaruh PBMC, BM-MSc dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSc terhadap sekresi VEGF pada tikus luka bakar.
3. Menganalisis pengaruh PBMC, BM-MSc dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSc terhadap ketebalan ekspresi kolagen tipe 1 pada tikus luka bakar.
4. Menganalisis pengaruh PBMC, BM-MSc dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan BM-MSc terhadap persentase ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada tikus luka bakar.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini memberikan kontribusi pada:

1. Pengembangan Ilmu

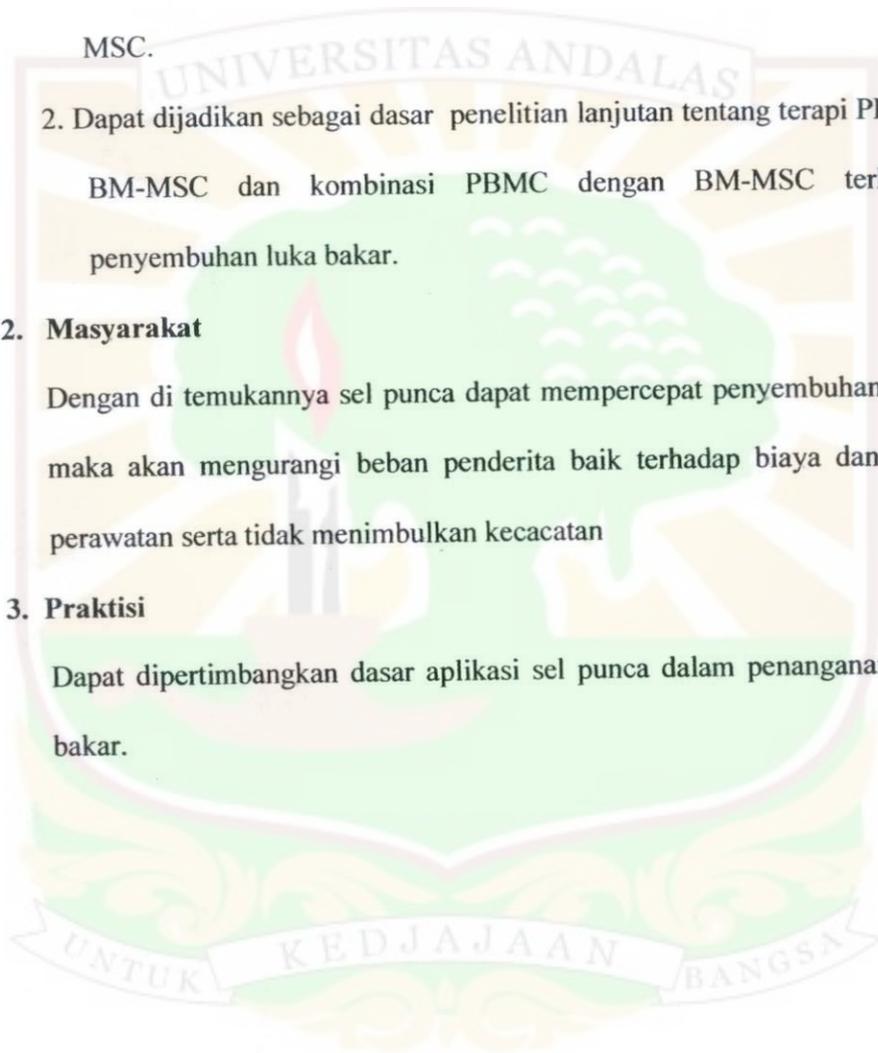
1. Dapat menjelaskan secara molekuler penyembuhan luka bakar yang diberi terapi PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC.
2. Dapat dijadikan sebagai dasar penelitian lanjutan tentang terapi PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC terhadap penyembuhan luka bakar.

2. Masyarakat

Dengan di temukannya sel punca dapat mempercepat penyembuhan luka, maka akan mengurangi beban penderita baik terhadap biaya dan lama perawatan serta tidak menimbulkan kecacatan

3. Praktisi

Dapat dipertimbangkan dasar aplikasi sel punca dalam penanganan luka bakar.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka Bakar

Luka bakar adalah trauma yang kompleks pada tubuh yang dapat mempunyai efek lokal dan sistemik. Luka bakar terjadi akibat suhu ekstrim dan dapat disebabkan oleh radiasi, suhu panas dan zat kimia (Evers *et al.*, 2010).

2.1.1 Epidemiologi Luka bakar

Kejadian luka bakar cenderung meningkat baik di negara maju maupun negara berkembang. Di Amerika Serikat mencapai 2,5 juta orang menderita luka bakar yang memerlukan perhatian medis setiap tahunnya, dan diperkirakan 12.000 orang mengalami kematian per tahun akibat cedera termal ini (Deitch, 1990 cit. Mayhall, 2003).

Di Indonesia kasus luka bakar juga banyak dialami masyarakat namun belum ada data secara Nasional yang lengkap tentang kasus ini. Penyebab luka bakar yang sering terjadi disebabkan oleh siraman air panas, kompor gas atau adanya bencana alam yaitu meletusnya gunung merapi. Luka bakar dapat berupa luka bakar ringan, sedang dan berat serta ada yang menimbulkan kematian. Dari laporan di RS DR. M. Jamil Padang pada tahun 2009 diketahui bahwa kasus luka bakar mencapai 91 orang dan penyebabnya adalah dari kompor dan dari alat elektronik dan pada tahun 2010 data ditemukan 84 kasus luka bakar yang disebabkan paling banyak adalah dari sengatan listrik 22 orang (26%), siraman air

panas 15 kasus (18%) dan sisanya dari berbagai akibat diantaranya api, kompor gas, dan minyak panas (RS DR. M. Jamil, 2009).

Pada Rumah Sakit Pusat Pertamina lima tahun terakhir ini menerima antara 33 sampai dengan 53 penderita luka bakar sedang dan berat yang di rawat di Unit Luka Bakar. Dari jumlah tersebut yang masuk dalam kategori luka bakar berat rerata 21%. Angka kematian di pusat-pusat perawatan luka bakar masih cukup tinggi berkisar 40-50%. Di Rumah Sakit Pusat Pertamina Tahun 2007 ini menunjukkan angka kematian akibat luka bakar berat menurun reratanya dari 43-50% menjadi 25% (Poerwantoro, 2008).

2.1.2 Patofisiologi Luka Bakar

Luka bakar akan menyebabkan terjadinya respon fisiologis secara lokal dan sistemik. Jackson tahun 1955 menjelaskan bahwa respon lokal akibat luka bakar yaitu terjadi perubahan sirkulasi dan perubahan histologi pada kulit. Perubahan pada sirkulasi menunjukkan adanya tiga zona yang berbeda yaitu:

- Zona koagulasi menunjukkan terjadinya kerusakan (koagulasi protein) akibat pengaruh panas atau terjadi nekrosis pada jaringan yang bersifat ireversibel dan menimbulkan jaringan parut (Church *et al.*, 2006 dan Evers *et al.*, 2010).
- Zona stasis. Zona ini berada pada jaringan berdekatan sekitar dengan daerah nekrosis luka bakar, namun mempunyai resiko untuk terjadinya nekrosis yang menyebabkan peningkatan derajat luka bakar. Kondisi ini

disebabkan karena terjadinya iskemik dan ketidakseimbangan dari mediator inflamasi (Singh *et al.*, 2007 dan Evers *et al.*, 2010).

- Zona hiperemi. Zona ini terdiri dari kulit normal dengan sedikit cedera seluler dan terjadi vasodilatasi dan terjadi inflamasi sebagai respon terhadap cedera dan tidak menimbulkan kerusakan (Evers *et al.*, 2010).

Respon sistemik akibat luka bakar yang luas terjadi akibat peningkatan sitokin dan mediator inflamasi pada jaringan yang rusak akan mempunyai dampak lain pada sistemik. Efek sistemik akan mempengaruhi sistem di dalam tubuh yaitu kardiovaskular, respirasi, perubahan metabolisme, dan respon imun (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004).

Pada sistem kardiovaskular akan terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang akan diikuti dengan ekstravasasi cairan (plasma protein dan elektrolit) dari vaskuler ke jaringan interstisial sehingga terjadi hipovolemik intravaskular dan edema interstisial. Keadaan ini akan menyebabkan volume intravaskular mengalami defisit dan proses transportasi oksigen ke jaringan berkurang sehingga menimbulkan syok (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004 dan Syaifuddin *et al.*, 2006). Selama luka juga terjadi kerusakan pada sel darah merah dan hemolisis sehingga menimbulkan anemia, peningkatan curah jantung untuk mempertahankan perfusi. Keadaan ini akan menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler dan menimbulkan edema. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah juga diikuti terjadi peningkatan pertukaran elektrolit antara sel dan cairan interstisial, sehingga dapat terjadi kekurangan sodium dalam

intravaskuler. Keadaan ini tentu akan memperlambat proses penyembuhan luka (Kobayashi *et al.*, 2004).

Gangguan respirasi umumnya disebabkan oleh panas (thermal) atau bahan kimia dan secara tidak langsung akibat adanya infeksi sekunder. Kerusakan akibat dari bahan kimia akan menimbulkan iritasi dan bronkokonstriksi pada saluran nafas. Obstruksi jalan nafas akan menjadi lebih hebat karena adanya tracheal bronchitis dan edema. Kerusakan akibat infeksi disertai pneumonia bakterial akan menyebabkan kerusakan sitotoksik. Kerusakan saluran nafas juga dapat disebabkan oleh mediator-mediator inflamasi, radikal bebas yang dihasilkan dan hipoproteinemia (Evers *et al.*, 2010 dan Syaifuddin *et al.*, 2006).

Perubahan dalam pengeluaran energi pada luka bakar berkaitan dengan proses katabolisme dan anabolisme. Setelah trauma luka bakar akan terjadi fase hipermetabolik, fase ini bertujuan untuk mengkompensasi hilangnya panas tubuh melalui proses penguapan melalui kulit yang terluka, serta perubahan dalam sirkulasi protein plasma. Perubahan metabolisme ini dipengaruhi oleh hormon dan mediator inflamasi. Mediator ini akan menyebabkan hiperkatabolisme berlangsung lebih lama dan ini akan memperburuk keadaan penderita luka bakar (Syamsuhidayat, 1997 dan Syaifuddin *et al.*, 2006). Luka bakar juga akan menyebabkan terjadinya immunosupresi, sehingga dapat terjadi sepsis yang diikuti dengan kegagalan organ lainnya. Keadaan ini akan menyebabkan morbiditas dan mortalitas pada pasien luka bakar. Luka bakar akan meningkatkan produksi mediator proinflamasi sehingga terjadi peningkatan migrasi sel-sel inflamasi dan keadaan ini dapat mempengaruhi fungsi imunitas. Mediator yang bersifat

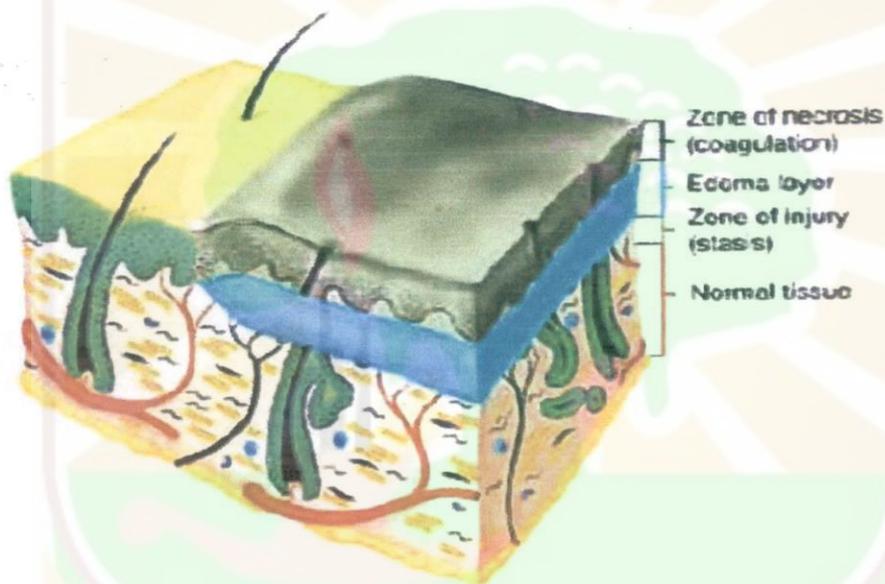
proinflamasi adalah IL-1, 6 dan IL-8 serta TNF- α , mediator ini secara normal berfungsi dalam penyembuhan luka dalam kadar yang rendah (Marano *et al.*, 1990 cit Andrzejska *et al.*, 2000) .

Peningkatan respon imunitas akibat luka bakar menyebabkan terjadinya penurunan fungsi respon alamiah dan adaptif. Luka bakar akan menginisiasi terjadinya reaksi inflamasi lokal dan sistemik. Akibat dari reaksi inflamasi juga dihasilkan radikal bebas yang akan merusak sel. Bukti terbaru menunjukkan bahwa aktivasi dari kaskade proinflamasi memainkan peran penting dalam komplikasi utama akibat luka bakar. Aspek respon imunitas penting dari luka bakar adalah peningkatan produksi eicosanoids, yang merupakan metabolit asam arakidonat (misalnya, prostaglandin, leukotrien, tromboksan) yang memiliki beberapa efek biologis. Secara umum, prostaglandin bersifat sebagai immunosupresif dan kadarnya meningkat pada pasien atau pada hewan percobaan luka bakar.

Berdasarkan kedalaman lokal luka bakar dibagi menjadi tiga derajat yaitu:

- a. Derajat satu (*superficial*) yaitu hanya mengenai epidermis dengan ditandai eritema, nyeri, fungsi fisiologi masih utuh, dapat terjadi pelepasan serupa dengan terbakar mata hari ringan, keadaan ini terlihat 24 jam setelah terpapar dan luka dapat sembuh antara 3-5 hari.
- b. Derajat dua (*partial*) dibagi atas 2 bagian yaitu dangkal/*superficial* (IIA) dan dalam/*deep* (IIB). Derajat II dangkal/*superficial* mengenai seluruh epidermis dan sebagian lapisan atas dermis (lapisan papilar). Pada derajat ini organ kulit seperti folikel rambut dan kelenjar sebacea yang masih

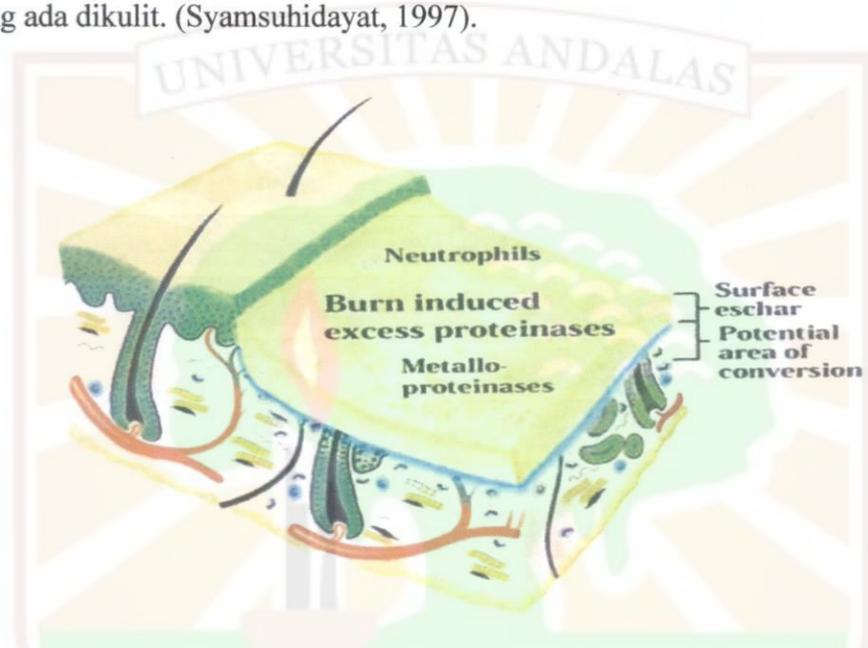
banyak ditemukan, sehingga terasa nyeri. Penyembuhan luka bakar derajat II superficial dapat terjadi dalam waktu 10 - 14 hari dan sedikit menimbulkan jaringan parut. Luka bakar derajat II yang dalam hampir mengenai seluruh lapisan dermis, sehingga organ kulit hanya sedikit yang tinggal. Penyembuhan berlangsung lama yaitu lebih dari 1 bulan dan menimbulkan jaringan parut (Syamsuhidayat, 1997).



Gambar 2.1 Derajat luka bakar kulit partial superficial dengan karakteristik terjadi nekrosis (Burn surgery Org (<file:///E:/Downloads/epidermis burn 2.htm>))

Secara histologis pada derajat II ini terlihat adanya zona nekrosis dan zona stasis. Pada zona nekrosis terlihat lapisan epidermis mengalami kerusakan/nekrosis yang bersifat ireversibel. Zona "stasis" atau "iskemia", akibat terjadi kerusakan dari mikrovaskular, gangguan metabolisme karbohidrat dan pemecahan protein dan juga terjadi nyeri hebat. Gangguan mikrovaskular akan menyebabkan kebocoran plasma sehingga terbentuk

vesikula dan bula, serta melepuh, bersamaan dengan itu respon inflamasi juga terjadi ditandai dengan peningkatan netrofil ditempat luka. Kebocoran mikrovaskular juga menyebabkan terjadi peningkatan kadar proteinase. Hal ini akan mempengaruhi terhadap fungsi fisiologis terhadap jaringan atau sel yang ada dikulit. (Syamsuhidayat, 1997).



Gambar 2.2 Derajat luka bakar kulit partial dalam terlihat peningkatan sel netrofil dan proteinase (Sumber Burn surgery Org ([file:///E:/Downloads/epidermis burn 2.htm](file:///E:/Downloads/epidermis%20burn%202.htm)))

- c. Derajat tiga yaitu jika luka bakar mengenai seluruh lapisan epidermis dan dermis, tanpa meninggalkan sisa-sisa sel epidermis. Warnanya dapat hitam, coklat dan putih, mengenai jaringan termasuk *fascia*, otot, tendon dan tulang (Syamsuhidayat, 1997 dan Vern, *et al.* 2001).



Gambar 2.3 Derajat luka bakar kulit ketebalan penuh, terlihat lapisan epidermis dan dermis mengalami nekrosis (Sumber Burn surgery Org file:///E:/Downloads/epidermis burn 2.htm)

Tabel 2. 1 Derajat luka bakar

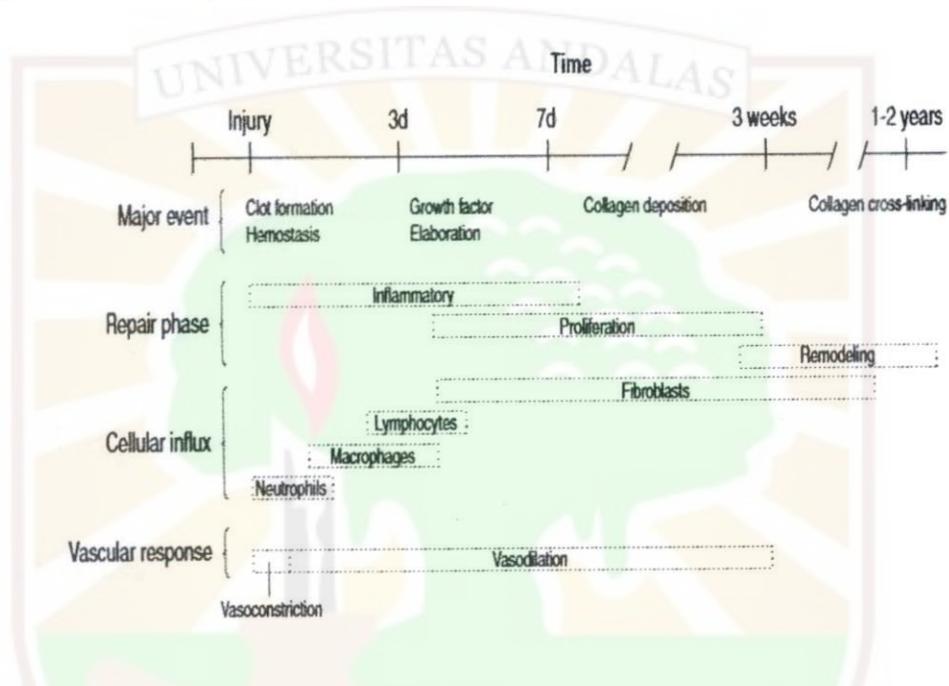
Parameter	Derajat I	Derajat II	Derajat III
1. Kedalaman	Superficial	Partial	Full thickness
2. Kerusakan pada kulit	Epidermis	Epidermis dan sebagian dermis	Epidermis dan dermis
3. Penampilan	Eritema/merah	Eritema dan bula	Putih, kehitaman
4. Sensasi	Nyeri dan sensitif	Nyeri sekali	Rasa nyeri hilang/tidak terasa

(Vern *et al.*, 2001)

2.2 Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks yang terjadi dalam 3 fase yang terdiri atas fase hemostasis dan inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi atau remodelling. Proses penyembuhan dari masing-masing fase ini saling berkaitan/tumpang tindih, tergantung dari interaksi beberapa mediator

yaitu faktor pertumbuhan, sitokin, protease dan molekul adhesi serta *protein matrix extracellular* (Greenhalg *et al.*, 1994 ; Juhasz *et al.*, 1993 Cit. Kumar *et al.*, 2004). Faktor pertumbuhan dan sitokin dapat berkerja sebagai autokrin (untuk sel sendiri) dan parakrin (pada sel lain) pada proses penyembuhan luka. Fase-fase penyembuhan luka dan proses yang terjadi dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 2.4 Fase-fase penyembuhan luka dan waktu yang dibutuhkan (Lorenz *et al.*, 2003)

2.2.1.1 Fase Inflamasi

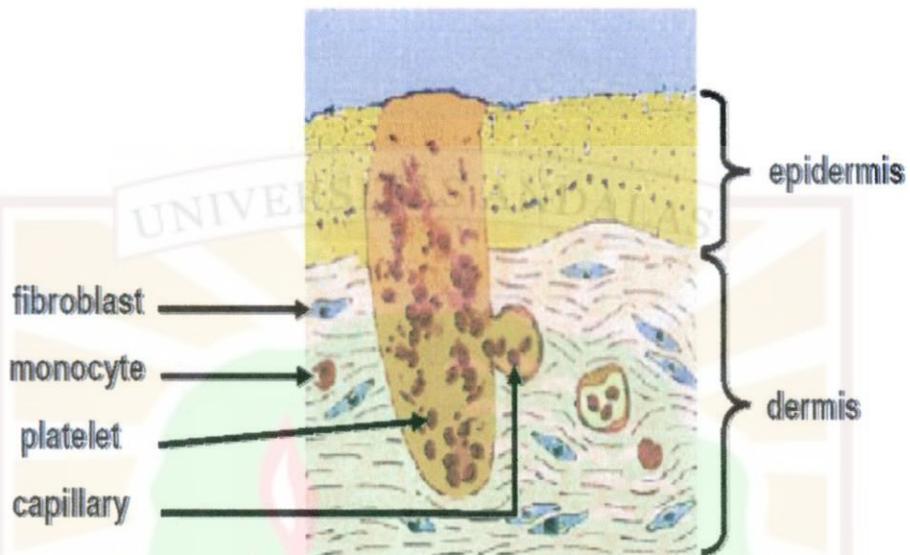
Inflamasi merupakan reaksi defensif (pertahanan) tubuh terhadap semua bentuk kerusakan yang melibatkan pembuluh darah, plasma dan sel-sel dalam sirkulasi darah. Fase inflamasi mulai setelah terjadi luka sampai hari ke 6. Pembuluh darah yang terputus saat terjadinya luka akan segera berkonstriksi, diikuti oleh aktivasi kaskade koagulasi untuk mencegah terjadinya kehilangan

darah, dan selanjutnya akan terbentuk bekuan darah, degranulasi dan agregasi platelet (Singer and Clark, 1999).

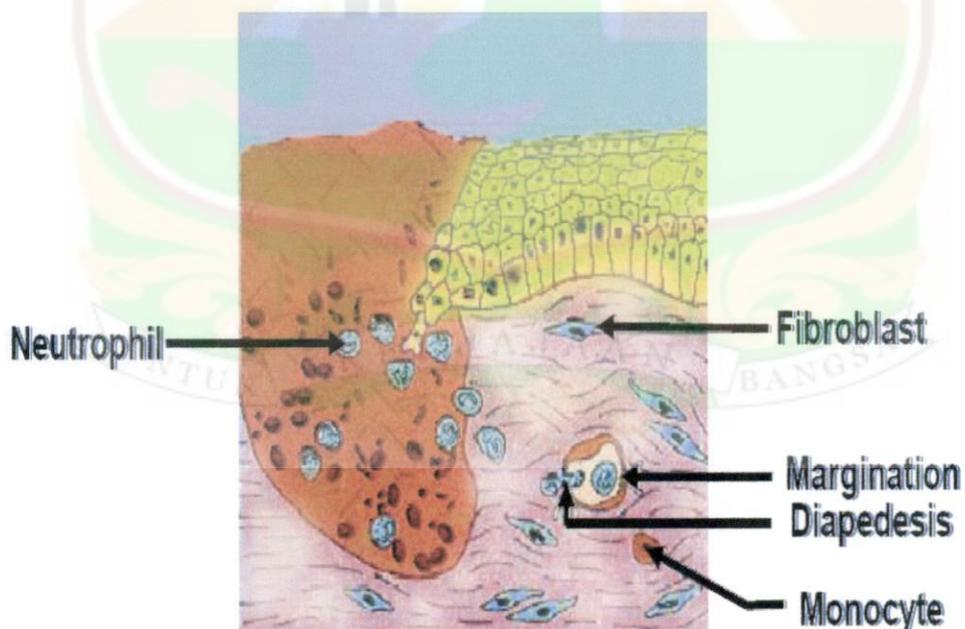
Pada proses degranulasi, platelet melepaskan granul alfa, untuk mensekresi faktor-faktor pertumbuhan seperti *epidermal growth factor* (EGF), PDGF dan TGF- β . Protein-protein ini akan menginisiasi proses penyembuhan luka dengan menarik dan mengaktifkan fibroblast, sel endotel dan makrofag (Singer and Clark, 1999). Platelet juga mengandung zat vasoaktif amine (serotonin) yang akan meningkatkan permeabilitas vaskular, sehingga terjadi eksudasi cairan kerongga ekstravaskular yang menyebabkan edema. PDGF bersama dengan sitokin proinflamasi seperti IL-1 penting dalam menarik polymorphonuclear (PMN/netrofil) ke daerah luka untuk mengawali proses inflamasi. Sel ini berada di jaringan luka relatif pendek yaitu 24-48 jam. Dalam waktu singkat netrofil akan mengadakan adhesi pada sel-sel endotel dan menembus dinding pembuluh darah untuk melakukan fungsi utama netrofil mencegah infeksi pada luka dengan cara memfagositosis infeksi dan jaringan bekas luka (Singer and Clark, 1999 ; Barrientos *et al.*, 2008).

Proses inflamasi dilanjutkan oleh sel monosit yang berubah menjadi makrofag dengan bantuan dari TGF- β . Makrofag menginisiasi pembentukan jaringan granulasi dan melepaskan bermacam sitokin proinflamasi (IL-1 dan IL-6) dan faktor pertumbuhan yaitu FGF, EGF, TGF, dan PDGF (Barrientos *et al.*, 2008), yang akan merekrut fibroblast, keratinosit dan sel endotel untuk memperbaiki jaringan (Enoch *et al.*, 2004). Makrofag berperan penting dalam meningkatkan respon inflamasi setelah 48 – 72 jam (Falanga *et al.*, 1998 cit

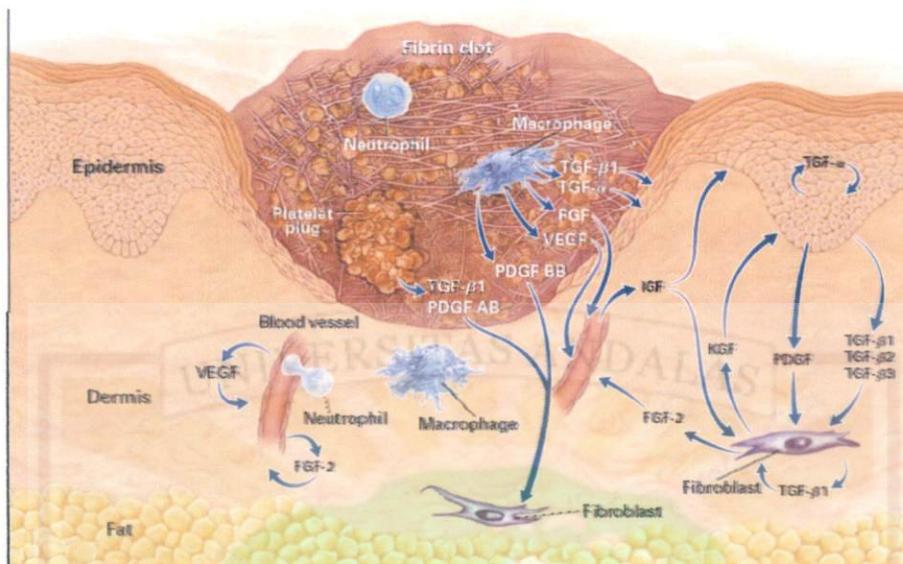
Baum *et al.*, 2005), dan sel ini dapat berada lama (berminggu-minggu) di jaringan luka, dan berperan dalam pertahanan yang kompleks pada penyembuhan luka.



Gambar 2.5 Awal proses penyembuhan luka terjadi hemostasis dan terjadinya degranulasi platelet (Borkow, 2004)



Gambar 2.6 Dalam waktu 24 jam terlihat netrofil memasuki daerah luka dan keratinosit migrasi berada di matriks sementara (Borkow, 2004)



Gambar 2.7 Pada hari ke 3 faktor pertumbuhan membantu sel untuk migrasi ketempat luka (Singer and Clark, 1999)

2.2.1.2 Fase Proliferasi atau Fibroplasia

Fase proliferasi memperlihatkan keterkaitan dengan fase inflamasi yaitu terlihat jaringan granulasi dan ditemukan makrofag serta beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin (Scott *et al.*, 2001). Pada fase proliferasi aktivasi sel yang dominan yang ada didaerah luka adalah fibroblast. Aktivasi fibroblast akan melepaskan faktor pertumbuhan dan mensintesis kolagen. Serat kolagen yang terbentuk menyebabkan adanya kekuatan untuk bertautnya tepi luka. Segera setelah terjadi luka, kolagen akan berkontak dengan darah, dan akan menyebabkan agregasi platelet dan mengaktifasi faktor kemotaktik yang penting dalam penyembuhan luka. Pada fase selanjutnya kolagen menjadi dasar pembentukan jaringan baru (Singer and Clark, 1999). Pada fase ini ada beberapa proses yang terjadi yaitu:

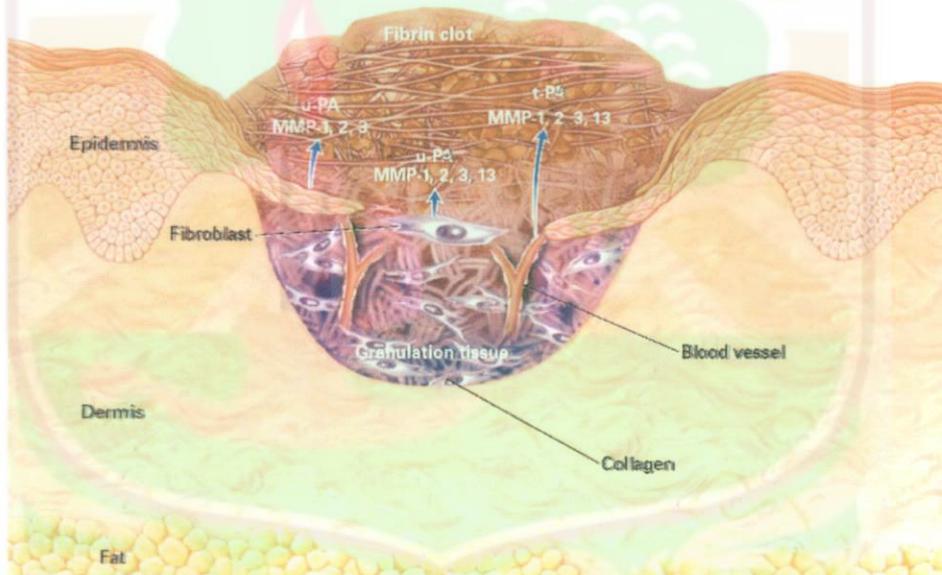
1. Fibroplasia

Proliferasi fibroblast berasal dari sel disekitar luka yang mengubah fenotipnya dan menjadi aktif selama replikasi. Proliferasi fibroblast meningkat pada hari ke 3 sampai ke 5 pada luka tanpa infeksi. Fibroblast bermigrasi kedalam luka, menggunakan timbunan fibrin dan matriks fibronectin sebagai *scaffold*. Fibroblast menjadi aktif dan mensintesis protein untuk pembelahan sel. Setelah pembelahan sel, fibroblast mensintesis dan mensekresi matriks ekstraseluler. Matriks awal berperan dalam memfasilitasi penambahan dan migrasi sel. Fibroblast migrasi memasuki dan mengisi daerah luka, kemudian enzim hialuronidase yang ada ditempat luka akan mendigesti matriks sementara yang kaya akan asam hialuronat dan kemudian menimbun lebih banyak glikosaminoglikan (GAG). Secara bersamaan, fibroblast menimbun kolagen diatas *scaffold* fibronectin dan GAG yang susunannya tak teratur. Kolagen tipe I dan III merupakan kolagen *fibriler* utama yang membentuk matriks ekstraseluler kulit. Pada awal luka kolagen tipe III lebih predominan dibandingkan dengan kulit normal, tetapi pada saat pematangan luka, kolagen tipe I lebih banyak tertimbun dalam luka (Lorenz *et al.*, 2003; Brunicardi, 2005)

2. Pembentukan jaringan granulasi

Jaringan granulasi merupakan suatu matriks longgar yang tampak pada luka dan terbentuk dari kolagen, fibronectin, dan asam hialuronat, dengan infiltrasi makrofag, fibroblast, dan sel-sel endotelial vaskuler (Lorenz *et al.*, 2003 ; Baum, 2005). Jaringan granulasi ditandai dengan terbentuknya warna kemerahan

seperti daging, akibat pembelahan dan migrasi sel endotelial untuk membentuk rangkaian jaringan kaya kapiler yang baru (angiogenesis) pada tempat luka. Proliferasi dan migrasi dari sel endotel pembuluh darah distimulasi oleh faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh platelet, makrofag dan fibroblast. Pertumbuhan sel-sel endotelial vaskuler terjadi secara simultan dengan proses fibroplasia selama pembentukan atau formasi jaringan granulasi. Jaringan granulasi pada klinik digunakan sebagai indikator untuk pencangkokan kulit untuk mempercepat penyembuhan luka (Kiritsy and Lynch, 1993).



Gambar 2.8 Reepitelisasi dan neovaskularisasi pada hari ke 5 (Singer and Clark, 1999)

3. Kontraksi

Kontraksi luka disebut juga pertumbuhan intussuseptif merupakan suatu proses penutupan luka atau memperkecil permukaan luka. Proses terjadinya kontraksi adalah dengan migrasinya sel yang ada dipinggir luka, untuk menutupi jaringan rusak. Hal ini berhubungan dengan gerakan sentripetal kulit. Kulit yang

tertarik memiliki struktur dermis normal. Secara umum kontraksi luka menguntungkan karena mengurangi area jaringan parut yang menutupi luka (Lorenz *et al.*, 2003). Sel yang bertanggung jawab pada kontraksi luka adalah myofibroblast. Myofibroblast merupakan sel mesenkim dengan fungsi dan karakteristik struktur seperti fibroblast dan sel-sel otot polos. Sel tersebut merupakan komponen seluler jaringan granulasi atau jaringan parut yang membangkitkan tenaga kontraktile melibatkan aktivitas kontraksi muskuler aktin-miosin sitoplasma. Myofibroblast berasal dari fibroblast luka, dengan ciri ekspresi aktin otot halus- α , bentuk aktif sama serupa sel-sel otot polos vaskuler. Mikrofilamen aktin tersusun sepanjang axis panjang fibroblast dan berhubungan dengan *dense bodies*. Myofibroblast juga mempunyai fungsi yaitu menghubungkan sitoskeleton ke matriks ekstraseluler yang disebut fibronexus. Fibronexus dibutuhkan untuk koneksi yang menjembatani membran sel antara mikrofilamen interseluler dan fibronectin ekstraseluler. Jadi, kekuatan kontraksi luka mungkin disebabkan oleh kumparan aktin dalam myofibroblast, dan hal tersebut diteruskan ke tepi luka oleh ikatan sel-sel dan sel dengan matriks (Hinz, 2007).

4. Epitelisasi

Dalam waktu beberapa jam setelah terjadinya luka, terjadi perubahan morfologi pada keratinosit pada tepi luka. Pada kulit yang luka, epidermal menebal, dan sel-sel basal marginal melebar dan bermigrasi memenuhi defek pada luka yang kehilangan epidermis, keadaan ini dikenal dengan *epiboli*. Satu

kali sel bermigrasi, sel tersebut tidak akan membelah hingga kontinuitas epidermal diperbaiki. Sel-sel basal yang telah diperbaiki pada area dekat potongan luka terus membelah, dan sel-sel yang dihasilkan merata dan bermigrasi ke seluruh matriks luka membentuk suatu lembaran. Adhesi sel glikoprotein seperti fibronectin, vitronectin, dan tenascin menyediakan “jalan” untuk memfasilitasi migrasi sel epitelial ke matriks luka. Keratinosit migrasi juga distimulasi oleh laminin untuk membentuk membran basal. Keratinosit menjadi kolumnar dan membelah sehingga terbentuk lapisan epidermis (Lorenz *et al.*, 2003). Kecepatan penutupan epitel akan meningkat jika luka tidak memerlukan debridement, dan jika kelembaban luka terjaga. Luka yang kering akan memperlambat re-epitelisasi. Beberapa faktor pertumbuhan yang penting yaitu EGF penting dalam mitogenitas epitel dan kemotaksis, faktor lain seperti bFGF dan KGF membantu merangsang sel epitel untuk berproliferasi (Enoch *et al.*, 2004).

5. Angiogenesis

Angiogenesis merupakan suatu proses pembentukan pembuluh kapiler baru, proses ini dapat terjadi pada semua fase didalam penyembuhan luka. Faktor pertumbuhan PDGF dan TGF- β yang disekresi oleh platelet pada fase hemostasis menarik makrofag dan granulosit untuk memulai angiogenesis. Selama fase ini, sel-sel endotel membelah sangat ekstensif. Sel endotel bermigrasi dari venula terdekat dengan luka. Migrasi, replikasi dan formasi tubuli kapiler baru sangat dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan dan sitokin. Sel sel endotel bergabung menjadi satu mengikat fibrin yang akan mensupport pembentukan dinding

pembuluh darah. Makrofag mempunyai peranan penting dalam angiogenesis yaitu mengeluarkan substansi angiogenik diantaranya TGF- β , VEGF dan FGF. Kapiler-kapiler angiogenik akan menembus bekuan darah pada luka dan akan menjadi anyaman mikrovaskuler pada jaringan granulasi luka dan berlangsung beberapa hari. Jaringan vaskuler yang melakukan invasi ini merupakan suatu respons untuk memberikan oksigen dan nutrisi yang cukup di daerah luka karena biasanya pada daerah luka terdapat keadaan hipoksia dan turunnya tekanan oksigen (Werner *et al.*, 2003 and Kumar *et al.*, 2004). *Angiogenic growth factor* sangat penting pada proses migrasi dan faktor tersebut di atas dilepaskan dari fibroblast *in situ*, makrofag dan sel-sel endotel sendiri. Angiogenesis akan berhenti sesuai dengan kebutuhan akan pembuluh darah baru. Pembuluh-pembuluh darah baru yang tidak dibutuhkan akan hilang dengan sendirinya atau melalui proses apoptosis. (Hall, 2007)

2.2.1.3 Fase Remodelling

Fase remodelling merupakan fase yang terakhir dan terpanjang pada proses penyembuhan luka. Fase ini dimulai pada minggu ke-3 setelah perlukaan dan berakhir sampai kurang lebih 12 bulan. Fase ini diinisiasi oleh perkembangan jaringan granulasi. Pada fase ini terjadi pematangan matriks, fibronectin serta bertambahnya gelendong serabut kolagen, sehingga meningkatkan kekuatan tensil jaringan. Fibroblast sudah mulai meninggalkan jaringan granulasi. Warna kemerahan dari jaringan mulai berkurang, karena pembuluh mulai mengalami regresi dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak yang berguna untuk

memperkuat jaringan parut. Kekuatan dari jaringan parut akan mencapai puncaknya pada minggu ke-10 setelah perlukaan. Untuk mencapai penyembuhan yang optimal diperlukan keseimbangan antara kolagen yang diproduksi dengan yang dipecahkan (Enoch *et al.*, 2004). Proses sintesis, deposi dan degradasi kolagen (kolagenolisis) terus menerus terjadi selama remodelling. Keseimbangan antara proses ini tercapai sekitar hari ke 21 pasca terjadinya luka. Kolagenolisis adalah hasil dari aktivitas kolagenase, suatu matriks metalloproteinase (MMP) yang diproduksi oleh fibroblast, granulosit dan makrofag. Selama fase remodelling berlanjut, aktivitas MMP semakin ditekan. Baik sintesis maupun lisis kolagen diatur oleh sitokin dan faktor pertumbuhan. TGF- β berperan meningkatkan sintesis kolagen dan juga menekan aktivitas MMP dengan aktivasi inhibitor MMP. Keseimbangan antara deposit dan degradasi kolagen adalah penentu kekuatan dan integritas jaringan luka (Brunicardi, 2005). Sebagai hasil dari fase remodelling ini adalah jaringan parut yang tipis, lemas dan pucat serta mudah digerakkan dari dasarnya. Kecepatan kekuatan luka meningkat dengan baik pada minggu 1 sampai minggu 8, kemudian kecepatan kekuatan tarik luka pada minggu selanjutnya akan menurun (Singer and Clark, 1999).

Penelitian peran dari faktor pertumbuhan sudah banyak dilakukan terhadap penyembuhan luka, baik dari luka sayat, luka diabetes dan luka bakar. TGF- β , PDGF dan VEGF merupakan faktor pertumbuhan yang berperan dalam proses penyembuhan luka (Lynch *et al.*, 1989).

2.2.2 Faktor Pertumbuhan

Faktor pertumbuhan adalah suatu protein yang berikatan pada reseptor permukaan sel dan berfungsi untuk mengaktifasi proliferasi dan diferensiasi sel. Faktor pertumbuhan disintesis oleh banyak sel, dapat berfungsi sebagai autokrin, parakrin dan jukstakrin atau mekanisme endokrin. Faktor pertumbuhan dapat mempengaruhi sifat-sifat sel sebagai konsekuensi dari keterikatannya dengan reseptor-reseptor permukaan sel yang spesifik atau protein-protein *extraselular matrix* (ECM). Faktor pertumbuhan berperan dalam perkembangan, perbaikan jaringan yang rusak diantaranya penyembuhan luka dan dalam regenerasi sel (Traversa and Sussman. 2001).

Pada penyembuhan luka faktor pertumbuhan yang berpengaruh cukup banyak diantaranya adalah keluarga *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor-beta* (TGF- β), *fibroblast growth factor* (FGF), VEGF, GM-CSF, PDGF-BB dan CTGF. Dalam proses perbaikan jaringan faktor pertumbuhan ini bekerja melalui beberapa proses (Traversa and Sussman. 2001; Barrientos *et al.*, 2008) yaitu:

- a. Menarik sel-sel lain ke daerah luka (kemotaksis).
- b. Menginduksi proliferasi sel (mitosis).
- c. Merangsang pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis).
- d. Mengatur sintesis dan degradasi matriks ekstraselular (ECM).

Kesuksesan proses penyembuhan luka tergantung pada faktor pertumbuhan, sitokin dan kemokin yang terlibat dalam integrasi yang kompleks dari sinyal-sinyal yang mengkoordinasi proses seluler. Keterikatan faktor

pertumbuhan pada reseptor akan memicu sebuah kaskade molekuler untuk mengatur proses transkripsi protein, siklus sel, motilitas atau pola diferensiasi (Barrientos *et al.*, 2008).

2.2.2.1 *Transforming growth factor-beta* (TGF- β)

a. Pembentukan dan Jenis dari TGF- β

Transforming growth factor-beta (TGF- β) merupakan faktor pertumbuhan yang mempunyai struktur protein dimer yang terdiri atas 3 tipe dan berperan dalam beberapa fungsi fisiologis berbeda. TGF- β dihasilkan oleh hampir semua sel terutama dihasilkan oleh platelet, fibroblast, keratinosit dan makrofag (Faler *et al.*, 2006).

Transforming growth factor-beta sama dengan protein lainnya dihasilkan didalam ribosom dalam bentuk immatur dan dikeluarkan ke sitoplasma berupa proprotein. Proprotein kemudian masuk kedalam retikulum endoplasmik (RE). Di RE terjadi sintesis pembentukan TGF- β yang matur, kemudian TGF- β akan dikeluarkan dan berada pada sisi *cis* dan *trans* aparatus golgi. TGF- β akan dikeluarkan ke ekstraseluler secara difusi (Miyazono *et al.*, 1992).

Transforming growth factor-beta merupakan faktor pertumbuhan yang bersifat multifungsional diantaranya meregulasi pertumbuhan sel, diferensiasi dan pembentukan matriks ekstraseluler termasuk kolagen dan fibronectin yang memperkuat penyembuhan luka (Cowin *et al.*, 2001; Jude *et al.*, 2002). TGF- β dapat menyebabkan apoptosis dari beberapa sel diantaranya sel B, epitel paru dan sel hematopoitik (Dennler *et al.*, 2002). Faktor pertumbuhan ini juga berperan

untuk meningkatkan ekspresi integrin sehingga meningkatkan interaksi antara sel dengan matriks (Lorenz *et al.*, 2003).

Transforming growth factor-beta mempunyai 3 tipe yaitu TGF- β 1,2 dan 3. Ditemukan juga bagian yang termasuk anggota TGF- β yaitu bone morphogenic protein (BMP) dan aktivins. TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3 adalah bentuk utama yang ditemukan pada mamalia. Ketiga TGF- β ini mempunyai potensi dan fungsi biologi yang berbeda dalam penyembuhan luka. TGF- β 1 bersifat predominan pada penyembuhan luka kulit (Shah *et al.*, 1999).

Transforming growth factor-beta-2 dan TGF- β 3 dapat merekrut sel-sel inflamasi dan fibroblast ke daerah luka. Penelitian secara *in vivo* memperlihatkan bahwa TGF- β 2 menstimulasi pembentukan jaringan granulasi dengan menginduksi angiogenesis, mempercepat reepitelisasi, sedangkan TGF- β 3 akan memfasilitasi migrasi keratinosit dan stimulan yang kuat untuk neovaskularisasi. TGF- β 3 berperan menghambat pembentukan jaringan parut dan mengawali organisasi kolagen (Shah *et al.*, 1999).

b. Fungsi TGF- β pada sel-sel yang terlibat dalam Penyembuhan Luka

Pada penyembuhan luka TGF- β berperan dalam ke 3 fase dan berfungsi langsung pada sel monosit, fibroblast, endotel dan keratinosit. Peran TGF- β ini dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 2.2 Peran TGF- β terhadap sel-sel yang terlibat dalam penyembuhan luka

No	Jenis Sel	Fungsi
1.	Monosit	Kemoatraktan Membantu ekspresi molekul adhesi intraselular untuk migrasi sel
2.	Fibroblast	Kemoatraktan dan stimulasi proliferasi Mengontrol produksi dari ECM Meningkatkan produksi kolagen dan fibronektin Stimulasi perubahan fibroblast menjadi miofibroblast
3.	Sel Endotel	Stimulasi proliferasi Bekerja sendiri dan sinergis dengan faktor pertumbuhan lain untuk migrasi sel endotel untuk angiogenesis Pembentukan tabung pembuluh
4.	Keratinosit	Menurunkan proliferasi dan meningkatkan migrasi Berperan dalam reepitelisasi

(Faler *et al.*, 2006).

c. *Transforming growth factor-beta 1* (TGF- β 1) dan Pengaruhnya pada fase Penyembuhan Luka

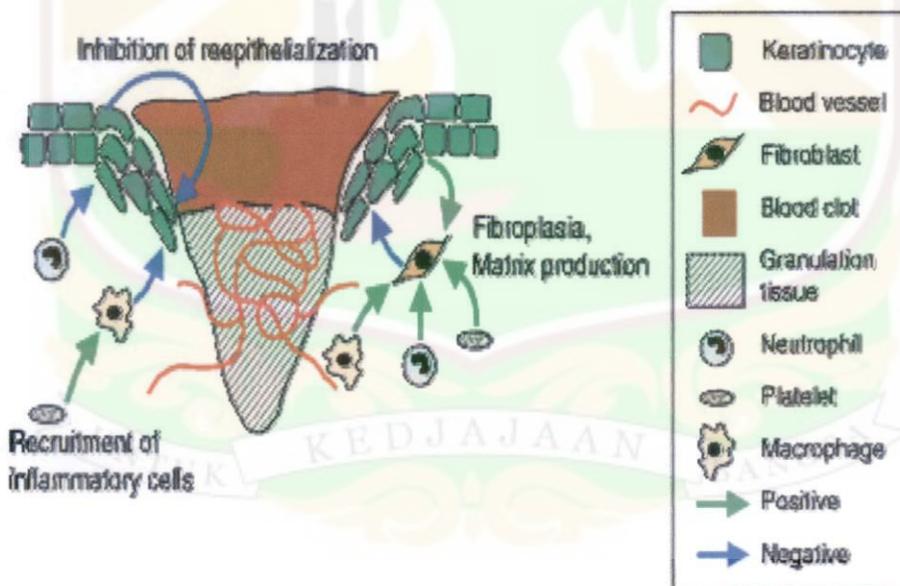
Transforming growth factor-beta-1 merupakan tipe yang predominan dan ditemukan pada sebagian besar jaringan dan faktor pertumbuhan ini paling banyak dihasilkan oleh platelet. Secara umum TGF- β 1 berfungsi dalam proliferasi bermacam-macam jenis sel, produksi matriksekstraselular dan membantu sintesis faktor pertumbuhan lain. Dalam penyembuhan luka faktor pertumbuhan ini mempunyai banyak fungsi yaitu dalam inflamasi, angiogenesis, reepitelisasi dan regenerasi jaringan ikat. Ekspresi TGF- β 1 meningkat dengan terjadinya kerusakan (Yang *et al.*, 2001).

Pada proses inflamasi TGF- β 1 akan memfasilitasi rekrutmen dari sel-sel inflamasi dan meningkatkan debridement jaringan yang dimediasi oleh makrofag. TGF- β 1 juga mampu mengdeaktivasi produksi superoksida dari makrofag secara *in vitro* pada luka yang disterilkan. Keadaan ini akan membantu melindungi jaringan sehat sekitar dan menyiapkan luka untuk pembentukan jaringan granulasi. TGF- β 1 menghambat proliferasi sel-sel imun dan bersama dengan sitokin lainnya menjaga keseimbangan dan toleransi dari sistem imun (Faler *et al.*, 2006).

Pada proses angiogenesis, TGF- β 1 akan membantu migrasi sel endotel pembuluh darah dan membantu dalam pembentukan tabung pembuluh. Faktor pertumbuhan ini juga terlibat dalam meningkatkan regulasi faktor pertumbuhan angiogenik yaitu VEGF sehingga mempengaruhi proses angiogenesis (Werner *et al.*, 2003).

Peran TGF- β 1 selama reepitelisasi masih belum dipahami dengan baik, karena dari penelitian TGF- β 1 mempunyai kemampuan sebagai meningkatkan dan menghambat proliferasi dan migrasi keratinosit. Hasil penelitian secara *in vitro* didapatkan bahwa TGF- β 1 menghambat proliferasi keratinosit tetapi menstimulasi migrasi keratinosit, dengan mempengaruhi ekspresi integrin pada keratinosit. Lebih lanjut penelitian pada hewan percobaan menunjukkan bahwa ekspresi yang berlebihan dari TGF- β 1 meningkatkan proliferasi fenotif dari keratinosit khususnya selama tahap akhir dari penyembuhan luka (Yang *et al.*, 2001; Barrientos *et al.*, 2008).

Pada fase remodelling TGF- β 1 terlibat dalam produksi kolagen (tipe 1 dan 3). TGF- β 1 juga merupakan inhibitor yang penting dari MMP-1, 3 dan 9 dan mengawali pembentukan dari MMP/TMMP-1, sehingga menghambat pemecahan kolagen. Kemampuan TGF- β 1 untuk menstimulasi sintesis prokolagen tipe 1 dan fibronectin (Raghow *et al.*, 1987) dengan menstabilkan mRNAnya. TGF- β 1 memainkan peran utama dalam patogenesis dari fibrosis dengan menginduksi dan mempertahankan aktivasi fibroblas keloid. Peningkatan yang bersifat lokal dari pelepasan dan aktivasi TGF- β 1 dalam luka bakar dapat menghambat reepitelisasi dan memacu fibrosis seperti pada glomerulonephritis, sirosis hepar dan pulmo (Yang *et al.*, 2001)



Gambar 2.9 Peran TGF- β selama proses penyembuhan luka yaitu dalam merekrut sel inflamasi, meningkatkan migrasi keratinosit dan meningkatkan produksi kolagen (Werner *et al.*, 2003)

2.2.2.2 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Platelet Derived Growth Factor (PDGF) merupakan faktor pertumbuhan yang terdiri atas PDGF – AA, AB, BB, CC dan DD. PDGF dihasilkan oleh platelet, makrofag, endotel pembuluh, fibroblast dan keratinosit. PDGF mempunyai peran pada setiap tahap penyembuhan luka. Setelah terjadi luka, PDGF dilepaskan dari degranulasi platelet dan berada pada cairan luka. PDGF akan menstimulasi mitogenitas dan kemotaksis netrofil, makrofag, fibroblast dan sel-sel otot polos ke daerah luka. PDGF juga menstimulasi makrofag untuk memproduksi dan mensekresi faktor pertumbuhan seperti TGF- β . Sangat mirip dengan TGF- β , PDGF juga meningkatkan debridement jaringan yang dimediasi oleh makrofag dan pembentukan jaringan granulasi. Secara *in vitro*, PDGF bekerja secara sinergis dengan kondisi hipoksia untuk meningkatkan ekspresi dari VEGF. PDGF khususnya penting dalam maturasi pembuluh darah. Penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa PDGF bersama dengan VEGF akan bekerja meningkatkan integritas dari kapiler-kapiler, namun efek angiogenik PDGF lebih lemah dari VEGF dan tidak berperan pada pembentukan awal dari pembuluh darah. PDGF juga meningkatkan proliferasi dari fibroblast dan produksi ECM. Selama remodeling jaringan PDGF membantu untuk memecahkan kolagen yang tua dengan meningkatkan regulasi matrix metalloproteinase .

Recombinan PDGF-BB (becalpermin) varian manusia telah sukses diaplikasikan pada diabetes dan *venous ulcus* (VU), dan telah disetujui FDA untuk terapi luka kronik. Penelitian terapi gen PDGF telah sukses dan aman setelah diuji coba pada pasien luka kronik. Hasil penelitian terhadap pemberian PDGF akan

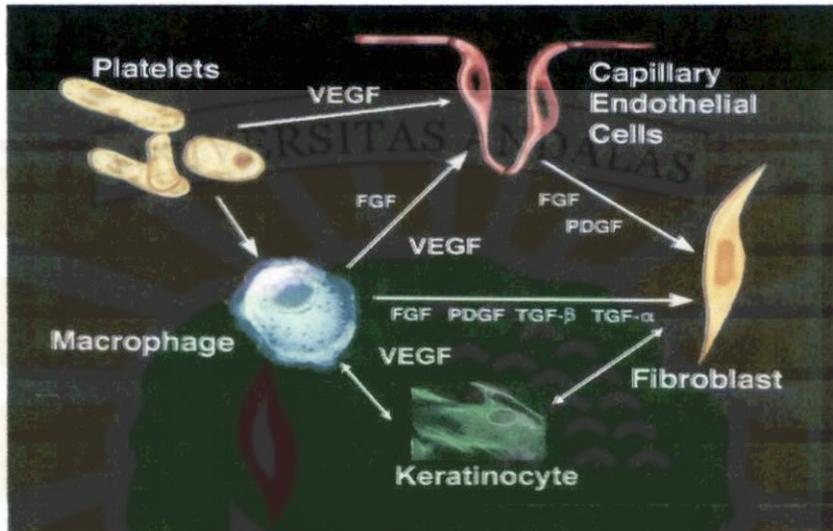
menyebabkan percepatan penyembuhan luka, regenerasi dermal tanpa kontraksi luka dan mengurangi pembentukan scar (Yonei *et al.*, 2007). PDGF menginduksi pembentukan matriks metalloproteinase yang dihasilkan oleh fibroblast dan miofibroblas. Enzim ini memicu kontraksi matrik kolagen dan factor pertumbuhan endotel pembuluh darah yang menyebabkan peningkatan kapiler baru pada luka atau angiogenesis (Kumar *et al.*, 2004). Pada penelitian lainnya juga diketahui bahwa peran PDGF yang dikombinasikan dengan kolagen pada kelinci luka ulkus didapatkan bahwa bioaktivitas yang kuat dari PDGF-BB untuk mengawali reepitelisasi pada dermis luka ulkus, deposit kolagen dan pembentukan lumen kapiler yang baru pada jaringan luka (Sun *et al.*, 2007). TGF- β , PDGF dan FGF tidak berperan langsung pada endotelial vaskular, tetapi berperan secara tidak langsung pada pembentukan pembuluh darah baru (Hall, 2007).

2.2.2.3 *Vascular endothelial Growth Factor (VEGF)*

Vascular endothelial Growth Factor (VEGF) ditemukan tahun 1983 dan awalnya dikenal sebagai vascular permeability factor (VPF) atau vaskulotropin. Pada tahun 1990 namanya ditetapkan menjadi VEGF. VEGF merupakan glikoprotein berperan penting dalam vasculogenesis selama embriogenesis dan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) pada penyembuhan luka dan fungsi reproduksi wanita dewasa (Senger *et al.*, 1990 cit Ferrara 2009).

Faktor pertumbuhan ini terdiri atas VEGF -A,B,C, D, E yang mempunyai jumlah asam amino 121 - 200. VEGF dihasilkan oleh sel endotel, keratinosit, fibroblast, sel otot polos, platelet, netrofil dan makrofag. VEGF yang dihasilkan

oleh sel-sel tersebut akan berperan dalam migrasi, proliferasi sel endotel, stimulasi dari migrasi keratinosit dan membantu fibroblast untuk menghasilkan kolagen. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.10 dibawah ini.



Gambar 2.10 Sel-sel yang menghasilkan VEGF dan perannya sebagai autokrin dan parakrin (Bao *et al.*, 2009).

Vascular endothelial Growth Factor (VEGF) dihasilkan pada awal luka setelah terjadinya agregasi platelet. Faktor pertumbuhan ini akan mempengaruhi kaskade dari proses koagulasi. Pada hari ke 2 setelah luka VEGF dihasilkan oleh makrofag yang akan membantu migrasi dan proliferasi sel endotel sehingga membentuk kapiler baru. VEGF bisa bekerja dengan adanya reseptor permukaan tyrosin kinase *Flt-1/fms-like tyrosine kinase* (VEGFR-1) dan *KDR/kinase insert-domain containing receptor* (VEGFR-2), yang terdapat pada permukaan sel endotel pembuluh darah. Reseptor-reseptor ini mempunyai fungsi yang berbeda. KDR adalah reseptor yang penting pada mitogen, kemotaksis dan proliferasi sel endotel secara *in vitro* serta juga bertanggung jawab untuk menginduksi difrensiasi sel endotel. Reseptor Flt-1 dibutuhkan untuk pengorganisasian

pembuluh darah, memediasi permeabilitas vascular, ekspresi MMP pada sel otot polos pembuluh dan protein anti apoptotik (Suarez *et al.*, 2006).

a. Peran VEGF dalam penyembuhan luka

1. Pada fase inflamasi VEGF berperan sebagai kemoatraktan untuk migrasi monosit
2. Pada angiogenesis merupakan pembentuk pembuluh darah baru dan meliputi beberapa tingkatan yaitu vasodilatasi, degradasi membrana basalis, migrasi sel endotel dan proliferasi sel endotel, selanjutnya akan terbentuk tabung pembuluh darah baru. Peran VEGF dalam vasodilatasi pembuluh darah terjadi bila faktor pertumbuhan terikat dengan reseptor (KDR) yang akan menstimulasi sintetase nitrik oksidase (NOS). Keadaan ini akan mengawali vasodilatasi dan permeabilitas dari pembuluh darah. Degradasi dari membrana basalis diawali dengan peran VEGF dalam mengatur keseimbangan enzim dalam mengawali dan menghambat migrasi sel endotel ke ruang ekstrasvaskular. Pada awal angiogenesis maka sel endotel akan bermigrasi sebelum melakukan mitosis dan pembentukan tabung pembuluh. Sel endotel akan selalu memanjang sampai hari ke 4 dan ke 5. Migrasi sel endotel memerlukan molekul adhesi integrin agar sel dapat berinteraksi dengan matriksekstraseluler. Peran VEGF dalam proliferasi sel endotel adalah dengan terjadinya pertumbuhan sel endotel dan mampu untuk menyeimbangkan antara proliferasi dan penuaan sel (Bao *et al.*, 2009).

3. Pada reepitelisasi, VEGF yang dihasilkan oleh keratinosit bersifat sebagai autokrin yang membantu proliferasi keratinosit untuk selanjutnya terjadi proses reepitelisasi (Wilgus *et al.*, 2005).
4. VEGF juga berperan dalam menstimulasi fibroblast untuk menghasilkan kolagen sehingga menambah kekuatan luka (Bao *et al.*, 2009).

b. *Vascular endothelial Growth Factor-A* (VEGF-A)

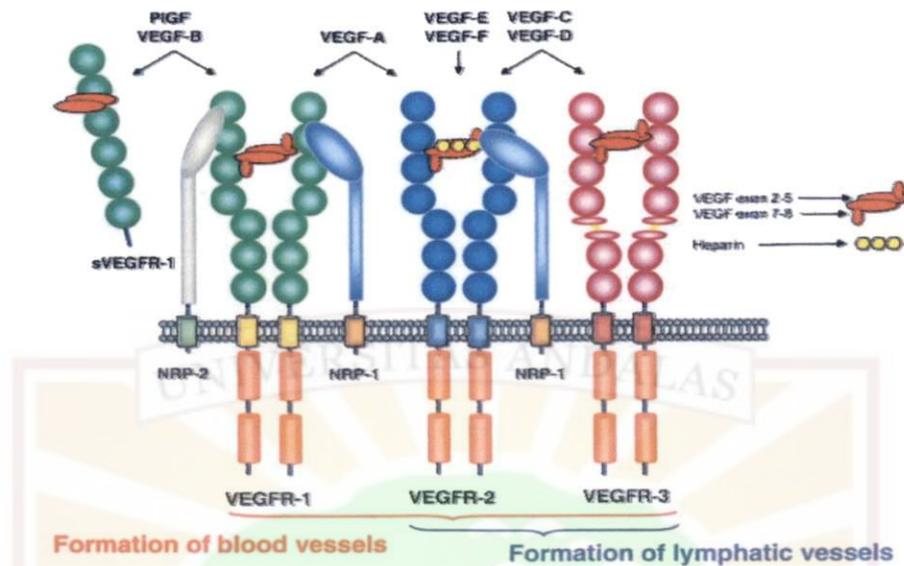
Vascular endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) terbentuk dari platelet yang teraktivasi pada saat luka dan keadaan hipodermia yang terjadi akibat perubahan pengaturan metabolik. VEGF-A berperan dalam angiogenesis dengan meningkatkan pembentukan sel endotel pembuluh pada awal angiogenesis (Nagami *et al.*, 2007) dan mengontrol dengan kuat interaksi mediator angiogenik dan nonangiogenik (Eming *et al.*, 2006). VEGF-A juga berperan mengawali kemotaksis monosit dan merupakan faktor survival untuk sel endotelial (Ferrara, 2009).

Vascular endothelial Growth Factor-A berperan menstimulasi kaskade angiogenesis pada vasodilatasi, degradasi membrana basalis, dan migrasi dan proliferasi sel endotel. VEGF-A mempunyai kemampuan vasodilatasi pembuluh darah lebih kuat dari histamin. Pada degradasi membrana basalis VEGF-A berperan dengan cara menginduksi faktor koagulan, diantaranya *Von Willebrand Factor* yang mengawali adhesi dan agregasi platelet. Migrasi sel endotel mengalami 2 cara yaitu kemotaksis dan vasodilatasi. Pada awal angiogenesis sel endotel bermigrasi kemudian akan mengalami mitosis. Proliferasi sel endotel akan

dipengaruhi oleh VEGF-A dengan cara memberikan sinyal untuk terjadinya proliferasi sel endotel (Bao *et al.*, 2009).

Sinyal kunci yang mengatur pertumbuhan, diferensiasi sel dan regenerasi dilakukan melalui reseptor transmembran yaitu reseptor tirosin kinase (RTK). Ikatan yang spesifik dengan VEGF reseptor (VEGFR) akan menghantarkan efek angiogenik dari VEGF. Ikatan tersebut mengakibatkan perubahan konformasi pada reseptor berupa dimerisasi dan berlanjut dengan sinyal transduksi melalui domain tirosin kinase. Ada 3 reseptor primer dan 2 buah ko-reseptor yang akan mengikat VEGF dan keluarganya yaitu VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 dan ko-reseptor Neuropilin-1 dan Neuropilin-2. Reseptor VEGF mempunyai 7 domain *Immunoglobulin(Ig)-like* domain. Domain 1 mengatur ikatan ligand, domain 2 dan 3 mengikat ligand dengan afinitas yang tinggi, domain 4 untuk dimerisasi, dan domain 5 dan 6 untuk retensi VEGF. Neuropilin tidak mempunyai domain/area intraseluler dan diduga meningkatkan afinitas VEGF pada reseptor primer. (Suarez *et al.*, 2006 and Bao *et al.*, 2009) Afinitas ikatan dengan reseptor dapat dilihat pada gambar 2. 12.

Reseptor dari VEGF selain ditemukan diendotel juga ditemukan pada perisit, otot polos pembuluh darah, neuron, netrofil, monosit dan keratinosit. Pada keratinosit mungkin VEGF berperan untuk mengirimkan sinyal untuk keratinosit melakukan proliferasi (Wilgus *et al.*, 2005)



Gambar 2.11 Reseptor VEGF dan koreseptor yang membantu kerja dari faktor pertumbuhan VEGF selama angiogenesis (Suarez *et al.*, 2006)

2.2.2.4 Interaksi Faktor Pertumbuhan Pada Jaringan Luka

Terdapat kerjasama dan interaksi diantara faktor-faktor pertumbuhan dalam meregulasi penyembuhan luka. Jika terdapat gangguan dan perubahan pada pola ekspresi faktor pertumbuhan ini, akan mengakibatkan penyembuhan luka yang tidak adekuat. Perdarahan lokal yang terjadi dapat menyebabkan ekstravasasi platelet dan pelepasan PDGF dan EGF. Mitogen ini menstimulasi ekspresi FGF-7 oleh fibroblast. Selain itu, netrofil dan makrofag mensekresi interleukin-1 dan TNF- α yang juga akan menstimulasi ekspresi FGF7. Selanjutnya IL-1 dan TGF- α yang disekresi oleh keratinosit akan menstimulasi ekspresi FGF-7 oleh fibroblast (Werner *et al.*, 2003). Faktor pertumbuhan tersebut merupakan yang esensial dalam pembentukan pembuluh darah baru. Makrofag yang menginvasi juga akan mensekresi faktor ini, bersamaan dengan sitokin IL-1 dan TNF- α . Faktor-faktor ini menstimulasi ekspresi VEGF oleh keratinosit dan

makrofag. Kerjasama antar faktor pertumbuhan juga terjadi pada regulasi proliferasi, diferensiasi dan sintesis kolagen pada fibroblast. Proses ini diregulasi oleh TGF- β melalui jalur *Connective tissue growth factor-dependent* (CTGF-dependent), yang mungkin berkolaborasi dengan EGF, PDGF maupun IGF-2 (Grotendorst, 2004).

Transforming growth factor-beta (TGF- β) yang dihasilkan oleh platelet, makrofag maupun netrofil akan mengaktivasi sel fibroblast untuk memproduksi CTGF dan menjadi responsif. Jika dalam suatu lingkungan terdapat ko-mitogen (PDGF atau EGF) dalam jumlah memadai, bersama dengan CTGF kedua faktor tersebut akan menstimulasi fibroblast untuk berproliferasi. Saat terjadi penurunan kadar ko-mitogen, CTGF bersama dengan IGF akan merangsang fibroblast untuk berdiferensiasi menjadi myofibroblast dan menghasilkan kolagen. Ini hanya terjadi jika pada lingkungan tersebut terdapat IGF dalam kadar yang cukup. Proses ini memperlihatkan adanya mekanisme kombinasi sinyal yang kompleks, yang melibatkan banyak faktor-faktor pertumbuhan dalam meregulasi aktivitas fibroblast dalam penyembuhan luka (Grotendorst, 2004).

2.3 Kolagen

Kolagen adalah protein utama yang menyusun komponen matriks ekstraselular. Kolagen berbeda pada setiap hewan dan juga berbeda pada jaringan dari hewan yang sama. Kolagen tersusun atas *triple helix* dari tiga rantai α polipeptida dan ditemukan 27 jenis kolagen pada hewan vertebrata. Pada manusia

kolagen ditemukan pada bagian tubuh yaitu tulang, otot dan kulit. Pada kulit ada 6 jenis kolagen yaitu tipe I, III, IV, V, VI dan VII (Hay *et al.*, 1991 cit Rangaraj *et al.*, 2011). Pada matriks ekstraselular dermis kulit diperkirakan jumlah kolagen sekitar 70 – 80% dari berat keringnya dermis (Hopkins, 1992 cit Rangaraj *et al.*, 2011). Kolagen disintesis dalam retikulum endoplasmik fibroblast kulit.

Kolagen tersusun atas *triple helix* dari tiga rantai α polipeptida. Kolagen merupakan masa yang relatif avaskuler dan aseluler berfungsi untuk mengembalikan kontinuitas, kekuatan dan fungsi jaringan. Secara prinsip kolagen berperan sebagai *scaffold* pada jaringan konektif dan terlibat dalam mengontrol fungsi selular seperti pertumbuhan, diferensiasi dan morfogenesis (Leitinge, 2011).

Tabel 2.3 Tipe-tipe dan lokasi dari Kolagen

Tipe	Panjang Serabut	Lokasi	Gen pembentuk
Tipe I	300 nm	Semua jaringan konektif kecuali kartilago hialin dan membrana basalis	<i>COL1A1 & COL1A2</i>
Tipe II	300 nm	Kartilago hialin	<i>COL2A1</i>
Tipe III	300 nm	Kulit, pembuluh darah	<i>COL3A1</i>
Tipe IV	390 nm	Membrana basalis	<i>COL4A1, COL4A2 COL4A3, COL4A4 COL4A5 & COL4A6</i>
Tipe V	300 nm	Semua jaringan	<i>COL5A1, COL5A2 COL5A3 COL6A1, COL6A2 & COL6A3</i>
Tipe VI	105 nm	Semua jaringan	<i>COL6A2</i>
Tipe VII	450 nm	<i>Dermal-epidermal junction</i>	<i>COL8A1 & COL8A2</i>
Tipe VIII	150 nm	Membrana Descement dalam mata	<i>COL9A1 & COL9A2</i>
Tipe IX	200 nm	Kartilago hialin	<i>COL10A1</i>
Tipe X	150 nm	Kartilago hipertrofik dan kartilago hialin	<i>COL9A1 & COL9A2</i>
Tipe XI	-	Sebagian kecil kartilago	<i>COL10A1 COL11A1, COL11A2 & COL2A1</i>
Tipe XII	-	Sebagian kecil tendon, berhubungan dengan tipe I	<i>COL12A1</i>
Tipe XIII	-	Transmembran dan terlibat dengan adhesi	<i>COL13A1</i>
Tipe XIV	-	Kulit dan tendon <i>fetal</i>	<i>COL15A1</i>
Tipe XVI	-	Membrana basalis, menghasilkan fragmen angiogenik	<i>COL16A1</i>
Tipe	-		<i>COL17A1</i>

XVII	-	Kartilago	
Tipe XVIII	-	Menempel diantara epidermis dan membrana basalis	
Tipe XIX	-	Menghasilkan fragmen angiogenik	
Tipe XX	-	-	
Tipe XXI	-	Berhubungan dengan kolagen tipe I	
Tipe XXII	-	Berada diperhubungan antar sel	
Tipe XXIII	-	Kolagen transmembran	
Tipe XXIV	-	Semua jaringan	
Tipe XXV	-	Kolagen transmembran pada amyloid plaque penderita Alzheimer's	
Tipe XXVI	-	Pada testis dan ovarium	
Tipe XXVII	-	Kartilago	

Canty and Kadler. 2005

2.3.1 Sintesis kolagen

Sintesis kolagen terutama dihasilkan oleh fibroblast, tetapi prosesnya mungkin sama pada jenis sel lain. Pembentukan kolagen berada didalam sel dan akan menjadi kolagen yang matang setelah berada di ekstraseluler. Kolagen terdiri dari asam amino prolin dan lisin. Di dalam sel kolagen dihasilkan secara translasi oleh ribosom berupa 2 tipe rantai peptida kemudian rantai ini berada dibagian sisterna retinakulum endoplasmik kasar (RER). Hal ini penting untuk terjadinya pembentukan pilinan dan stabilisasi rantai triple helix. Rantai peptida ini dikenal dengan preprokolagen dan kemudian peptida ini masuk kedalam lumen dari RER akan menjadi prokolagen. Peptida yang berada dalam RER akan berinteraksi dengan C-peptidase dan membentuk rantai triple helix seperti batang yang diapit oleh dua domain yaitu N dan C proteinase. Di dalam RER terjadi hidrosilasi dari prolin dan lisin. Proses ini akan dipengaruhi oleh adanya vitamin C dan akhirnya terbentuk triple helix rantai alfa atau prokolagen. Prokolagen dalam RER akan dikeluarkan untuk

2.3.2 Kolagen Tipe I

Kolagen tipe I merupakan jenis kolagen fibrilar yang sebagian besar ditemukan pada jaringan konektif, diantaranya pada kulit, tulang, tendo dan kornea, selain itu kolagen disintesis pada sel endotel dan otot polos (Twardowski, *et al.*, 2011) . Kolagen mempunyai panjang sekitar 300 nm, yang tersusun heterodimer dengan 2 rantai $\alpha 1$ dan 1 rantai $\alpha 2$ (Hay, 1991).

Pada penyembuhan luka kolagen tipe I memegang peranan penting pada setiap tahap proses penyembuhan luka yaitu dalam mengawali proses homeostasis (Morton *et al.*, 1989), berperan pada migrasi sel imun dan angiogenesis (Tettamanti *et al.*, 2005; Davis and Senger, 2005), meningkatkan komponen seluler dan mendorong proses fibroplasia (Linsenmayer, 1991).

Pada proses hemostasis kolagen tipe I yang mempunyai rantai triple helix sangat baik untuk perlekatan platelet agar terjadi agregasi (Morton *et al.*, 1989). Perlekatan platelet pada kolagen diperantarai oleh reseptor glikoprotein kolagen dan molekul adhesi integrin $\alpha 2\beta 1$ (Smethurst *et al.*, 2007). Interaksi kolagen dan integrin $\alpha 2\beta 1$ ini juga menyebabkan migrasi keratinosit dari membrana basalis. Interaksi angiogenesis kolagen dengan sel endotel melalui integrin $\alpha 2\beta 1$ merupakan ligasi yang penting selama angiogenesis (Twardowski *et al.*, 2007).

2.3.3 Peranan Kolagen Dalam Penyembuhan Luka

Pada proses hemostasis dan inflamasi, kolagen berperan dalam perlekatan trombosit pada kolagen. Sesudah terjadi interaksi, trombosit melepaskan substansi untuk memulai proses hemostasis. Interaksi kolagen-trombosit tergantung pada tingkat polimerisasi dari maturasi kolagen. Hal yang penting adalah bahwa pada

kondisi normal dari kolagen mempunyai peranan pada hemostasis dan pada kondisi abnormal dari kolagen akan terjadi perdarahan lama (Clemetson *et al.*, 2001). Pada inflamasi, kolagen akan membantu sel-sel monosit untuk bermigrasi dari darah perifer ke ekstraseluler untuk melakukan fungsinya sebagai fagositosis (Newman and Tucci, 1990).

Pada fase proliferasi akan terjadi sintesis dan deposit kolagen. Sintesis kolagen dimulai hari ke-3 setelah luka dan berlangsung secara cepat sampai minggu ke 2 – 4 (Orgel *et al.*, 2011). Kolagen yang terbentuk akan berperan dalam pembentukan jaringan granulasi, dimana pada hari pertama luka sudah terbentuk prokolagen. Pada hari ke 7, terjadi peningkatan jumlah kolagen yang cukup besar pada cairan luka. Hal ini menunjukkan efek yang baik karena jaringan granulasi dibentuk diantaranya oleh kolagen.

Pada fase remodelling maturasi kolagen tergantung pada sintesis dan degradasi kolagen. Kolagenase dan metalloproteinase di dalam luka membuang kelebihan kolagen tetapi sintesis kolagen yang baru tetap terjadi. Selama remodeling, kolagen menjadi lebih terorganisir. Fibronectin secara bertahap menghilang dan asam hialuronidase dan glikosaminoglikan diganti tempatnya oleh proteoglikan. Kolagen tipe III tempatnya digantikan oleh kolagen tipe I (Toole, 2001). Pada saat ini serabut kolagen menutup bersama, menyebabkan kolagen *cross-linking* dan akhirnya mengurangi ketebalan jaringan parut dan menghasilkan peningkatan kekuatan luka

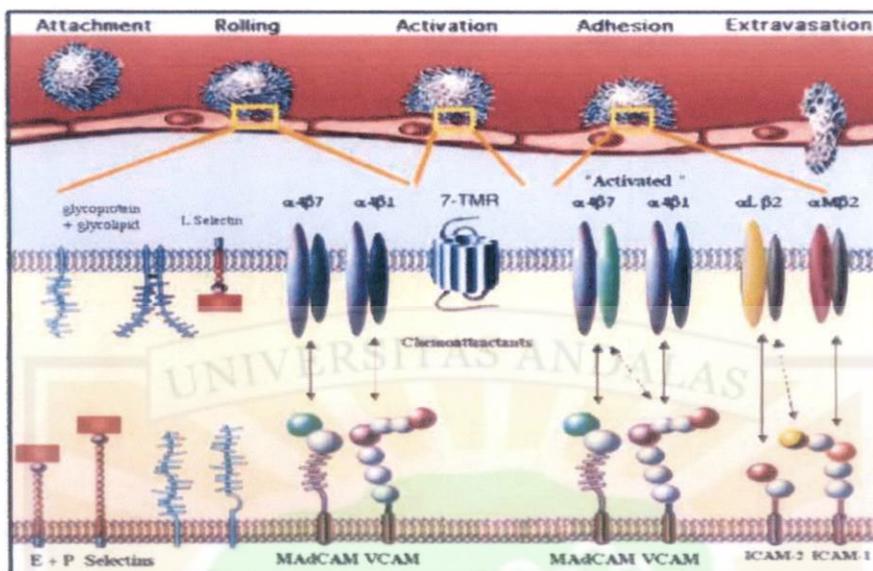
Kolagen disekresi ke ruang ekstraseluler dalam bentuk prokolagen. Bentuk ini kemudian membelah diri pada segmen terminal disebut tropokolagen.

Tropokolagen dapat bergabung dengan molekul tropokolagen lainnya membentuk filamen kolagen. Filamen – filamen ini kemudian bergabung membentuk *fibril*. *Fibril* kolagen ini selanjutnya bergabung membentuk serabut kolagen. Bentuk filamen, *fibril*, dan serabut terjadi di dalam matrik glikosaminoglikan, asam hialuronidase, chondroitin sulfat, dermatan sulfat dan heparin sulfat yang dihasilkan oleh fibroblast (Mercandetti *et al.*, 2013).

2.4 Molekul adhesi

Molekul adhesi adalah suatu protein permukaan sel yang terlibat dalam pengikatan antar sel, sel dengan endotel atau matriks ekstraseluler. Molekul adhesi berperan penting dalam proses seluler, di antaranya untuk pertumbuhan sel, diferensiasi, embriogenesis, migrasi sel dan metastasis sel kanker. Molekul adhesi juga mampu memberikan informasi dari matriks ekstraselular ke sel. Ada beberapa molekul adhesi yaitu *Immunoglobulin superfamily* yang terdiri atas *intercellular adhesion molecule* (ICAM) dan *vascular cell adhesion molecule* (VCAM), *integrins*, *cadherins* dan *selectins*

Molekul adhesi berperan dalam proses inflamasi dan respon imun. Pada proses inflamasi molekul adhesi yang berperan adalah selectin, integrin, ICAM dan VCAM. Molekul adhesi ini akan diekspresikan pada sel endotel pembuluh darah. Molekul adhesi ini berperan dalam migrasi dan extravasasi dari lekosit pada inflamasi. Ekspresi molekul adhesi akan diperkuat dengan adanya induksi dari sitokin. Bentuk dari ke 4 molekul adhesi dapat dilihat pada gambar 2. 13



Gambar 2. 13 Jenis molekul adhesi yang ditemukan pada permukaan sel (Jackson, 2002)

2.4.1 Integrin

Integrin merupakan reseptor transmembran yang dapat berada pada ekstraselular, membran dan intraselular. Integrin terdiri atas subunit α dan β . Kedua sub unit ini berkombinasi dalam melakukan fungsinya. Pada saat ini sudah ditemukan 24 jenis integrin. Integrin yang ditemukan pada membran sel mempunyai 2 domain yaitu domain yang panjang berada di ekstraseluler sedangkan yang pendek berada di intraseluler. Domain di ekstraseluler berhubungan dengan matriks ekstraseluler sedang domain intraseluler berhubungan dengan sitoskeleton (Lodish *et al.*, 2000). Jenis dan ligan dari integrin dapat dilihat pada tabel 2.4

Integrin ditemukan di berbagai sel dan beberapa sel mengekspresikan bermacam integrin yang berikatan dengan ligan yang sama, tetapi dapat dengan

selektif mengatur aktivitas dari tipe integrin masing-masing sehingga dapat menyempurnakan ikatannya dengan matriks (Lodish *et al.*, 2000).

Tabel 2. 4 Jenis dan ligan integrin yang ditemukan pada vertebrata

Subunit	Ligan	
β_1	α_1	Collagen dan Laminin
	α_2	Collagen dan Laminin
	α_3	Fibronectin dan Laminin
	α_4	Fibronectin dan VCAM
	α_5	Fibronectin
	α_6	Laminin
	α_7	Laminin
	α_v	Fibronectin
	β_2	α_L
α_M		C3b, Fibrinogen dan Factor X
α_X		Fibrinogen dan C3b
β_3	α_{11b}	Fibrinogen, Fibronectin dan Vitronectin
	α_v	Sama dengan $\beta_3\alpha_{11b}$ dan Collagen

(Sumber Lodish *et al.*, 2000)

Integrin mempunyai 2 fungsi yaitu perlekatan sel pada matriks ekstraselular dan sebagai transduksi sinyal. Integrin sebagai perlekatan sel akan berhubungan dengan matriks ekstraseluler diantaranya kolagen, laminin dan fibronectin. Hal ini akan menyebabkan sel bermigrasi dan berfungsi sebagai transduksi sinyal yang akan disampaikan ke dalam sel sehingga mempengaruhi aktivitas intraselular. Aktivitas intraselular akan mempengaruhi berbagai proses seperti proliferasi, diferensiasi, survival dan apoptosis sel (Berman *et al.*, 2003; Chien *et al.*, 2000 and Lodish *et al.*, 2000).

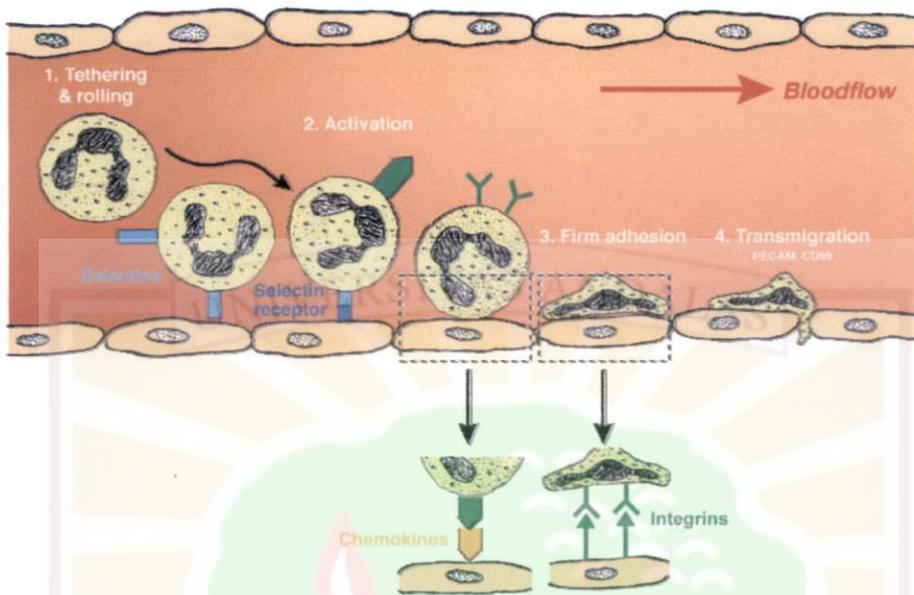
Integrin berperan baik dalam kondisi fisiologis maupun dalam keadaan patologis seperti kanker, arterosklerosis, inflamasi dan penyembuhan luka (Culbreath *et al.*, 2001). Pada waktu luka ekspresi integrin sangat meningkat.

2.4.2 Peran Integrin dalam Penyembuhan Luka

Dalam penyembuhan luka, integrin akan berperan pada fase inflamasi, proliferasi dan remodelling. Pada fase inflamasi integrin berperan mengikat platelet dengan kolagen sehingga platelet teraktivasi dan terjadi agregasi dari platelet (Jung and Moroi, 2001). Pada sel-sel inflamasi, integrin berperan dalam pengikatan yang kuat antara sel inflamasi dengan sel endotel (Lodish *et al.*, 2000). Integrin berperan pada sel yang akan mengalami migrasi seperti pada sel neutrofil (Werr *et al.*, 1998), keratinosit dan fibroblast.

Pada fase proliferasi, integrin berperan dalam pembentukan jaringan granulasi dan reepitelisasi. Pada pembentukan jaringan granulasi, integrin akan membantu migrasi dari fibroblast ke tempat luka sehingga mengawali pembentukan jaringan granulasi (Steffensen *et al.*, 2001 dan Nakayama *et al.*, 2010). Pada reepitelisasi integrin banyak ditemukan di permukaan sel keratinosit yaitu $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 6$, dan $\alpha 5\beta 1$. Integrin ini berperan dalam migrasi sel keratinosit dari pinggir luka dan proliferasi keratinosit sehingga terjadi proses reepitelisasi (Larjava *et al.*, 1993 dan Watt 2002).

Integrin dalam fungsinya dapat bekerjasama dengan faktor pertumbuhan dengan cara mengaktifkan dan pengaturan sinyal faktor pertumbuhan sehingga membantu dalam fase proliferasi penyembuhan luka (Steffensen *et al.*, 2001) diantaranya adalah TGF β (Reynold *et al.*, 2005). Peran integrin lainnya adalah dalam apoptosis, angiogenesis dan fungsi neural (Tsuji, 2004). Integrin juga berfungsi pada stem sel yaitu untuk *homing* pada jaringan yang rusak (Semon *et al.*, 2010; Srouf *et al.*, 2001).



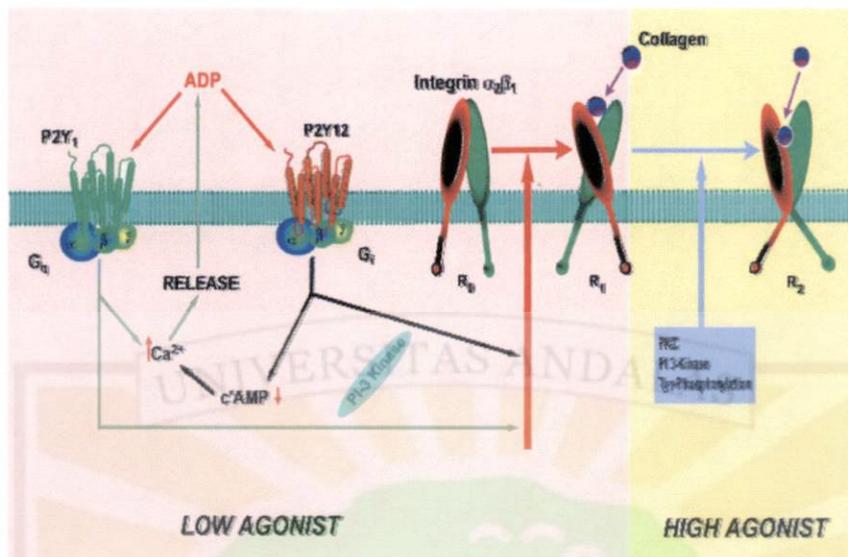
Gambar 2.14 Peran dari molekul adhesi mulai dari sel teraktivasi sampai sel migrasi di dalam pembuluh darah (Lau *et al.*, 2009).

2.4.3 Integrin $\alpha 2\beta 1$

Integrin $\alpha 2\beta 1$ disebut juga dengan GPIIb/IIIa, VLA-2, atau CD49b/CD29 yang pada awalnya ditemukan pada platelet. Integrin ini dapat berikatan dengan kolagen tipe I, II, III, IV dan XI dan berperan dalam aktivasi dan agregasi dari platelet

Kombinasi integrin ini cukup bervariasi. Integrin yang ditemukan pada epidermis khususnya keratinosit yaitu $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ dan $\alpha 6\beta 4$, dimana integrin yang paling banyak ditemukan adalah $\alpha 2\beta 1$. Integrin $\alpha 2\beta 1$ selama penyembuhan luka berperan pada hemostasis, migrasi sel, reepitelisasi sampai penutupan luka, karena integrin ini berperan untuk regulasi keratinosit (Gavani *et al.*, 1993).

Integrin $\alpha 2\beta 1$ berperan dalam perlekatan antar sel, interaksi matriks-sel, dan kolagen khususnya tipe I, III dan IV, tetapi integrin $\alpha 2\beta 1$ mempunyai afinitas lebih rendah pada kolagen tipe IV. Integrin $\alpha 2\beta 1$ mutlak dibutuhkan untuk adhesi keratinosit ke kolagen sehingga terjadi migrasi. Untuk proses penutupan luka selain integrin $\alpha 2\beta 1$, juga dibutuhkan kolagenase-1, matriks metalloproteinase-1 (MMP-1) dan kolagen tipe-1 (Eckes *et al.*, 2006). Untuk penutupan luka keratinosit berinteraksi dengan kolagen tipe I yang berikatan atau ligasi dengan $\alpha 2\beta 1$. Ikatan kolagen dermis dengan $\alpha 2\beta 1$ akan menimbulkan transduksi sinyal untuk mengawali perubahan secara seluler yang melibatkan induksi beberapa gen, termasuk MMP-1. MMP1 memecah kolagen tipe I dan akan mengurangi aviditasnya terhadap integrin $\alpha 2\beta 1$. Kemudian integrin akan membangun kontak kembali dengan kolagen baru pada dasar luka, sehingga mempertahankan migrasi keratinosit. Hasil penelitian mendapatkan bahwa jika kemampuan integrin $\alpha 2\beta 1$ berikatan dengan ligan diblok akan menyebabkan migrasi keratinosit terhenti, menghambat ekspresi dan aktivitas MMP-1 dan kolagen tipe I resisten terhadap kolagenase. Hal ini menunjukkan bahwa integrin $\alpha 2\beta 1$ perlu dipertahankan dalam jumlah/kadar yang tinggi pada kulit untuk terjadinya proses penutupan luka yang normal (Parks, 1999 cit Parks 2007). Untuk melihat interaksi antara integrin $\alpha 2\beta 1$ dengan kolagen dapat dilihat pada gambar 2.15.



Gambar 2.15 Peran molekul adhesi aktivitas interaksi antara integrin $\alpha_2\beta_1$ dengan kolagen (Jung and Moroi 2001).

2.5 Stem Sel/Sel Punca

Stem sel atau sel punca adalah sel yang bisa memperbaharui dirinya sendiri, menghasilkan sel awal dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Pada dekade terakhir perhatian dan penelitian dalam bidang sel punca (*stem cells*) mengalami kemajuan yang amat pesat. Para peneliti menggunakan sel punca untuk pengobatan penyakit-penyakit degeneratif (seperti infark jantung, stroke, parkinson, dan diabetes), maupun kelainan lainnya seperti trauma dan keganasan (Ho *et al.*, 2006).

Sel punca mempunyai potensi untuk berdiferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel yang disebut plastisitas. Plastisitas dan potensi sel punca bervariasi dibagi atas 3 bagian yaitu:

- a. Totipoten adalah kemampuan dari sel punca membentuk semua jenis sel yang berkontribusi membentuk organisme. Sifat ini hanya dipunyai oleh sel telur yang telah mengalami fertilisasi.
- b. Pluripoten adalah kemampuan sel punca membentuk hampir semua jenis sel organisme termasuk sel germinal tetapi tidak mampu membentuk plasenta. Sifat ini dipunyai oleh sel embrio dan sel germinal.
- c. Multipoten adalah kemampuan sel punca untuk membentuk hampir semua sel pada jaringan tertentu (ektodermal, mesodermal dan endodermal). Sifat ini dimiliki oleh sel punca dewasa.

Potensi dari sel punca dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan adanya sel punca dan kemampuan apoptosis pada saat proliferasi dan difrensiasi sel. Faktor genetik dari sel punca akan berpengaruh jika mengandung gen yang sesuai atau gen yang telah teraktivasi dan diprogram menjadi sel tertentu, sedangkan faktor lingkungan diantaranya faktor pertumbuhan lokal, hormon, sitokin dan kontak dengan sel akan mempengaruhi aktivasi dari sel punca (Zhao *et al.*, 2008).

Potensi sel punca dapat berbentuk regenerasi dan perbaikan (*repair*). Perbaikan berlangsung lebih cepat dan bertujuan untuk mempertahankan hidup tetapi fungsi organ atau jaringan tidak harus optimal. Regenerasi merupakan proses yang berlangsung lambat dengan hasil integritas organ atau jaringan sehingga mencapai fungsi yang normal. Proses regenerasi pada pemberian sel punca bertujuan untuk menggantikan fungsi metabolisme dari sel-sel yang rusak (diantaranya kelenjar tiroid, pankreas dan hati), menggantikan fungsi metabolisme

serta struktur organ (diantaranya otot, jantung dan kulit) dan fungsi organ (trakea, diafragma dan vesica urinaria). Penelitian penggunaan sel punca diharapkan dapat berbentuk regenerasi sehingga perbaikan jaringan atau organ akan seperti jaringan aslinya (Marshak *et al.*, 2009).

Sel punca sebelum digunakan untuk terapi harus dilakukan uji validasi terlebih dahulu untuk melihat kemampuan sel tersebut untuk berdiferensiasi, kemurnian dan tidak terkontaminasi. Penggunaan sel punca untuk terapi dikelompokkan dalam 2 cara yaitu yang pertama hanya menggunakan sel punca untuk pengobatan seperti pada penyakit kanker, diabetes melitus, stroke dan parkinson. Cara pertama ini dapat dilakukan melalui injeksi langsung pada organ atau jaringan target. Cara kedua adalah dengan menggunakan biomaterial lain (*scaffold*) dengan cara menanamkan sel punca ke *scaffold* kemudian komposit ini ditanamkan ke organ target, sehingga stem sel dapat berdiferensiasi menggantikan sel-sel organ yang rusak. Terapi dengan cara kedua telah digunakan untuk pengobatan luka bakar yang berasal dari sel monuklear yang berasal dari sumsum tulang, darah tepi dan darah talipusat (Rantam *et al.*, 2009).

Sel punca dapat berasal dari embrionik dan dewasa (adult stem cells/ ASCs). ASCs terdapat pada seluruh jaringan tubuh, namun tidak semua tempat dapat diambil karena akan menimbulkan morbiditas pada donor. ASCs berperan dalam regenerasi jaringan. ASCs berkumpul pada jaringan yang rusak atau berdiferensiasi dan melepaskan molekul-molekul signal parakrin untuk merekrut sel-sel inflamasi dan sel progenitor jaringan. Perkembangan penelitian dasar

ASCs berkembang lebih pesat dan telah diaplikasikan dalam penyakit degeneratif (Lau *et al.*, 2009).

Saat ini sumber sel punca ASCs yang paling sering digunakan adalah dari sumsum tulang, jaringan lemak, *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) atau sel induk darah tepi dan darah tali pusat. Sel punca yang berasal dari sumsum tulang ditemukan stem sel hematopoetik dan mesenchymal stem cell /MSC (Zhao *et al.*, 2008).

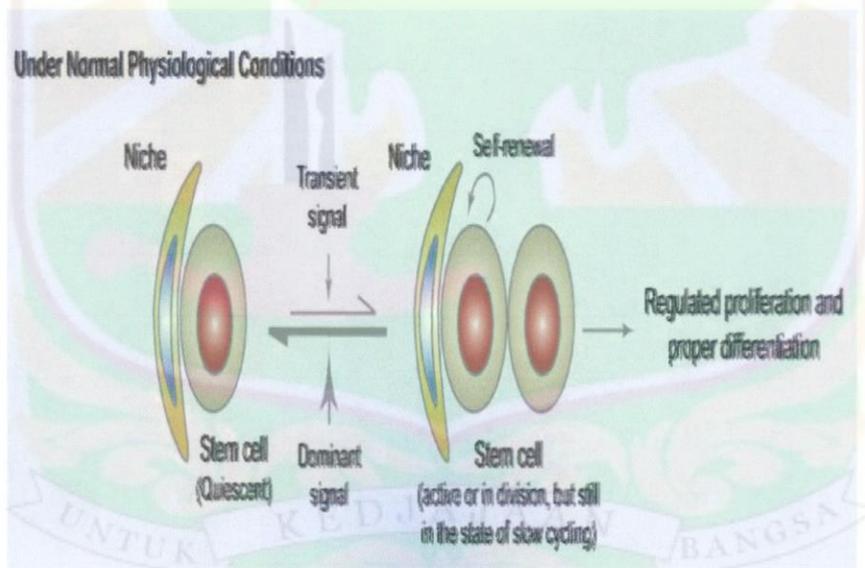
2.5.1 Sel punca "Niche" dan Homing

Sel punca *niche* merupakan suatu lingkungan mikro yang bersifat dinamis yang memelihara dan mengatur *behavior* sel punca. Lingkungan ini dapat mempertahankan keseimbangan aktivitas sel punca (hemoeostasis) dan dapat memperbaiki jaringan selama kehidupan suatu organisme. *Niche* berperan dalam mengatur jumlah dari sel punca, kemampuan untuk memperbaharui diri dan difrensiasi serta dapat mengatur motilitas sel punca (Morrisos and Spradling, 2008; Ema and Suda, 2012).

Faktor-faktor yang berperan dalam mengatur karakteristik sel punca dalam *niche* diantaranya molekul adhesi yang mengatur interaksi antara sel punca dengan *niche*, antara sel punca dengan matriks ekstraselular dan faktor pertumbuhan yang mempengaruhi proliferasi sel punca dengan mengintegrasikan sinyal-sinyal yang memperantarai respon yang seimbang sel punca terhadap kebutuhan organisme. Interaksi antara sel punca dengan *niche* akan menciptakan sistem yang dinamis diperlukan untuk menyokong kelangsungan hidup jaringan.

Selama perkembangan sel punca dan *niche* bisa saling menginduksi dan selama masa dewasa saling mengirim sinyal secara timbal balik (Watt and Mogan. 2000).

Selama perkembangan embrio, berbagai faktor *niche* bekerja terhadap sel punca untuk mengubah ekspresi gen, dan menginduksi proliferasi dan difrensiasi perkembangan fetus. Pada waktu dewasa, sel punca-*niche* akan dipertahankan dalam keadaan diam, tetapi jika terjadi trauma jaringan, lingkungan mikro sekitarnya akan menjadi aktif untuk mengirimkan sinyal ke sel punca agar memicu peremajaan diri atau difrensiasi membentuk jaringan baru. Sel punca kemudian akan mengalami migrasi untuk bisa *homing* di jaringan yang rusak (Li and Xie. 2005).



Gambar 2.16 Sel punca dan *niche*. Terlihat stem sel tidak aktif dan setelah terjadi trauma maka stem sel menjadi aktif (Li and Xie. 2005)

Homing merupakan suatu proses yang cepat dan langkah penting dalam transplantasi sel punca. *Homing* mempunyai peran dalam homeostasis sumsum tulang, untuk perekrutan leukosit dari sumsum tulang dan selama mobilisasi sel punca untuk pertahanan tubuh serta untuk perbaikan.

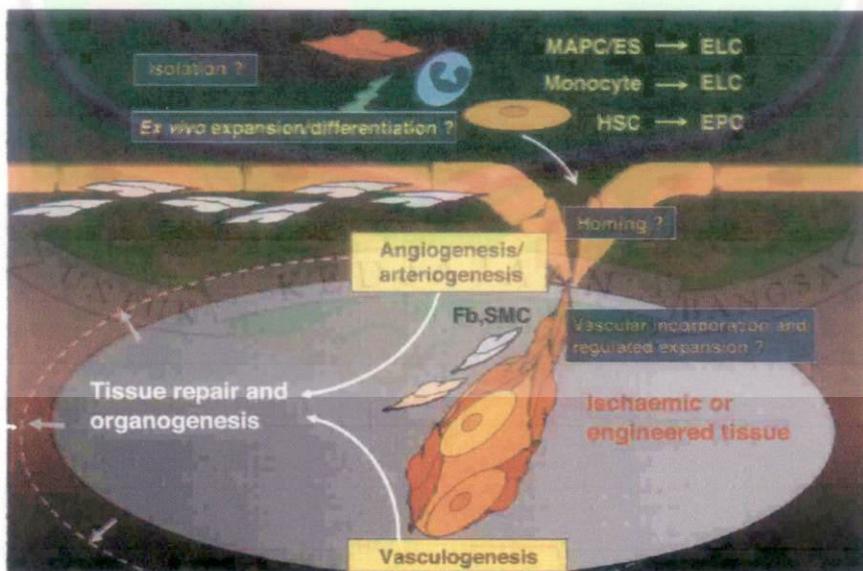
2.5.2 Sel Punca *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs)

Sel punca PBMCs berasal dari darah tepi dan merupakan sel yang telah matur terdiri dari sel hematopoetik yang terdiri dari sel monosit, fibrosit dan *endothelial progenitor cell* (EPC). Sel monosit dan fibrosit dapat bersifat sebagai APC dan menghasilkan sitokin serta faktor pertumbuhan, yang berperan dalam inflamasi, pembentukan kolagen dan angiogenesis. Sel punca PBMCs dapat berdiferensiasi menjadi sel progenitor dan mengandung fibrosit. Penelitian secara *in vitro* dari stem sel PBMCs didapatkan bahwa sel ini mampu berdiferensiasi menjadi sel epitel (keratinosit) dan fibroblast pada kulit, paru-paru, tractus digestivus, hepar, regenerasi myocardial, dan pembentukan neuron (Medina *et al.*, 2009). Penelitian sel punca PBMCs pada luka kulit derajat dalam pada mencit diabetes didapatkan bahwa sel punca ini mampu mempercepat pembentukan pembuluh darah baru dan pembentukan epidermis pada mencit (Rantam *et al.*, 2009). Kemampuan dari PBMC yang mengalami transdiferensiasi menjadi fibroblast dapat meningkatkan produksi kolagen dengan merangsang fibroblast sekitarnya dan matriks metaloproteinase (MMP). Keratinosit yang berasal dari transdiferensiasi PBMC ini bisa mempengaruhi fungsi dari fibrosit dalam proses penyembuhan luka, dengan meningkatkan ekspresi MMP (Medina *et al.*, 2009).

Penelitian crud sel punca PBMCs terhadap luka bakar dari kepustakaan yang telah terbaca belum ditemukan, namun dari beberapa literatur secara jelas dikatakan bahwa sel punca hematopoietik baik dari sumsum tulang maupun PBMC berperan dalam angiogenesis (Takakura *et al.*, 2000). Pada sel punca hematopoietik ditemukan fibrosit dan sel endotelial progenitor sel (EPC). Fibrosit

akan berdiferensiasi menjadi fibroblast dan miofibroblast yang menghasilkan faktor pertumbuhan dan kolagen yang sangat berperan dalam penyembuhan luka (Wu *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2005 dan Abe *et al.*, 2001), sedangkan peran EPC pada penyembuhan luka adalah sel ini akan berdiferensiasi menjadi sel endotel dan mengawali vasculogenesis dan angiogenesis (Herdrick *et al.*, 2010 dan Rasokat *et al.*, 2006).

Pada pasien luka bakar derajat dua telah dilakukan pengobatan dengan menggunakan sel punca yang berasal dari darah tali pusat. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa sel punca lebih baik dibandingkan dengan silver sulfadiazine (SSD) dan krim ambifilik. Sel punca darah tali pusat dapat mempersingkat fase inflamasi, fase fibroplasia berjalan sesuai prediksi dan proses epitelisasi berlangsung pada daerah yang sulit serta epitel yang terbentuk lebih mendekati konfigurasi epitel normal (Moenadjat, 2009).



Gambar 2. 17 Peran stem sel monosit, hematopoietik stem sel dalam angiogenesis dan perbaikan jaringan (Zwanginga *et al.*, 2003).

2.6.3 Sel Punca Mesenkimal

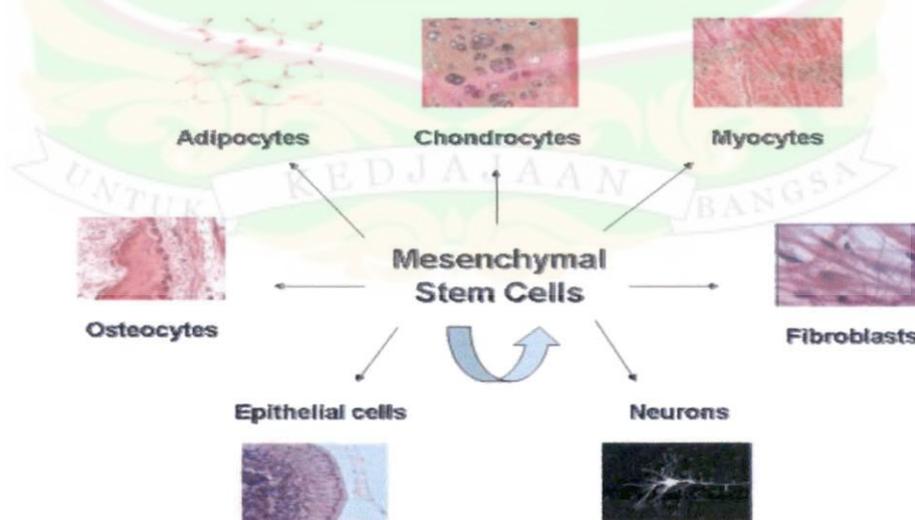
Sel punca mesenkimal (MSC) dikenal juga dengan *mesenchymal stromal cells* dan *connective tissue progenitor cells*. MSC merupakan sel punca yang bersifat multipotent progenitor sel nonhematopoitik. MSC berasal dari sumsum tulang, jaringan adiposa (Gronthos *et al.*, 2001), darah tali pusat (Igura *et al.*, 2004), cairan amnion (Tsai *et al.*, 2004), darah perifer (Zvaifler *et al.*, 2000), paru-paru (Anker *et al.*, 2003) dan pada hati janin. Jumlah MSC lebih banyak pada masa janin dan akan berkurang sesuai dengan pertambahan umur (Campagnoli *et al.*, 2003).

2.6.3.1 Biologi Sel Punca Mesenkimal

MSC telah diidentifikasi dan dapat dengan mudah diisolasi dari sejumlah besar jaringan dewasa. MSC dapat diekspansi dalam kultur dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan sesuai dengan stimulus yang cocok dan mempunyai fungsi untuk menggantikan dan meregenerasi sel lokal yang hilang karena kerusakan atau penuaan jaringan normal (Rantam *et al.*, 2009). MSC jumlahnya 0.001 – 0.01% dari populasi sel di sumsum tulang (Pittenger *et al.*, 1999). Menurut International Society of Cytotherapy syarat standar yang harus dipunyai oleh MSC yaitu:

- a. Sel tersebut harus mendukung plastisitas dalam kondisi kultur standar
- b. Sel harus mengekspresikan CD 105, CD 73 dan CD 90 dan kurang mengekspresikan CD45, CD 34 dan CD 14.
- c. Mampu berdiferensiasi menjadi osteoblast, adiposa dan khondroblast (Pittenger *et al.*, 1999).

MSC mempunyai kemampuan untuk berproliferasi secara ekstensif dalam suatu keadaan yang tidak terikat dan mempertahankan potensinya untuk berdiferensiasi menjadi kondrosit, osteoblast, adiposit, miosit, fibroblast, myofibroblast sel epitel, endotel dan sel neuron. Diferensiasi MSC dapat dilihat pada Gambar 2.18 (Pittenger *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2009). MSC juga mempunyai potensi yang kuat dalam regenerasi jaringan kulit (Semon *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007 cit Jeon *et al.*, 2010). MSC dapat diisolasi dari jaringan dewasa dan mampu berdiferensiasi diantaranya menjadi sel epitel dan endotel, mensekresi kemokin untuk memperbaiki jaringan yang rusak, merangsang proliferasi stem sel endogen dan mungkin akan mentransfer DNA mitokondria atau mitokondria sendiri. MSC mempunyai kelebihan karena mudah diisolasi dari pasien, dapat berkembang dengan cepat dan berperan dalam perbaikan jaringan dengan cara sel *homing* ditempat jaringan yang rusak serta memperbaiki jaringan tersebut (Wolfe *et al.*, 2008).



Gambar 2. 18 Kemampuan dari MSC untuk berdiferensiasi menjadi beberapa sel. (Liu *et al.*, 2009)

Kemampuan difrensiasi MSC menjadikan sel punca ini sebagai suatu jenis kandidat sel untuk upaya teknologi jaringan yang bertujuan untuk meregenerasi jaringan pengganti struktur yang rusak. MSC dapat memberikan suatu efek yang sangat baik pada perbaikan jaringan melalui modulasi lingkungan lokal dan aktivasi sel progenitor endogen. Keadaan ini menjadikan terapi sel MSC menjadi menarik bagi para peneliti dan MSC juga mempunyai potensi yang kuat dalam regenerasi jaringan kulit (Semon *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007 cit Jeon *et al.*, 2010).

MSC dapat diisolasi dari jaringan dewasa dan mampu berdifrensiasi menjadi berbagai jenis sel, mensekresi kemokin untuk memperbaiki jaringan yang rusak dan merangsang proliferasi sel punca endogen serta mungkin akan mentransfer DNA mitokondria atau mitokondria sendiri. MSC mempunyai kelebihan karena mudah diisolasi dari pasien, dapat berkembang dengan cepat dan berperan dalam perbaikan jaringan dengan cara homingnya sel di tempat jaringan yang rusak serta memperbaiki jaringan tersebut (Wolfe *et al.*, 2008), seperti pada infark miokard (Minguell and Ericas 2006) dan kerusakan spinal (Chernykh *et al.*, 2006). MSC juga mempunyai potensi yang kuat dalam regenerasi jaringan kulit (Semon *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007 cit Jeon *et al.*, 2010), namun penelitian pemberian MSC untuk luka kulit efektif atau tidak masih dalam tahap penelitian (Sasaki *et al.*, 2009).

Efek imunomodulator MSC dapat sebagai imunostimulan, immunosupresif dan bersifat sebagai hipoinmunogenik. Sebagai imunostimulan MSC berperan dalam hematopoesis untuk menghasilkan sel-sel yang berperan sebagai pertahanan

pertama terhadap masuknya benda asing. Sebagai imunosupresi MSC diketahui dapat menghambat proliferasi dan aktivasi sel T, sel B, NK dan sel dendritik. MSC juga diketahui dapat menghambat diferensiasi dan maturasi dari sel *antigen presenting cell* (APC) sehingga mempengaruhi sekresi sitokin proinflamasi dan meningkatkan produksi IL-10 yang bersifat supresif dan tolerogenik (Angoulvant *et al.*, 2004; Di Nicola *et al.*, 2002 and Krampera *et al.*, 2003).

Kemampuan hipoinmunogenik terlihat bahwa MSC tidak menimbulkan respon imun pada inang. Hal ini disebabkan karena MSC sedikit mengekspresikan molekul *major histocompatibility class I* (MHC I) dan tidak mengekspresikan molekul MHC kelas II. Peningkatan ekspresi molekul MHC kelas I dan menstimulasi ekspresi MHC kelas II oleh interferon-gamma (IFN- γ), oleh karena MSC tidak mengekspresikan costimulator CD 80 (B7-1) dan CD 86 (B7-2). MSC dapat digunakan karena menghambat aktivasi sel T alloreatif (Fibbe and Noort, 2003).

2.5.2.2 Peran Sel Punca Mesenkimal dalam Penyembuhan Luka

Pemberian MSC pada luka akan mempercepat penutupan luka, meningkatkan kualitas penyembuhan luka dan meningkatkan kekuatan luka.

Pada Fase Inflamasi

Sel punca mesenkimal (MSC) endogen dan eksogen berperan dalam tahap inflamasi dengan cara mempengaruhi diferensiasi sel progenitor hematopoetik dan prekursor sel mast. Sel progenitor hematopoetik mengalami proses mielopoiesis awal, sehingga terbentuk leukosit dalam jumlah tertentu yang

membantu dalam proses inflamasi. Namun masih belum jelas peran peningkatan sel progenitor ini pada fase inflamasi (Li *et al.*, 2008). Prekursor sel mast yang berasal dari sumsum tulang akan berada/*niche* di folikel rambut. Sel mast akan berproliferasi karena adanya *stem cell factor* (SCF) yang diproduksi lokal oleh sel folikel rambut dan menyebabkan prekursor sel mast ini dapat menjadi matur dan akan berperan dalam fase inflamasi penyembuhan luka (Peters *et al.*, 2003 cit Lau *et al.*, 2009).

Pada Fase Proliferasi

Pada fase proliferasi penggunaan sel punca endogen dan eksogen yang banyak diketahui adalah reepitelisasi dan angiogenesis. Pada reepitelisasi, keratinosit endogen berasal dari 2 populasi sel punca yaitu epitel kulit dan folikel rambut. Sel punca ini dapat memperbaiki diri atau beregenerasi dengan cara sel berproliferasi dan berdiferensiasi. Sebagai respon terhadap kerusakan sel, ke dua sel epitel ini menghasilkan keratinosit yang akan merekonstruksi *barier* epidermis (Taylor *et al.*, 2000 cit Lau *et al.*, 2009). Transdiferensiasi MSC menjadi keratinosit telah banyak dibuktikan (Medina *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005 and Wu *et al.*, 2007) dan keratinosit terbentuk dalam jumlah yang banyak. Hasil penelitian dengan cara injeksi MSC pada luka insisi didapatkan hasil yang mempercepat penutupan luka dengan kualitas penyembuhan yang baik, sehingga pemberian MSC sangat dibutuhkan dalam perbaikan luka kulit (Wu *et al.*, 2007).

Pada angiogenesis, MSC dapat meningkatkan densitas dari kapiler dan ini dihubungkan dengan pembentukan pembuluh darah baru. Pembentukan pembuluh darah baru dipengaruhi oleh kemampuan dari MSC untuk berdiferensiasi menjadi

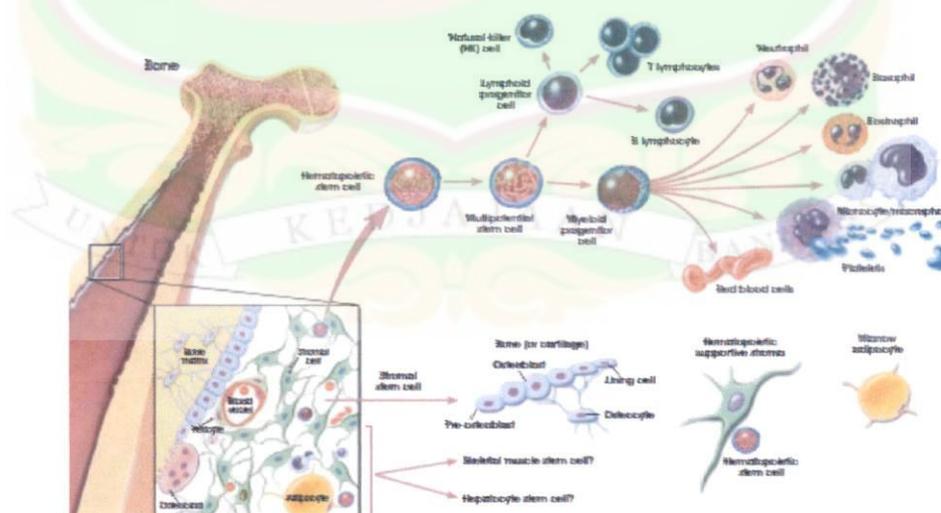
sel endotel, mengeluarkan faktor solubel diantaranya faktor angiogenik (Oswald *et al.*, 2004) dan pembentukan otot polos pembuluh yang berperan dalam menyatukan endotel dinding pembuluh (Al-Khaldi *et al.*, 2003). Penelitian Wu *et al.*, (2007), pemberian MSC pada tikus luka insisi terdapat peningkatan yang signifikan kadar faktor angiogenik -1 (Ang-1) dan VEGF. MSC juga dapat meningkatkan proliferasi sel endotel dan permeabilitas pembuluh darah (Salvolini *et al.*, 2010). Proliferasi sel endotel dan permeabilitas dari pembuluh darah akan dipengaruhi oleh VEGF. VEGF diketahui berperan penting dalam angiogenesis dengan menstimulasi proliferasi sel, migrasi sel dan pengorganisasian sel endotel untuk membentuk tubulus pembuluh (Ferrara, 2009) dan berperan dalam perbaikan serta regenerasi sel pada beberapa jaringan yaitu hepar, jantung, otak limpa dan paru-paru.

Penelitian pada fase reepitelisasi, diketahui bahwa BM-MSK dapat ditemukan pada bagian epidermis tikus percobaan, dan disini akan berdiferensiasi menjadi sel epitel. Disamping itu juga bisa terjadi fusi sel antara MSC dan sel epitel dengan cara meningkatkan epitelisasi melalui signal parakrin, namun, transdiferensiasi merupakan bersifat predomian dari MSC (Lau *et al.*, 2009).

Penelitian efek MSC pada tikus dengan luka bakar yang dalam dan luka insisi, ternyata stem sel ini mampu mengurangi infiltrasi sel inflamasi kedalam luka, mempercepat pembentukan pembuluh darah baru dan jaringan granulasi (Wu *et al.*, 2007 cit Fu *et al.*, 2008 dan Jeon *et al.*, 2010). Penelitian lain dari MSC yang ditanamkan dalam *scaffold* pada babi luka bakar partial dalam ternyata pada minggu ke empat terlihat kepadatan pembuluh darah yang signifikan

dibandingkan dengan yang diberi *scaffold* saja dimana MSC akan berdiferensiasi menjadi sel endotel dan mempercepat penyembuhan luka (Liu *et al.*, 2008).

Pengobatan dengan menggunakan sel punca di Amerika telah dilakukan pada pasien dengan menderita penyakit diantaranya kardiovaskular, diabetes dan akibat trauma luka bakar. Jumlah pasien luka bakar yang diobati dengan stem sel di Amerika adalah sekitar 300.000 pasien dan memberikan perbaikan (Vogelstein, *et al.*, 2006). Begitu juga pada pasien luka bakar dinegara Perancis akibat radiasi dengan menggunakan kombinasi MSC dan cangkok kulit ternyata dapat memperbaiki luka yang luas dan dalam, serta bekerja secara sinergis (Bey *et al.*, 2010). Penelitian kombinasi MSC juga dilakukan dengan menggunakan amnion pada kelinci dengan luka insisi derajat *full thickness*. Hasil yang didapatkan, kombinasi ini memberikan penyembuhan yang efektif terlihat terjadinya penebalan epidermis dan meningkatkan kualitas penyembuhan luka (Kim *et al.*, 2009).



Gambar 2. 19 Diferensiasi dari hematopoietik dan stromal stem cell (Wilson *et al.*, 2001).

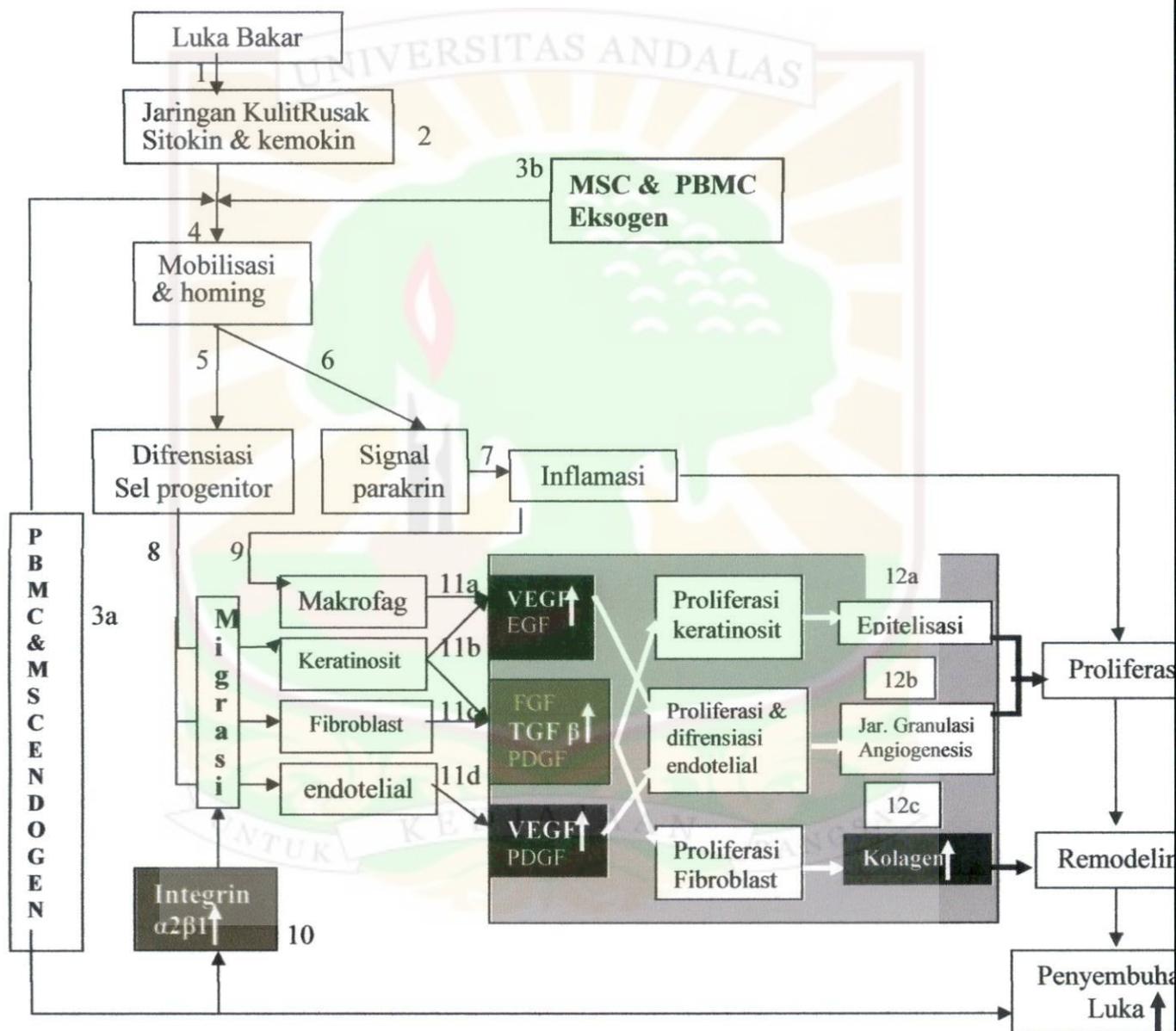
2.5.3 Interaksi Antara Integrin Dengan Sel Punca PBMC dan MSC

Interaksi antara integrin dengan sel punca PBMC dan MSC bertujuan membantu kerja sel punca. Untuk dapat sampai ke jaringan target sel punca PBMC terlebih dahulu mengalami beberapa langkah yaitu kemoatraktan, adhesi, migrasi dan berdiferensiasi menjadi sel endotel (Rasokat *et al.*, 2006). Untuk *homing* sel punca hematopoietik pada awalnya harus *rolling* sepanjang endotel. Peran ini dibantu oleh selektin untuk melekatnya sel punca dengan kuat pada sel endotel. Kemudian sel punca mengalami ekstravasasi, melekat pada ECM dibantu oleh integrin dan akhirnya sel punca mampu untuk *homing* pada sel spesifik (Srour *et al.*, 2001).

Homing MSC juga mengalami langkah yang sama namun ada penambahan molekul adhesi yaitu ICAM (Chamberlain *et al.*, 2007). MSC awalnya memberikan respon terhadap sinyal dari jaringan yang rusak, kemudian MSC melekat pada endotel, bertransmigrasi di endotelium, melekat pada matriks ekstraseluler (ECM), dan akhirnya *homing* ke dalam jaringan target. Untuk dapat bekerjanya MSC, diatur oleh berbagai jenis integrin yaitu dari unit α dan β . Hasil penelitian diketahui bahwa ekspresi integrin $\beta 1$, $\beta 2$, dan $\alpha 3$ pada MSC cukup tinggi yaitu di atas 80% sedangkan ekspresi integrin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, dan αV antara 20-55% (Semon *et al.*, 2010).

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan

Tulisan warna putih adalah yang akan diteliti

3.2 Keterangan Bagan Kerangka Konsep

Luka bakar akan menimbulkan kerusakan pada jaringan kulit (1) dan akibatnya jaringan akan mengeluarkan sitokin dan kemokin (2). Sitokin dan kemokin akan mempengaruhi stem sel endogen dan eksogen (3) dengan cara menarik stem sel tersebut ke jaringan rusak dan homing (4) di daerah tersebut. Stem sel endogen dan eksogen akan teraktivasi berdiferensiasi (5) dan mengeluarkan sinyal parakrin dan autokrin (6). Sinyal parakrin ini akan menarik sel-sel inflamasi diantaranya makrofag (7) ke jaringan yang rusak. Sinyal parakrin ini juga membantu sel untuk berdiferensiasi menjadi sel yang berperan dalam penyembuhan luka. Stem sel PBMC endogen dan eksogen akan berdiferensiasi menjadi sel endotel, keratinosit dan fibroblast. Stem sel MSC endogen dan eksogen akan berdiferensiasi menjadi sel endotel, keratinosit, neuron dan fibroblast (11). Sel-sel ini akan migrasi ke tempat luka dengan adanya molekul adhesi diantaranya integrin (10).

Stem sel endogen dan eksogen yang telah mengalami diferensiasi dan migrasi akan ada di tempat luka dan akan mempengaruhi lingkungan mikro sekitar luka karena sel-sel ini akan mengeluarkan sitokin serta faktor pertumbuhan yang akan mempengaruhi proses penyembuhan luka. Faktor pertumbuhan ini akan bersifat autokrin dan parakrin. Faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh sel endotel adalah FGF, VEGF dan PDGF, sel keratinosit menghasilkan FGF, TGF- β dan PDGF dan fibroblast menghasilkan EGF, FGF, TGF- β , VEGF dan PDGF, Sel makrofag sebagai sel inflamasi akan menghasilkan faktor pertumbuhan dan sitokin. Faktor pertumbuhan yang dihasilkan makrofag adalah EGF, TGF- β , VEGF dan PDGF sedangkan sitokin adalah IL-1, IL-6 dan TNF- α .

Faktor pertumbuhan TGF- β 1 akan berperan dalam penyembuhan mulai dari fase inflamasi sampai *remodelling*. Pada fase inflamasi TGF- β 1 akan membantu untuk maturasinya monosit, menghambat proliferasi sel-sel imun dan bersama dengan sitokin lainnya menjaga keseimbangan dan toleransi dari sistem imun. Pada fase proliferasi TGF- β 1 berperan dalam angiogenesis yaitu dalam migrasi sel endotel dan membantu dalam pembentukan tabung pembuluh. TGF- β 1 bersama dengan PDGF berperan dalam epitelisasi sehingga akan mempercepat penutupan luka, TGF- β 1 pada fase *remodelling* adalah menstimulasi proliferasi dari fibroblast dan meningkatkan sekresi kolagen sehingga mempercepat penyembuhan luka dan juga TGF- β berperan untuk meningkatkan ekspresi integrin sehingga meningkatkan interaksi antara sel dengan matriks.

Faktor pertumbuhan FGF dan VEGF akan mempengaruhi proliferasi dan difrensiasi dari sel endotel. Proliferasi dan difrensiasi sel ini berperan dalam angiogenesis dengan diawali migrasinya sel endotel dan terbentuk tabung pembuluh. Untuk migrasinya sel endotel diperlukan molekul adhesi integrin agar sel dapat berinteraksi dengan matriksekstraseluler. Peran VEGF dalam proliferasi sel endotel adalah dengan terjadinya pertumbuhan sel endotel dan mampu untuk menyeimbangkan antara proliferasi dan penuaan sel

3.3 HIPOTESIS PENELITIAN

1. Terdapat pengaruh pemberian injeksi PBMC dengan MSC dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan MSC terhadap kadar faktor pertumbuhan TGF- β 1 pada penyembuhan luka bakar tikus percobaan.
2. Terdapat pengaruh pemberian injeksi PBMC dengan MSC dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan MSC terhadap kadar faktor pertumbuhan VEGF pada penyembuhan luka bakar tikus percobaan
3. Terdapat pengaruh pemberian injeksi PBMC dengan MSC dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan MSC terhadap kepadatan ekspresi kolagen tipe 1 pada sel jaringan kulit penyembuhan luka bakar tikus percobaan.
4. Terdapat pengaruh pemberian injeksi PBMC dengan MSC dan pemberian kombinasi injeksi PBMC dengan MSC terhadap persentase ekspresi molekul adhesi integrin α 2 β 1 pada sel jaringan kulit penyembuhan luka bakar tikus percobaan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *the post test only control group design*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di:

1. Laboratorium Mikroskop Elektron dan laboratorium Medis Terpadu FK Unair Surabaya untuk pembuatan dan pembacaan hasil dari preparat imunohistokimia kolagen dan integrin
2. Laboratorium ITD C FK Unair Surabaya untuk persiapan hewan coba, isolasi stem sel MSC, PBMC dan pelaksanaan penelitian dan pemeriksaan kadar faktor pertumbuhan (TGF- β dan VEGF)

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi adalah tikus jantan yang ada Laboratorium ITD C FK Unair Surabaya. Sampel adalah bagian populasi yang memenuhi syarat eksklusif dan inklusif. Kriteria inklusif adalah:

- Jantan
- Berat 140 – 180 gr

- Umur 2 bulan

Kriteria eksklusif adalah:

- Sakit
- Tidak aktif

Besar sampel ditentukan dengan rumus Fraenkle and Wallen:

$$(np-1) - (p-1) \geq p^2$$

p = jumlah kelompok hewan percobaan

n = jumlah hewan coba dalam tiap kelompok

Berdasarkan rumus di atas didapatkan jumlah hewan coba setiap kelompok adalah 5 ekor, dengan mempertimbangkan jumlah sampel yang droup out dari tiap kelompok 10 - 20% maka tiap kelompok terdiri 7 ekor tikus putih, sehingga jumlah sampel 28 ekor.

Hewan dipelihara untuk akltimasi dilaboratorium ITD Stem sel Unair.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan adalah:

1. Variabel independen

Stem sel PBMCs, stem sel mesenkimal (MSC) dan kombinasi stem sel PBMC dan stem sel mesenchymal (MSC)

2. Variabel terkendali

- Dosis
- Cara pemberian
- Luka bakar *fullthickness*

3. Variabel perantara

- *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)
- *transforming growth factor- β* (TGF- β)
- Molekul adhesi Integrin $\alpha 2\beta 1$
- Penyembuhan luka

4. Variabel dependen

- Kolagen

4.5 Definisi Operasional

1. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan glikoprotein yang berperan penting dalam vasculogenesis selama embriogenesis dan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis).

Cara ukur : Elisa kit

Alat ukur : Elisa indirect

Hasil ukur : pikogram/ml

Skala ukur : Rasio

2. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) merupakan faktor pertumbuhan yang mempunyai struktur protein dimer yang dihasilkan oleh hampir semua sel terutama platelet, fibroblast, keratinosit dan makrofag.

Cara ukur : Elisa kit

Alat ukur : Elisa indirect

Hasil ukur : pikogram/ml

Skala ukur : Rasio

3. Kolagen tipe I merupakan protein yang dihasilkan oleh sel fibroblas dan merupakan salah satu dari matrikekstraselular.

Cara ukur : Pemeriksaan imunohistokimia

Alat ukur : Computerized light mikroskop dengan pembesaran 400 kali

Hasil ukur : mikrometer

Skala ukur : Rasio

4. Molekul adhesi integrin $\alpha\beta 1$ merupakan suatu protein permukaan sel yang terlibat dalam pengikatan antar sel, sel dengan endotel atau matriks ekstraseluler.

Cara ukur : Pemeriksaan imunohistokimia

Alat ukur : Computerized light mikroskop dengan pembesaran 400 kali

Hasil ukur : persentase

Skala ukur : Rasio

5. Luka bakar *fullthickness* adalah luka yang dibuat pada bagian dorsal tikus dengan menggunakan plat aluminium diameter 1.5 cm yang sudah dipanaskan pada air mendidih selama 20 menit sehingga menghasilkan luka bakar *fullthickness*

Alat ukur : Plat yang sudah dipanaskan

Hasil ukur : Luka dalam

Skala ukur : Nominal

6. *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) merupakan stem sel yang berasal dari darah perifer tikus dan merupakan sel yang telah matur terdiri dari sel hematopoetik yang terdiri dari sel monosit, fibrosit dan EPC. PBMC dipisahkan

dengan menggunakan ficol histopaque dan sel yang digunakan sebanyak 2×10^6 sel/ml yang dihitung dengan menggunakan hematositometer.

Alat ukur : hematositometer

Hasil ukur : sel/ml

Skala ukur : Rasio

7. Bone marrow-Mesenchymal stem cell (BM-MSC) merupakan stem csel yang berasal stroma bone marrow tikus yang ditentukan berdasarkan bukti karakterisasi adanya sel yang melekat pada cawan petri dan dengan pemeriksaan imunohistokimia.

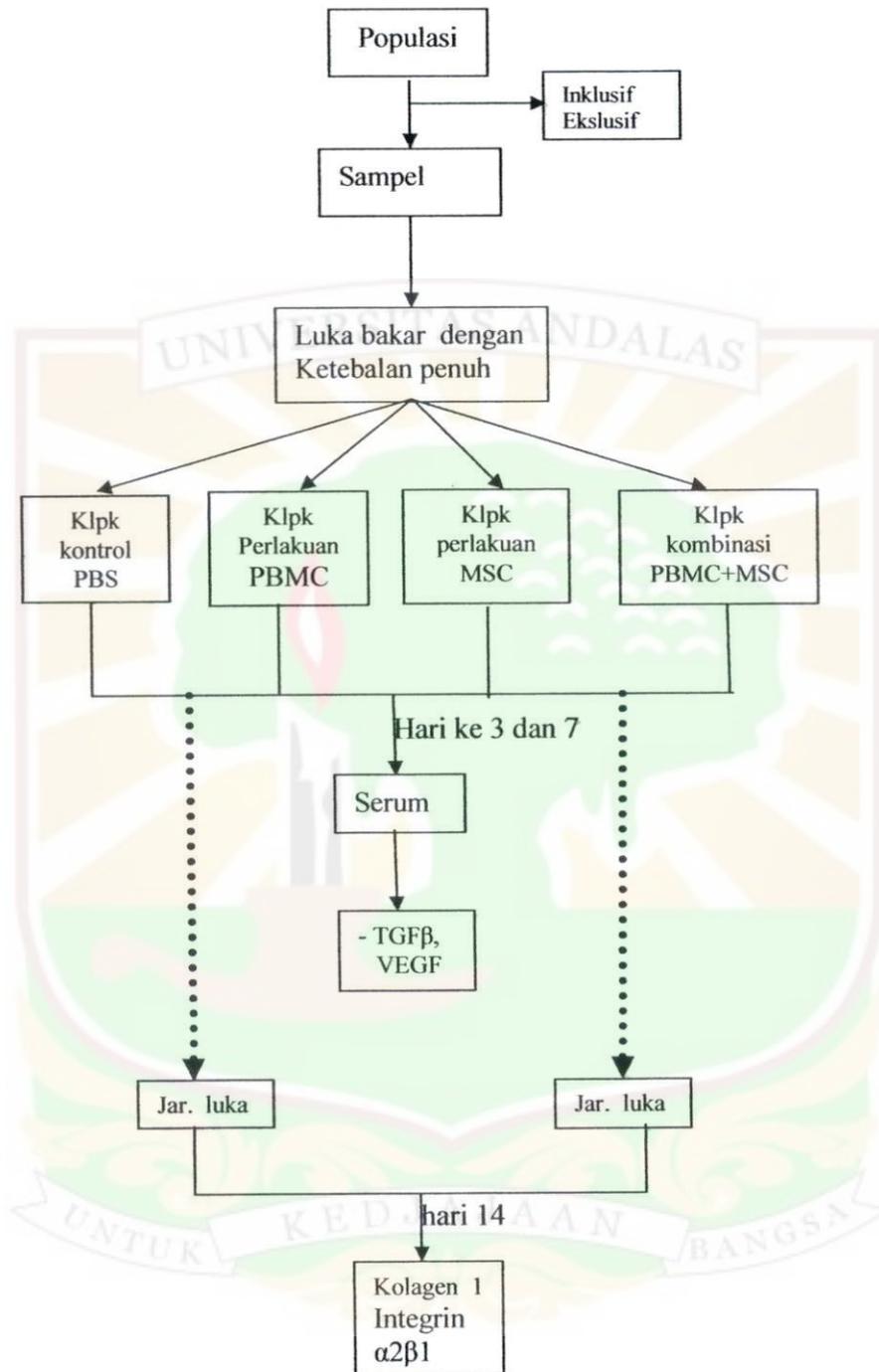
Alat ukur : hematositometer

Hasil ukur : sel/ml

Skala ukur : Rasio



4.6 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Skema kerangka operasional penelitian

4.7 Bahan dan Alat Yang Digunakan

1. Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi Stem sel, Elisa dan

Imunohistokimia

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| - Alkohol 70% | - Etanol 70%, 80%, 95% dan absolut |
| - Aquadest steril | - Xylol |
| - trypan blue | - Parafin |
| - EDTA atau heparin | - Aquabidest |
| - Ficoll histopaque gradient 0.177 | - H ₂ O ₂ 3% |
| - Anestesi (Ketamine dan Xylazine) | - Kit VEGF |
| - Sopran | - Kit TGF- β 1 |
| - Buffer formalin | - Kit Kolagen 1 |
| - Betadin | - Kit Integrin α 2 β 1 |
| - PBS | |

2. Alat Yang diperlukan

- Inkubator CO₂
- Laminar flow
- Sentrifuse refrigator
- Pipet otomatis
- Gelas pipet 5ml, 10 ml dan 20 ml
- Pipet eppendorf 0 – 200 μ l dan 1000 μ l
- Mikroskop inverted
- Tegaderm Film

- Elastomult haft
- Botol koleksi sampel
- Kertas saring

4.8 Cara Pelaksanaan Penelitian

4.8.1 Isolasi Sel mononuclear PBMC Tikus

Untuk isolasi dari sel mononuklear dari PBMC tikus, semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam kondisi steril. Untuk mengambil darah lewat ekor terlebih dahulu tikus dianestesi dengan menggunakan xylazine dan ketamin perbandingan 1:1. Aspirat darah tikus diambil melalui ekor sebanyak 3.5 ml dengan menggunakan jarum suntik yang sudah diberi heparin sebagai antikoagulan (gambar 1 lampiran). Darah yang didapatkan digunakan untuk isolasi dari sel mononuklear.

Cara Isolasi PBMC adalah sebagai berikut:

1. Disiapkan PBS steril untuk penambah sampel
2. Tiga koma lima ml darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifus ukuran 15 ml kemudian ditambahkan 3.5 ml PBS dan campuran ini dimasukkan ke tabung sentrifus lain yang sudah berisi 3.5 ml *ficol isopaque density 0.177* secara pelan-pelan sehingga darah tidak tercampur dengan ficol (gambar 2 lampiran).
3. Campuran di atas disentrifus selama 30 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Diambil pelan-pelan tabung dari rotator sentrifugasi dan hasil sentrifus akan

didapatkan beberapa tingkatan dan PBMC ditemukan berada dibawah PBS (lihat gambar 3 lampiran).

4. Pipet disiapkan dan diambil pelan-pelan PBMC dengan menekan pipet terlebih dahulu kemudian dimasukan kedalam tabung sentrifus dan lepas pelan-pelan pipet sehingga didapatkan mononuklear murni. Kemudian ditambahkan PBS steril sebanyak 5 ml untuk mencuci sel. Setelah itu disentrifus selama 5 menit kecepatan 1600 rpm selanjutnya supernatan dibuang. Resuspensi ini dilakukan dengan hati-hati agar membran sel tidak rusak. Pencucian ini dilakukan dua kali dan didapatkan pelet (gambar 4 lampiran).
5. Pelet yang didapatkan ditambahkan PBS kemudian dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan hematositometer dan jumlah PBMC yang didapatkan dari sampel adalah 3×10^7 .
6. PBMC yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2×10^6 sel/ml

4.8.1.1 Perhitungan Jumlah Sel

1. Disiapkan 1 tabung eppendorf steril, isi dengan 10 μ l trypan blue, lalu ditambahkan 10 μ l suspensi sel yang telah diencerkan, resuspensi dan diamkan 3 menit.
2. Suspensi sel yang telah dicampur trypan blue dipipet 10 μ l masukan ke dalam kaca hemasitometer.
3. Dihitung viabilitas sel dan jumlah sel di mikroskop (gambar 5 lampiran).
4. PBMC yang digunakan untuk 1 ekor tikus dalam penelitian ini adalah 2×10^6 sel/ml

4.8.2 Isolasi Mesenkimal stem sel (MSC)

MSC yang digunakan pada penelitian ini adalah MSC yang sudah ada dilaboratorium ITD C FK Unair Surabaya. Sebelum digunakan MSC dalam tabung petridish yang monolayer akan dipisahkan untuk dihitung jumlah sel yang akan digunakan dalam penelitian. Penggunaan MSC sama dengan PBMC digunakan untuk 1 ekor tikus dalam penelitian ini adalah 2×10^6 sel/ml

4.8.3 Pelabelan MSC dan PBMC dengan PKH

4.8.3.1 Cara Pelabelan MSC dengan PKH2

1. MSC yang dalam kondisi monolayer ditripsinasi untuk menjadi single sel dengan cara sentrifugasi selama 5 menit pada 2100 rpm dan supernatannya dibuang
2. Pelet yang didapatkan berada pada dasar tabung ditambahkan dengan diluent A dan PKH2 kemudian diinkubasi selama 2 - 5 menit (kalau lebih akan menyebabkan toksik pada sel) dan distop dengan BSA 1%.
3. Kemudian dilakukan inkubasi lagi selama 1 menit dan BSA dicuci dengan medium kompleks dan distop dengan cara disentrifus selama 10 menit 2100 rpm. Pencucian ini dilakukan 3 kali.
4. Hasil sentrifus dicuci dengan medium (α MEM) tanpa serum dan medium yang digunakan dibuang dan sel yang sudah ada label siap untuk dipakai

4.8.3.2 Cara Pelabelan PBMC dengan PKH2

Cara pelabelan PBMC hampir sama dengan MSC. Perbedaannya terletak pada awal atau pada langkah no 1 kalau MSC yang monolayer dipisahkan dengan

tripsinasi sedangkan pada PBMC hasil isolat berupa *buffy coat* dihitung kemudian dilanjutkan dengan langkah 2 sampai 4.

Pelabelan MSC dengan PKH *green fluorescence* dipergunakan untuk mendeteksi *homing* MSC yang disuntikan disekitar luka bakar. PKH *green fluorescence* merupakan label berfluoresen, yang akan melekat pada membran sel MSC, sehingga MSC berwarna kehijauan bila dilihat dibawah mikroskop fluoresen. MSC hasil kultur sebelum diberi label PKH harus dibuat sel tunggal, kemudian baru diberi label PKH sebelum disuntikan di bagian luka bakar. Pemberian label PKH tidak boleh berlebihan

4.9 Persiapan hewan coba (tikus) untuk luka bakar

Tikus dibagi atas 4 kelompok yaitu kontrol, kelompok perlakuan yang terdiri atas pemberian stem sel PBMC, MSC dan gabungan PBMC + MSC. Kelompok kontrol diberi PBS sesuai dengan pelarut sel dan kelompok perlakuan diberi stem sel. Pemberian PBS dan stem sel dilakukan secara injeksi.

Pembuatan Luka Bakar pada Tikus (metode Paramonov dan Cheboterev cit Shuid *et al.*, 2008).

1. Tikus ditimbang berat untuk menyesuaikan pemberian anestesi dan analgesik.
2. Disiapkan tempat kerja yang sudah dibersihkan dengan desinfektan (gambar 6 lampiran)
3. Tikus di anestesi dengan menggunakan xylazin dan ketamin dengan perbandingan 1 : 1.

4. Tikus yang sudah tidur dicukur bulu bagian punggung yang sebelumnya sudah diusapkan sapron suatu desinfektan (gambar 7 lampiran).
5. Tikus yang punggungnya sudah dicukur diolesi betadin, kemudian dioleskan lagi dengan PBS (gambar 8 lampiran) setelah itu baru dicap dengan plat dengan diameter 15 mm yang sudah dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit dan dicapkan pada punggung tikus selama 20 detik (gambar 9 lampiran) . Luka bakar yang dihasilkan adalah luka bakar ketebalan penuh (gambar 10 lampiran).
6. Setelah di cap, dilakukan injeksi sesuai perlakuan (PBS, PBMC, MSC dan Kombinasi PBMC dan MSC perbandingan 1 : 1 gambar 11 lampiran) dan bagian yang luka diberi tanda dengan spidol (gambar 12 lampiran), kemudian ditutup dengan tegaderm film (gambar 13 lampiran) selanjutnya diberi kasa elastomult haft (gambar 14 lampiran).
7. Terakhir diberikan analgesik yaitu antalgin injeksi dengan dosis 500 mg/kg BB.
8. Pada hari ke 3 dan 7 diambil darah melewati pembuluh di mata untuk mengukur kadar faktor pertumbuhan TGF- β dan VEGF dengan metode Elisa indirek.
9. Pada hari ke 14 diambil jaringan kulit luka bakar untuk melihat ekspresi dari kolagen dan integrin $\alpha 2\beta 1$ dengan metode imunohistokimia. Kemudian tikus dikorban dengan cara pemberian kloroform. Setelah tikus mati maka bulu disekitar luka dibersihkan dan diukur luas perbaikan luka.

10. Luas perbaikan luka diukur dari dua sisi kemudian baru diambil jaringan luka sesuai dengan bentuk luka dan selanjutnya jaringan dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi buffer formalin.
11. Sampel yang sudah didapatkan dikoleksi dan pekerjaan pembuatan jaringan histologisnya akan dilakukan di laboratorium Biomedik FK Unair (gambar 15 lampiran).

4.10 Pemeriksaan faktor pertumbuhan TGF- β dan VEGF dengan metode Elisa Indirect

1. Darah yang sudah diambil disentrifus untuk mendapatkan serumnya. Serum dapat di gunakan langsung atau disimpan dalam freezer - 20⁰C sebelum dilakukan pengukuran kadar faktor pertumbuhan.
2. Disiapkan bahan-bahan dan alat yang digunakan dalam kondisi ruang dan siapkan bahan untuk standar sesuai dengan konsentrasi standar yang diinginkan
3. Diambil plat well dan dimasukkan 50 μ l assay diluent kesemua well (blanko, standart, dan sampel)
4. Kemudian masukan 50 μ l larutan standart, kontrol dan sampel sesuai dengan sampel plat wellnya.
5. Plat Well diletakkan di atas sekher digerakkan dengan kecepatan 50 rpm selama 3 – 5 menit agar sampel dan antibodi yang ada pada well tercampur dengan baik
6. Setelah di sekher plat well ditutup dengan plastik adhesive, kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam.
7. Setelah diinkubasi maka larutan yang ada pada well disedot dengan menggunakan pipet multichannel (8 channel)

8. Selanjutnya plat well dicuci dengan memasukan washing buffer 300 μ l/well kemudian dilakukan sakher selama 2 menit dengan kecepatan 50 – 100 rpm. Larutan yang ada pada plat well disedot dengan menggunakan pipet multichannel. Waktu menyedot washing buffer harus hati-hati agar tidak terjadi kerusakan pada dasar plat well yang berisi reaksi antigen antibodi. Kegiatan ini dilakukan sampai 4 kali. Pada pencucian ke 4 plat well dibalikkan yang sudah dialas dengan tisu dan diketok-ketok perlahan sehingga cairan washing sudah terbuang seluruhnya.
9. Ditambahkan 100 μ l enzim conjugate kesemua well kecuali blanko (diisi dengan washing buffer 100 μ l), kemudian ditutup dengan plastik adhesive film seterusnya diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang.
10. Setelah diinkubasi cairan conjugate yang tidak bereaksi dengan antigen antibodi yang ada pada dasar well dibuang dengan menggunakan pipet multichannel. Dilakukan pencucian seperti pada point 8.
11. Ditambahkan 100 μ l substrat solution (yang terbuat dari color reagen A dan B yang dicampurkan sesaat melakukan tahapan ini) kemasing-masing well , inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Penambahan substrat solution akan menimbulkan warna biru langit.
12. Ditambahkan stop solution sebanyak 100 μ l kemasing-masing well dan terjadi perubahan warna dari biru kekuning.
13. Dimasukan plat well ke alat Elisa microplate reader kemudian disetting pada panjang gelombang 450 nm
14. Hasil pengukuran tersebut keluar dalam bentuk absorban dan konsentrasi dan hasil ukuran yang digunakan adalah konsentrasi.

4.11 Cara Pewarnaan Imunohistokimia Kolagen dan Molekul Adhesi

1. Jaringan kulit luka bakar dibuat preparat histologis kemudian dipotong dengan ketebalan 5 μ dan ditempelkan pada objekglas yang telah *dicoating*
2. Preparat yang siap dipulas dimasukkan ke dalam inkubator semalam suhu 38°C
3. Dilakukan deparafinisasi dengan cara mencelupkan dalam cairan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit
4. Rehidrasi dengan cara mencelupkan secara berurutan dalam etanol absolut sebanyak 3 kali masing-masing selama 2 menit, dan etanol 70% 2 kali masing-masing selama 2 menit kemudian bilas dengan aquadest sebanyak 3 kali dan bersihkan pinggir slide dengan tissue.
5. Kemudian dimasukkan ke dalam H₂O₂ 3% dalam metanol selama 5 menit. Kemudian dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali
6. Dibilas dengan dengan PBS sebanyak 3 kali, kemudian dibersihkan pinggir slide dengan tissue
7. Slide yang sudah dibersihkan dimasukkan ke dalam anti Integrin α 2 β 1 atau kolagen 1 (mouse anti rat 1:50) selama 30 menit dalam suhu ruangan
8. Dibilas dengan PBS 3 kali masing-masing 2 menit dan dikeringkan air sekitar potongan jaringan
9. Disekeliling potongan jaringan yang ingin dipulas ditandai dengan Pap pen
10. Slide dimasukan ke dalam antibodi sekunder (Rat anti mouse biotinilated antibody label) selama 30 menit.

11. Dibilas dengan larutan PBS 3 kali masing-masing selama 2 menit
12. Masukkan ke dalam sterptavidin HRP label selama 30 menit
13. Dibilas dalam larutan PBS 3 kali, masing-masing selama 2 menit dan bersihkan dari sisa cairan pencuci
14. Slide dimasukkan ke dalam substrat kromogen selama 3 - 10 menit, dan bilas dengan larutan PBS 3 kali, masing-masing selama 2 menit kemudian dibilas dengan aquadestilata
15. Slide dimasukkan ke dalam hematoksilin Mayer selama 6 - 15 menit kemudian bilas dengan air mengalir
16. Dilakukan *mounting*

4.12 Cara Pengamatan Ekspresi Kolagen dan Molekul Adhesi Integrin.

Untuk mengamati ekspresi kolagen dan molekul adhesi (integrin) maka jaringan kulit luka bakar dibuat sayatan histopatologisnya kemudian diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia. Dengan menggunakan mikroskop cahaya dapat diamati ekspresi kolagen dan integrin secara kuantitatif. Penilaian dilakukan dengan cara membandingkan jumlah ekspresi kolagen dan integrin pada sel yang terwarnai positif yang kuat dibandingkan dengan semua sel pada setiap kelompok.

4.13 Pemantapan Mutu

Penelitian selalu melakukan pemantapan mutu pada semua tahapan guna menjamin ketelitian dan ketepatan hasil pemeriksaan laboratorium. Cakupan objek pemantapan mutu meliputi aktivitas tahap pra-analitik, tahap analitik dan

tahap pasca analitik. Pemantapan mutu bertujuan untuk memastikan bahwa segala sesuatu sudah dilakukan dengan benar sehingga kevalidan data yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan secara akademis. Sasaran yang menjadi objek kegiatan pemantapan mutu adalah (Yamin, 1999):

1. Proses persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba. Persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan dengan pengontrolan terhadap suhu dan kelembaban, sehingga dapat dipastikan hewan coba mendapat lingkungan yang menyenangkan. Makanan dan minuman diberikan sesuai kebutuhan. Dengan demikian dapat dipastikan bahwa semua populasi mendapatkan perlakuan yang sama.
2. Proses pengambilan, pengiriman, penyimpanan dan pengolahan spesimen. Pengambilan spesimen dilakukan oleh tenaga yang sudah terlatih sehingga dampak terjadinya kerusakan spesimen saat pengambilan dapat dihindarkan atau dikurangi. Proses pengiriman, penyimpanan dan pengolahan spesimen dilakukan sesuai dengan prosedur standar.
3. Pengujian terhadap kualitas reagen. Reagen yang diterima dilakukan pengecekan terhadap keutuhan segel dan wadah, no bath dan tanggal kadaluarsa.
4. Uji ketelitian dan ketepatan. Khusus untuk setiap alat yang akan digunakan pada pemeriksaan variabel penelitian dilakukan *quality control* sistem dengan menentukan harga *coefficient of variation* (COV). Setelah harga COV diperoleh dari masing-masing senyawa lebih kecil dari 5% baru dilakukan pemeriksaan terhadap sampel. Tenaga yang melakukan

pemeriksaan laboratorium adalah tenaga teknis labor yang sudah terlatih melakukan pemeriksaan, diharap untuk satu jenis pemeriksaan dilakukan oleh satu orang tenaga labor (Mangino, 1977).

5. Sistem pencatatan dan pelaporan dilakukan dengan benar dan terdokumentasi. Peralatan laboratorium perlu dilakukan kalibrasi. Semua proses pemantapan mutu (*quality assurance*) pada penelitian ini telah mengacu kepada protap yang dikeluarkan oleh Pusat Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
6. Penghitungan ekspresi kolagen tipe I dan integrin $\alpha 2\beta 1$ dilakukan dibawah bimbingan ahli Patologi Anatomi

4.14 Etika Penelitian

Penelitian ini sudah dilakukan etika clearance dan sudah mendapat persetujuan untuk dilaksanakan dengan No. 141/KEP/FK/2012.

4.15 Analisa Data

Untuk menganalisis pengaruh stem sel PBMCs, MSC dan kombinasi PBMCs dan MSC terhadap kadar faktor pertumbuhan TGF- β , VEGF, ekspresi kepadatan kolagen dan presentase molekul adhesi integrin $\alpha 2\beta 1$ dilakukan analisis one way anova dengan uji lanjut Tukey.

BAB V

HASIL PENELITIAN

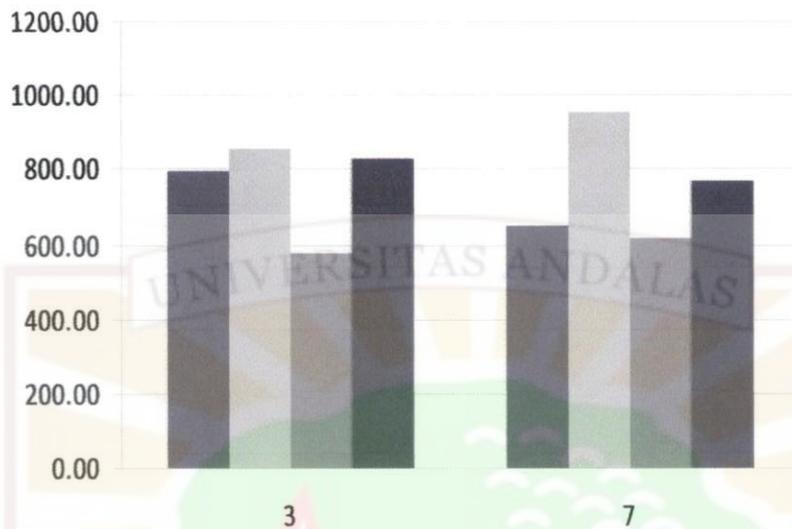
Penelitian ini *didesign* untuk menjelaskan dan membuktikan pengaruh sel punca dengan tiga macam perlakuan yaitu perlakuan sel punca PBMC (P I), MSC (P II) dan kombinasi antara PI dan PII (P III) terhadap luka bakar *full thickness* pada tikus. Dari masing-masing perlakuan dihitung rata-rata sekresi kadar faktor pertumbuhan TGF- β 1, VEGF dan ekspresi ketebalan kolagen serta persentase ekspresi integrin sel luka bakar *full thickness*. Perhitungan kadar sekresi tersebut ditentukan dengan menggunakan teknik ELISA indirek. Hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan uji statistik *one way anova*.

5.1 Pengaruh Pemberian PBMC, BM- MSC dan Kombinasi PBMC dengan BM- MSC Terhadap Sekresi Kadar TGF- β 1 Pada Serum Tikus

Sekresi kadar faktor pertumbuhan TGF- β 1 pada serum luka bakar *full thickness* tikus, dihitung pada hari ke 3 dan ke 7. Rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 dari masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 5.1 dan gambar 5.1.

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar Sekresi Faktor Pertumbuhan TGF- β 1 Serum pada Luka Bakar *full thickness* Tikus di Hari ke 3 dan ke 7

Kelompok	Rata-rata Kadar TGF- β 1 (pg/ml) hari ke			
	3	P	7	P
K	797.267 \pm 103.389	0.003	669.850 \pm 67.327	0.008
P I	821.100 \pm 123.692		956.100 \pm 87.302	
P II	553.350 \pm 63.725		696.100 \pm 102. 728	
P III	826.100 \pm 55.859		777.850 \pm 64.239	



Gambar 5.1 Grafik rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 3 dan 7

Berdasarkan Tabel 5.1 dan gambar 5.1 dapat dilihat bahwa pada hari ke 3, rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 kelompok P I dan PIII lebih tinggi dari kelompok kontrol. Rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 pada kelompok kontrol adalah 797,267 pg/ml, PI 821,100 pg/ml, PII 553,350 pg/ml dan PIII 826,100 pg/ml. Dari uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,003 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap kadar TGF- β 1. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Pada hari ke 7 rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan TGF- β 1 kelompok kontrol adalah 669,850 pg/ml, PI 956,100 pg/ml, PII 696,100 pg/ml dan PIII 777,850 pg/ml. Dari uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,008 ($p < 0,05$)

yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap kadar TGF- β 1. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Tabel 5.2 Hasil analisis kebermaknaan rata-rata kadar sekresi TGF- β 1 pada masing-masing kelompok perlakuan menurut *Tukey*

Kelompok	Hari ke 3				Hari ke 7			
	K	PI	PII	PIII	K	PI	PII	PIII
K	-	ns	s	ns	-	s	ns	ns
PI			s	ns			s	ns
PII				s				ns
PIII								

ns = Non signifikan ($p > 0.05$); s = Signifikan ($p < 0.05$)

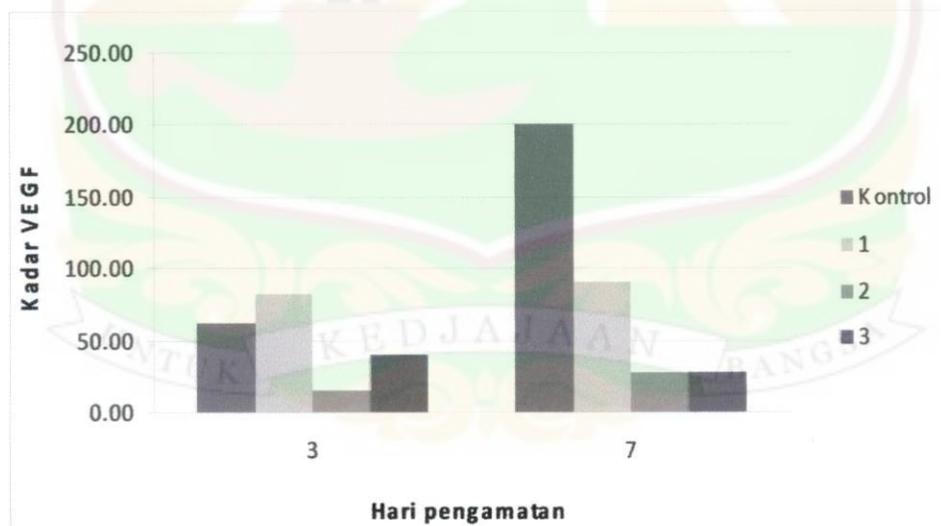
Pada tabel 5.2 hasil analisis lanjut dengan *Tukey* diketahui pada hari ke 3 terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok PI dan kelompok P III tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Tetapi antara kelompok PI dengan PII dan kelompok PII dengan PIII terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Pada hari ke 7 terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok PI terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan antara kelompok kontrol dengan PII dan PIII tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Tetapi antara kelompok PI dengan PII terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dan antara kelompok PI dengan PII serta kelompok PII dengan PIII tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

5.2 Pengaruh Pemberian PBMC, BM-MSc dan Kombinasi PBMC dengan BM-MSc Terhadap Sekresi Kadar TGF- β 1 Pada Serum Tikus

Sekresi kadar faktor pertumbuhan VEGF pada serum luka bakar *full thickness* tikus, dihitung pada hari ke 3 dan ke 7. Rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF dari masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 5.3 berikut dan gambar 5.2.

Tabel 5.3 Rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF serum luka bakar *Full Thickness* tikus pada hari ke 3 dan 7

Kelompok	Kadar Rata-rata VEGF (pg/ml) hari ke			
	3	P	7	P
K	61.667 ± 39.751	0.005	200.042 ± 19.812	0.025
P I	82.542 ± 24.246		90.583 ± 47.385	
P II	12.875 ± 10.861		23.917 ± 11.988	
P III	37.042 ± 37.309		22.250 ± 30.933	



Gambar 5.2 Grafik rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 3 dan 7

Berdasarkan Tabel 5.1 dan gambar 5.1 dapat dilihat bahwa pada hari ke 3, rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF kelompok P I dan PIII lebih tinggi dari kelompok kontrol. Rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF pada kelompok kontrol adalah 61,667 pg/ml, PI 82,542 pg/ml, PII 12,875 pg/ml dan PIII 37,042 pg/ml. Dari uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,005 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap kadar VEGF. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Pada hari ke 7 rata-rata kadar sekresi faktor pertumbuhan VEGF kelompok kontrol adalah 200,042 pg/ml, PI 90,583 pg/ml, PII 23,917 pg/ml dan PIII 22,250 pg/ml. Dari uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,025 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap kadar TGF- β 1. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Tabel 5.4 Hasil Analisis Kebermaknaan Rata-rata Kadar VEGF pada Masing-masing Kelompok Perlakuan menurut LSD

Kelompok	Hari ke 3				Hari ke 7			
	K	PI	PII	PIII	K	PI	PII	PIII
K	-	ns	s	ns	-	ns	s	s
PI		-	s	s		-	ns	ns
PII			-	ns			-	ns
PIII				-				-

ns = Non signifikan ($p > 0,05$); s = Signifikan ($p < 0,05$)

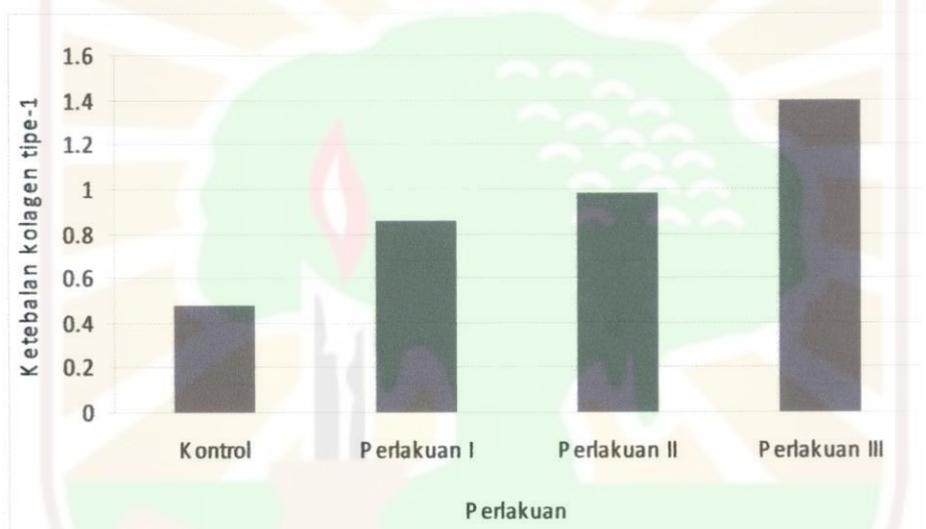
Pada tabel 5.4 hasil analisis lanjut dengan *Tukey* diketahui pada hari ke 3 terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok PI dan kelompok P III tidak terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan kelompok kontrol dengan PII terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Tetapi antara kelompok PI dengan PII dan PIII terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), sedangkan kelompok PII dengan P III tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Pada hari ke 7 terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok PI tidak terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan antara kelompok kontrol dengan PII dan PIII terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Tetapi antara kelompok PI dengan PII dan kelompok PII dengan PIII tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

5.3 Pengaruh Pemberian PBMC, BM-MSK dan Kombinasi PBMC dengan BM-MSK Terhadap Ketebalan Kolagen Tipe I (μ) pada Jaringan Kulit Tikus Luka Bakar pada Hari Ke 14

Pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi kolagen dilakukan pada hari ke 14, dengan cara menghitung ketebalan dari kolagen tipe 1 yang memberikan reaksi positif terhadap anti kolagen 1 pada jaringan kulit luka bakar tikus. Setiap kelompok masing-masing jaringan kulit luka bakar tikus diamati dan diukur ketebalan kolagen dengan menggunakan mikroskop yang langsung dihubungkan dengan layar komputer. Hasil pengukuran rata ketebalan kolagen tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.5 dan gambar 5.3.

Tabel 5.5 Rata-rata ketebalan kolagen tipe I (μ) pada jaringan kulit luka bakar setelah diberi perlakuan PI, PII, dan PIII pada hari ke 14

Kelompok	Rata-rata Ketebalan Kolagen Tipe I (μ)	P
K	0.475 ± 0.517	0.000
P I	0.860 ± 0.100	
P II	0.977 ± 0.120	
P III	1.395 ± 0.299	



Gambar 5.3 Grafik rata-rata kadar ekspresi kolagen tipe I pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 14

Pada Tabel 5.5 dan gambar 5.3 grafik dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan rata-rata ketebalan kolagen tipe I pada jaringan kulit luka bakar tikus setelah diberi sel punca. Rata-rata ketebalan kolagen kelompok kontrol adalah $0,475 \mu$, P I $0,860 \mu$, P II $0,977 \mu$ dan P III 1.395μ . Dari uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh pemberian sel punca terhadap ketebalan kolagen. Untuk melihat signifikansi antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Pada tabel 5.6 hasil analisis lanjut dengan *Tukey* diketahui pada hari ke 3 terlihat bahwa antara kelompok kontrol dengan kelompok PI, PII dan kelompok P III terdapat perbedaan yang bermakna. Tetapi antara kelompok PI dengan PII tidak terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan kelompok PI dengan PIII dan kelompok PII dengan P III terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

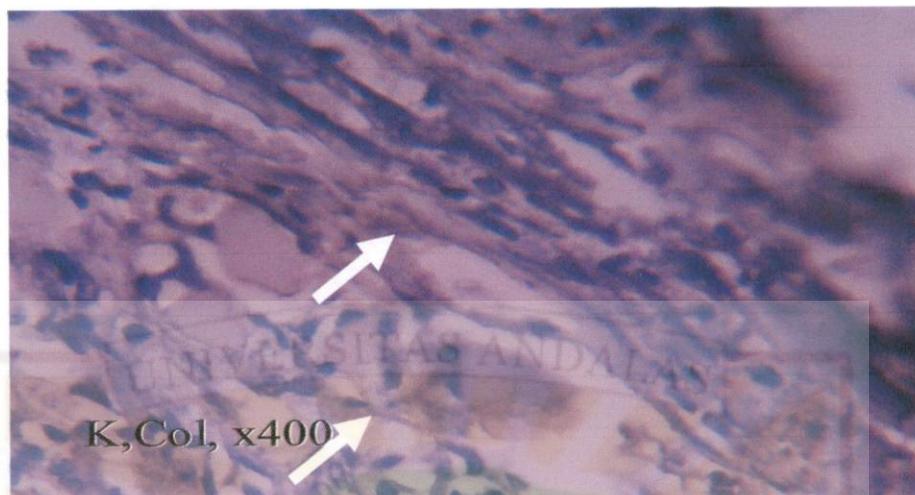
Tabel 5.6 Hasil analisis kebermaknaan rata-rata ekspresi kolagen I pada asing-masing kelompok perlakuan menurut Tukey

Kelompok	K	PI	PII	PIII
K	-	s	s	s
PI			ns	s
PII				s
PIII				

ns = Non signifikan ($p > 0.05$); s = Signifikan ($p < 0.05$)

Ketebalan serat kolagen dari masing-masing kelompok Kontrol, PI, PII dan PIII melalui pemeriksaan imunohistokimia pada jaringan kulit luka bakar tikus berturut-turut disajikan pada Gambar 5. 4, 5.5, 5.6 dan 5.7 berikut ini.

Gambar 5.4 menunjukkan tikus kelompok kontrol yang diberi pelarut pada jaringan kulit luka bakar tikus. Setelah dilakukan analisis IHK terlihat bahwa ekspresi serat kolagen tipe I hanya berupa bayangan warna kecoklatan yang tipis (400 x).



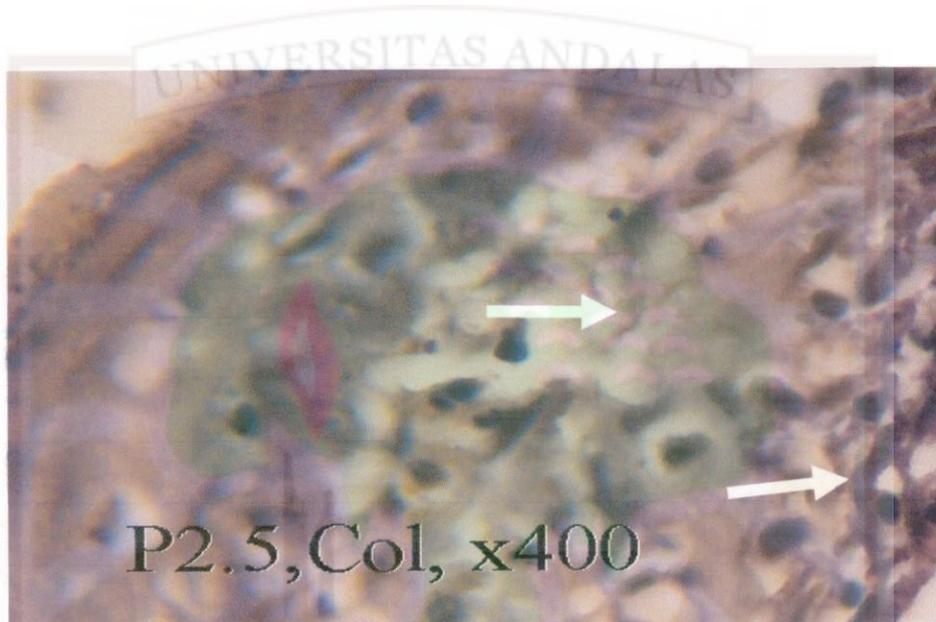
Gambar 5.4 Pewarnaan IHC serat kolagen tipe I pada kelompok kontrol tampak pewarnaan positif tipis hanya berupa bayangan kecoklatan (400 x)

Gambar 5.5 menunjukkan pewarnaan IHC kolagen tipe I pada tikus kelompok PI. Ekspresi serat kolagen tipe I pada kelompok PI, pada hari ke 14 terlihat lebih banyak dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.



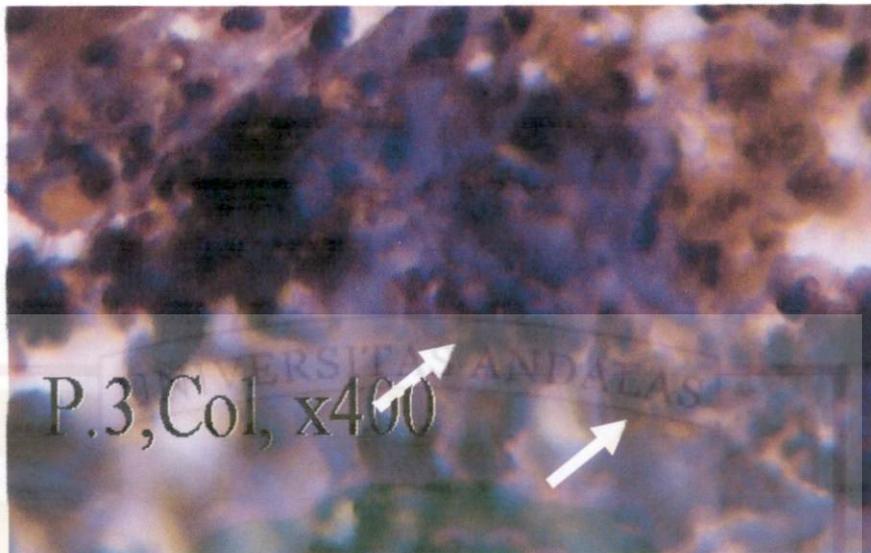
Gambar 5.5 Pewarnaan IHC kolagen tipe I pada kelompok PI tampak pewarnaan positif terlihat warna kecoklatan (400 x)

Ekspresi serat kolagen tipe I pada kelompok PII, pada hari ke 14 terlihat lebih banyak dan lebih tebal. Perbedaan ketebalan kolagen ini juga bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Setelah dilakukan pewarnaan IHK, memperlihatkan warna yang positif kecoklatan yang lebih jelas (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Pewarnaan IHK Kolagen Tipe 1 pada Kelompok P II
Pewarnaan Positif Tipis Berupa Serat, Intensitas Warna Lebih
Coklat (400 x)

Ekspresi serat kolagen tipe I pada kelompok PIII, pada hari ke 14 terlihat lebih banyak dan lebih tebal. Perbedaan ketebalan kolagen ini juga bermakna dibandingkan dengan kelompok PII. Perbedaan ketebalan kolagen ini juga bermakna dibandingkan dengan kontrol dan memperlihatkan warna yang positif kecoklatan yang lebih pekat (Gambar 5.7).



Gambar 5.7 Pewarnaan IHK kolagen tipe 1 pada kelompok P III tampak pewarnaan positif tipis berupa serat, intensitas warna lebih coklat tua (400 x)

5.4 Pengaruh Pemberian PBMC, BM-MSK dan Kombinasi PBMC dengan BM-MSK Terhadap Persentase Rata-rata Jumlah Sel yang Memberikan Reaksi Positif terhadap Integrin $\alpha 2\beta 1$ pada Jaringan Kulit Luka Bakar

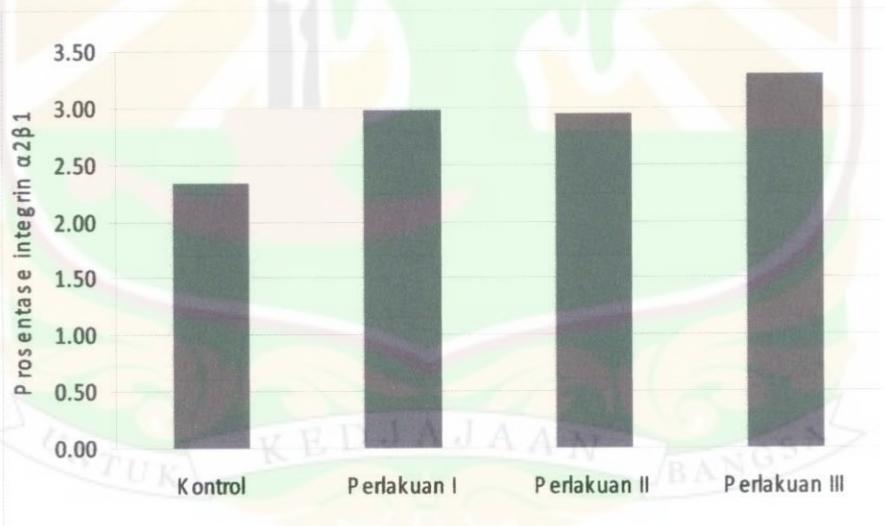
Pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ dilakukan pada hari ke 14 dengan cara menghitung jumlah sel yang memberikan reaksi positif terhadap anti integrin $\alpha 2\beta 1$. Besar ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ dilakukan dengan cara menghitung sel yang terekspresi dibagi dengan jumlah total sel/ $15625\mu\text{m}^2$ pada jaringan kulit luka bakar tikus. Setiap kelompok masing-masing jaringan kulitnya diamati dan dihitung sel yang mengekspresikan integrin dibagi jumlah total sel yang terlihat. Hasil perhitungan persentase rata-rata ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.7 dan Gambar 5.8.

Pada Tabel 5.7 dan gambar 5.8 terlihat bahwa pada hari ke 14, terjadi peningkatan persentase rata-rata sel yang mengekspresikan integrin $\alpha 2\beta 1$ di jaringan kulit luka bakar tikus. Rata-rata persentase ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada

kelompok kontrol adalah 2,340, P I 2,972, PII 2,938 dan PIII 3.297. Dari uji ANOVA diperoleh *p value* sebesar 0,191 ($p > 0,05$) yang berarti tidak ada pengaruh pemberian sel punca terhadap persentase ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada jaringan kulit luka bakar tikus.

Tabel 5.7 Persentase rata-rata sel yang memberikan reaksi positif terhadap integrin $\alpha 2\beta 1$ pada jaringan kulit luka bakar setelah diberi PI, PII, dan PIII pada hari ke 14

Kelompok	Rata-rata Ekspresi Integrin $\alpha 2\beta 1$ (%) pada Hari Ke 14	P
K	2.340 ± 0.329	0.191
P I	2.972 ± 0.868	
P II	2.938 ± 0.521	
P III	3.297 ± 1.039	



Gambar 5.8 Grafik rata-rata kadar ekspresi Integrin $\alpha 2\beta 1$ pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III pada hari ke 14

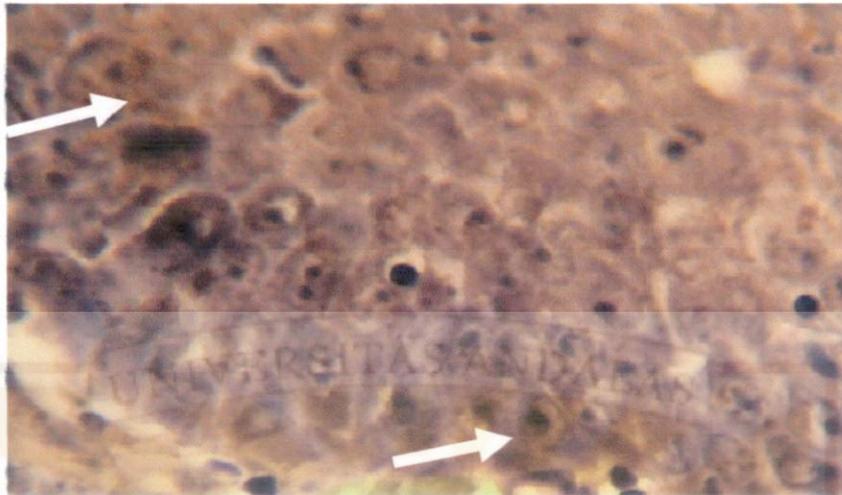
Ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ dari kelompok kontrol, PI, PII, dan PIII untuk pemeriksaan imunohistokimia pada jaringan kulit yang mengalami luka bakar pada tikus percobaan dapat dilihat pada Gambar 5. 9, 5.10, 5.11 dan 5.12.

Gambar 5.9 menunjukkan tikus kelompok kontrol yang diberi pelarut pada jaringan kulit tikus setelah luka bakar. Setelah pewarnaan IHK, tampak bahwa ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ di dalam sel hanya berupa bayangan warna kecoklatan yang tipis (400 x).



Gambar 5. 9 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada tikus kelompok kontrol tampak pewarnaan positif tipis di dalam sel hanya berupa bayangan kecoklatan (400 x)

Ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ didalam sel pada tikus kelompok PI, pada hari ke 14, memperlihatkan warna yang positif kecoklatan dan ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ ini dapat dilihat pada Gambar 5.10.



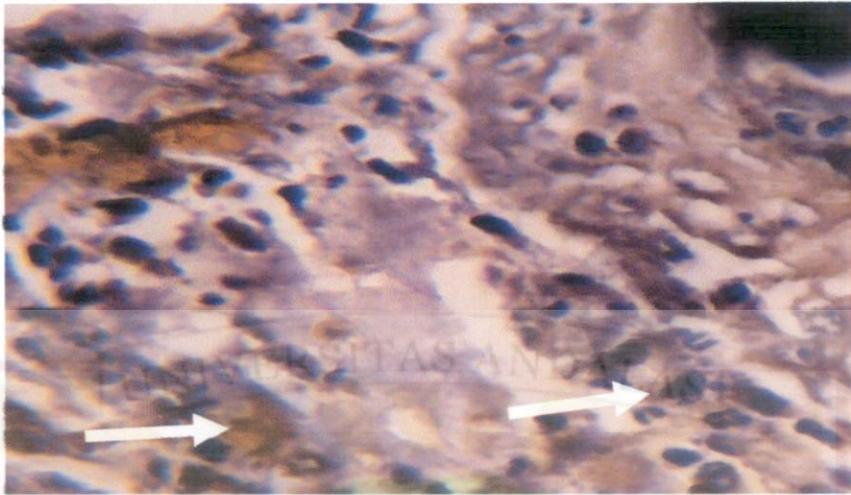
Gambar 5.10 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada tikus kelompok PI tampak pewarnaan positif di dalam sel terlihat warna kecoklatan (400 x)

Ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ didalam sel pada tikus kelompok PII, pada hari ke 14, terlihat lebih banyak didalam sel dan warnanya lebih coklat. Perbedaan ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ ini tidak bermakna dibandingkan dengan kontrol dan memperlihatkan warna yang positif kecoklatan yang lebih jelas dan ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ di dalam sel pada perlakuan ini dapat dilihat pada Gambar 5.11.



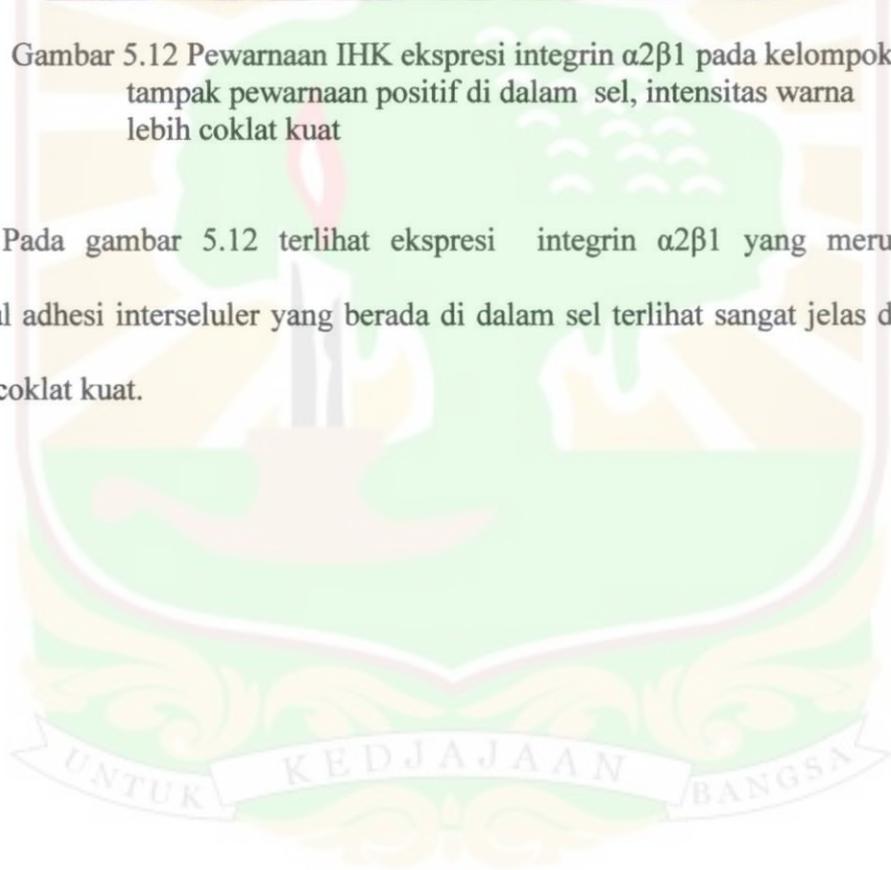
Gambar 5.11 Pewarnaan IHK Ekspresi Integrin $\alpha 2\beta 1$ pada Kelompok P III Tampak Pewarnaan Positif di dalam Sel, Intensitas Warna Lebih Coklat (400 x)

Ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ didalam sel pada tikus dengan menggunakan kombinasi stem sel PBMC dengan MSC pada hari ke 14 terlihat lebih banyak di dalam inti sel, lebih tebal dibandingkan dengan hanya pemberian MSC. Perbedaan ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ ini bermakna dibandingkan dengan kontrol dan memperlihatkan warna yang positif kecoklatan yang lebih pekat dan ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ di dalam sel pada perlakuan ini dapat dilihat pada gambar 5.12.



Gambar 5.12 Pewarnaan IHK ekspresi integrin $\alpha 2 \beta 1$ pada kelompok P III tampak pewarnaan positif di dalam sel, intensitas warna lebih coklat kuat

Pada gambar 5.12 terlihat ekspresi integrin $\alpha 2 \beta 1$ yang merupakan molekul adhesi interseluler yang berada di dalam sel terlihat sangat jelas dengan warna coklat kuat.



BAB VI PEMBAHASAN

Pemberian sel punca PBMC dan BM-MSC eksogenus/ allotransplantasi terbukti dapat mempercepat penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan. Percepatan penyembuhan luka bakar tikus percobaan ini dilihat pada mekanisme molekuler sekresi kadar faktor pertumbuhan, ekspresi kolagen tipe I dan integrin $\alpha 2\beta 1$ setelah diberi sel punca PBMC (PI), BM-MSC (PII) dan kombinasi antara PBMC dan BM-MSC (PIII).

6.1 Pengaruh Sekresi Kadar TGF- β 1 Pada Serum Tikus Setelah diberi PBMC, BM- MSC dan Kombinasi PBMC dengan BM- MSC

TGF- β 1 merupakan faktor pertumbuhan multifungsional yang berperan dalam setiap fase penyembuhan luka (inflamasi, proliferasi dan remodelling). Setiap fase penyembuhan luka, TGF- β 1 berperan dalam migrasi, proliferasi, dan peningkatan produksi kolagen oleh fibroblast (Faler *et al.*, 2006).

Hasil analisis data penelitian ini menunjukkan bahwa sekresi kadar TGF- β 1 terjadi peningkatan pada hari ke 3 dan ke 7 pada kelompok PI jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan sekresi kadar TGF- β 1 pada hari ke 3 terjadi akibat adanya kerusakan jaringan dan fase inflamasi sedang berlangsung. Pada hari ke 7 sekresi kadar TGF- β 1 masih meningkat. Peningkatan ini disebabkan oleh peran sel keratinosit, fibroblast dan sel endotel pada kulit yang akan menghasilkan TGF- β 1. Temuan ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Assoian and Sporn (1986) bahwa peningkatan kadar TGF- β 1 terjadi akibat kerusakan pada kulit sehingga memicu platelet untuk mengalami degranulasi dan

akibat kerusakan pada kulit sehingga memicu platelet untuk mengalami degranulasi dan mensekresikan faktor pertumbuhan ini. Sel-sel pada kulit seperti keratinosit, makrofag dan fibroblast dan sel endotel juga mensekresikan TGF- β (Faller *et al.*, 2006).

Peningkatan kadar sekresi TGF- β 1 hari ke 3 dan hari ke 7 pada kelompok PBMC, disebabkan karena PBMC mengandung sel hematopoietik yang terdiri dari sel monosit, fibrosit dan *endothelial progenitor cell* (EPC). Sel monosit dan fibrosit bersifat sebagai *antigen presenting cell* (APC) dan menghasilkan mediator, yang berperan dalam inflamasi, pembentukan kolagen dan angiogenesis. Fibrosit akan migrasi ke tempat luka yang disebabkan oleh interaksi kemokin SLC dengan reseptor CCR 7 yang ada pada fibrosit. Di tempat luka fibrosit akan menghasilkan kolagen tipe I. Pembentukan kolagen tipe I ini dipengaruhi oleh sitokin inflamasi yaitu IL-1 dan TGF- β 1 (Abe *et al.*, 2001). Pada kondisi luka bakar jumlah fibrosit dan sekresi TGF- β 1 meningkat. Peningkatan sekresi TGF- β 1 dua kali lebih besar bila dibandingkan dengan kondisi normal (Wang *et al.*, 2007 dan Yang *et al.*, 2002).

Peningkatan sekresi TGF- β 1 setelah pemberian PBMC mempercepat penyembuhan luka, dengan cara mempengaruhi migrasi sel-sel inflamasi, sel endotel, keratinosit, meregulasi pertumbuhan sel dan diferensiasi. Peran TGF- β 1 terhadap regulasi pertumbuhan sel adalah merangsang proses EMT. TGF- β 1 akan berikatan dengan reseptor tipe I dan II melalui aktivasi reseptor tirosin kinase (RTK). Aktivasi reseptor ini akan menyebabkan terjadinya fosforilasi smad 2 dan smad 3, selanjutnya akan berikatan dengan smad 4 yang bersifat sebagai

coaktivator. Ikatan smad 2, smad 3 dengan smad 4 akan masuk ke nukleus berikatan dengan DNA *binding* protein, yang akan merangsang atau menghambat transkripsi gen. TGF- β 1 dapat meningkatkan diferensiasi fibrosit menjadi fibroblast dan miofibroblast (Mattoli *et al.*, 2009). Selain itu hasil penelitian Werner *et al.*, 2003, melaporkan bahwa migrasi sel endotel pembuluh darah yang dipengaruhi oleh TGF- β 1 akan membantu pembentukan tabung pembuluh dan meningkatkan regulasi faktor pertumbuhan angiogenik yaitu VEGF sehingga mempengaruhi proses angiogenesis.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa sel punca PBMC dapat meningkatkan sekresi TGF- β 1. Selanjutnya sekresi TGF- β 1 ini akan meningkatkan regulasi pertumbuhan sel dan migrasi sel pada kulit sehingga mempengaruhi fase inflamasi, epitelisasi, angiogenesis dan mungkin juga akan mempengaruhi fase remodelling yang akan mempercepat proses penyembuhan luka.

Hasil analisis data penelitian ini menunjukkan bahwa sekresi kadar TGF- β 1 untuk PII terjadi penurunan pada hari ke 3 dan terdapat perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada hari ke 7 kadar TGF- β 1 terjadi peningkatan dibandingkan dengan kelompok kontrol tetapi tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Penurunan sekresi kadar TGF- β 1 pada tikus yang diberi BM-MS (PII) disebabkan karena sel punca ini berperan sebagai anti inflamasi dengan cara mengurangi produksi sitokin proinflamasi (TNF- α dan IFN- γ). Pengurangan sitokin proinflamasi akan menghambat secara langsung fungsi dan proliferasi sel T, sekresi *prostaglandin E2* (PGE 2), *indoleamine 2,3-*

dyoxygenase (IDO), TGF- β 1 dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). BM- MSC meningkatkan produksi sitokin antiinflamasi yaitu IL-10 dan IL-4 sehingga BM- MSC akan bersifat sebagai *hyporesposiveness* (Newman *et al.*, 2009). Kemampuan antiinflamasi dari BM- MSC juga didukung oleh penelitian Smith *et al.*, 2010 yang menemukan bahwa sel punca mampu menurunkan ekspresi gen molekul adhesi yaitu ICAM 1, VCAM 1 dan MMP 11, yang akan mempengaruhi migrasi sel inflamasi serta BM- MSC dapat menurunkan ekspresi mRNA TGF- β 1 pada tikus luka insisi (Chen *et al.*, 2008).

Mekanisme BM- MSC eksogen pada proses penyembuhan luka dapat melalui beberapa cara yaitu terjadinya fusi/transdifrensiasi, sebagai imunomodulasi dan efek parakrin melalui aktivasi beberapa faktor pertumbuhan antara lain IGF-1, VEGF, HGF, PDGF, KGF dan angiotensin 1 (Chen *et al.*, 2008). Fusi dari BM- MSC masih diperdebatkan, karena dari penelitian yang telah dilakukan ternyata tidak terjadi fusi dari BM- MSC dengan sel yang ada dikulit dan walaupun terjadi fusi itu sangat jarang sekali. Transdifrensiasi dari BM- MSC dapat terjadi dipengaruhi oleh lingkungan mikronya dan BM- MSC dapat berdifrensiasi menjadi keratinosit, sel endotel, pericit dan monosit (Sasaki *et al.*, 2008). Untuk dapat terjadi difrensiasi BM- MSC akan migrasi dan homing ditempat jaringan yang rusak.

Untuk dapat migrasi dan homing, MSC akan direkrut oleh kemokin yaitu SLC/CCL21 yang dihasilkan oleh keratinosit sewaktu luka. Kemokin ini akan berinteraksi dengan reseptor permukaan *chemokine receptor* (CCR7) yang ada pada MSC, sehingga MSC akan berakumulasi ditempat luka dan akan berfungsi

mempercepat penyembuhan luka dengan cara mengeluarkan sitokin, faktor pertumbuhan dan bertransdiferensiasi menjadi sel-sel kulit serta mempengaruhi MSC endogen (Sasaki *et al.*, 2008). Efek parakrin BM-MSC untuk penyembuhan luka melalui aktivitas IGF-1 yang berperan penting dalam regenerasi jaringan (Chen *et al.*, 2008) dan BMP-4 akan menyebabkan BM-MSC berdiferensiasi menjadi keratinosit (Sasaki *et al.*, 2008).

Secara makroskopis tikus luka bakar yang diberi MSC, pada hari ke 7 terjadi perbaikan luka bakar yang lebih baik bila dibandingkan dengan pemberian PBMC. Perbaikan luka bakar ini dilihat pada proses penyembuhan sudah terjadi percepatan proses epitelisasi, folikel rambut sudah terbentuk, dan luas luka bakar sudah berkurang. Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian pemberian BM-MSC untuk luka insisi yang menemukan bahwa BM-MSC dapat mempercepat waktu dan kualitas penyembuhan luka, meningkatkan pembentukan jaringan granulasi dan epitelisasi, kekuatan luka dan pembentukan folikel rambut serta kelenjar keringat (Li *et al.*, 2008). Perbedaan perbaikan luka secara makroskopis ini dapat dilihat pada gambar lampiran 19 c.

Kadar TGF- β 1 pada hari ke 3 dan ke 7 setelah diberi kombinasi sel punca PBMC dan BM-MSC meningkat dibanding dengan kelompok kontrol. Peningkatan kadar TGF- β 1 disebabkan karena PBMC dan BM-MSC yang diberikan menghasilkan sitokin dan faktor pertumbuhan yang akan mempercepat penyembuhan luka. Keadaan ini menunjukkan bahwa ke dua sel punca yang diuji memberikan efek sinergis terhadap penyembuhan luka yang dapat dilihat bahwa BM-MSC tidak mempengaruhi efek PBMC. Keadaan ini disebabkan karena

sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan yang disekresi oleh BM-MSK akan menyokong survive, proliferasi dan difrensiasi dari HSC dan EPC (Wu *et al.*, 2010). Ke dua sel punca ini dapat migrasi ke tempat jaringan rusak, karena ditemukan kemokin dengan reseptor yang sama yaitu SLC/CCR7 dan SDF-1 α dan CXCR4 (Bobis *et al.*, 2006 dan Sasaki *et al.*, 2008) dan kedua sel punca juga berdifrensiasi menjadi sel-sel yang ada pada kulit, di antaranya fibroblast, keratinosit dan sel endotel (Abe *et al.*, 2001; Hedrick *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2000 dan Sasaki *et al.*, 2008).

Hasil penelitian ini juga didukung dari penelitian pemberian kombinasi antara *Hematopoietic stem cells* (HSC) dan BM-MSK yang berasal dari manusia dan ditanamkan pada mencit untuk melihat pertumbuhan tulang. Ternyata kombinasi ini mampu bekerjasama dalam pembentukan jaringan dan menyokong pembentukan pembuluh darah (Moioli *et al.*, 2008). Begitu juga dengan pemberian kombinasi PBMC dan BM-MSK pada tikus luka bakar secara makroskopis terlihat pada hari ke 7 terjadi perbaikan luka bakar yang lebih baik dari pemberian masing-masing PBMC dan BM-MSK (dapat dilihat pada gambar lampiran 19 c). Dari gambar tersebut terlihat bahwa pada hari ke 7 tikus yang diberi kombinasi, proses penyembuhan luka sudah hampir sembuh, karena folikel rambut sudah terbentuk dengan baik dan rambut/bulu dari tikus sudah banyak yang tumbuh.

6.2 Pengaruh Sekresi Kadar VEGF Pada Serum Tikus Setelah diberi PBMC, BM-MSC dan Kombinasi PBMC dengan BM-MSC

VEGF merupakan faktor pertumbuhan yang telah dihasilkan pada awal luka setelah terjadinya agregasi platelet. VEGF berperan dalam migrasi, proliferasi dari sel endotel sehingga akan mempengaruhi proses angiogenesis.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa sekresi kadar VEGF pada hari ke 3 setelah diberi PBMC lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Namun perbedaan kadar VEGF ini secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini mungkin disebabkan karena kadar VEGF pada kelompok kontrol di hari ke 3 dan ke 7 sangat bervariasi sehingga akan mempengaruhi analisis data. Peningkatan kadar VEGF ini mungkin sama dengan yang terjadi pada kadar TGF- β 1, sebab PBMC bersifat pluripotent yang mengandung monosit, fibrosit dan *endothelial progenitor cell*/EPC (Herdrick *et al.*, 2010 dan Rasokat *et al.*, 2006). Sel-sel ini akan memproduksi sitokin dan faktor pertumbuhan di antaranya VEGF, FGF, HGF, GC-SF, GMC-SF dan TGF- β . VEGF, FGF dan TGF- β berperan dalam angiogenesis (Rehman *et al.*, 2003).

Peran VEGF dalam angiogenesis dari penelitian Bao *et al.*, (2009) terdahulu diketahui dapat melibatkan beberapa mekanisme yaitu vasodilatasi, degradasi membrana basalis, migrasi dan proliferasi sel endotel. Vasodilatasi meningkat dengan adanya VEGF yang terikat pada reseptor KDR yang akan menstimulasi aktivitas dari NOS dan COX sehingga terjadi vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah. Degradasi membrana basalis terjadi karena VEGF pada endotel yang akan meningkatkan produksi MMP-1 dan TIMP-1. MMP-1

berperan dalam mendegradasi kolagen tipe I , II dan kolagen tipe III. Adanya keseimbangan dari enzim yang dihasilkan, maka VEGF yang ada akan menyebabkan terjadi degradasi membrana basalis. Migrasi sel endotel meliputi interaksi sel, molekul adhesi (integrin) dan matriks ekstraselular. VEGF meningkatkan ekspresi dari uPA yang dibutuhkan integrin untuk dapat sel endotel migrasi (Senger *et al.*, 1996). Untuk proliferasi sel endotel dipengaruhi oleh NO yang akan menstimulasi jalur MPAK (Parenti *et al.*, 1998). Selain itu VEGF juga akan berperan dalam migrasi, proliferasi dan diferensiasi EPC yang ada pada PBMC dan dari bone marrow (endogen). EPC endogen yang ada dalam darah perifer sudah matur dan ditandai dengan adanya marker CD34 dan VEGFR-2. EPC mampu migrasi dan homing ketempat jaringan rusak dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti faktor pertumbuhan, enzim, ligand dan reseptor permukaan. VEGF, SDF-1 dan matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) akan mempengaruhi migrasi EPC (Heissig *et al.*, 2002).

Pada hari ke 7 setelah pemberian PBMC kadar VEGF lebih rendah dari kontrol, namun secara statistik tidak berbeda secara bermakna. Penurunan kadar VEGF setelah diberi PBMC mungkin disebabkan karena sekresi VEGF sudah maksimal dan angiogenesis sudah terbentuk. Penurunan sekresi VEGF mungkin disebabkan telah normalnya *oxygen tension*. Rendahnya *oxygen tension* merangsang ekspresi dari suatu *factor nuclear transcription termed* yaitu *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) oleh endotelial vaskular. HIF-1 berada dalam ikatan rangkai spesifik DNA yang akan mengatur sintesis VEGF (Ferrara and Smyth 1997). Penurunan kadar VEGF juga disebabkan karena fungsi faktor

pertumbuhan ini mengatur keseimbangan antara proliferasi dan penuaan sel (Bao *et al.*, 2009; Herdrick *et al.*, 2010; Rasokat *et al.*, 2006 dan Yeh *et al.*, 2003). Disamping itu VEGF juga membantu sel EPC berdiferensiasi menjadi sel endotel dan otot polos pembuluh dan monosit yang ada pada PBMC akan bertransdiferensiasi menjadi sel endotel (Zhao *et al.*, 2003) dan akan berperan dalam angiogenesis dan membantu pembentukan jaringan granulasi (Jab *et al.*, 2003).

Hasil analisis data menunjukkan bahwa sel punca PBMC dapat mempengaruhi sekresi kadar VEGF- β -1, dan selanjutnya akan mempengaruhi regulasi pembentukan pembuluh darah baru untuk mempercepat penyembuhan luka. Hasil penelitian sejalan dengan yang ditemukan oleh Rantam dkk. (2009), bahwa sel punca PBMC dapat mempercepat penyembuhan luka sayat pada mencit diabetes dengan meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru dan pembentukan epidermis pada kulit mencit.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa kadar VEGF pada hari ke 3 setelah diberi BM- MSC dan kombinasi PBMC dengan BM- MSC, diperoleh kadar VEGF lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan kadar VEGF ini secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna. Penurunan kadar VEGF setelah diberi BM- MSC dan kombinasi, mungkin disebabkan karena stem sel BM- MSC dan kombinasi setelah berada pada jaringan luka mengalami diferensiasi. Hasil ini juga sesuai dengan hasil peneliti Sasaki *et al.*, (2008) bahwa sel punca akan berakumulasi di sekitar luka dan lingkungan mikro (adanya sitokin dan

faktor pertumbuhan) yang ada di sekitar luka akan mempengaruhi sel punca, sehingga terjadi difrensiasi sel punca menjadi endotel dan sel kulit lainnya.

Penelitian sinergis antara HSC dan BM-MSC telah didapatkan bahwa kedua sel punca ini mempercepat pembentukan dan regenerasi jaringan vaskular yang dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan VEGF akan memediasi difrensiasi BM-MSC menjadi sel endotel. Sifat sinergis dari kedua sel punca ini terlihat bahwa jumlah dan diameter pembuluh darah meningkat. Keadaan ini dipengaruhi oleh HSC dan BM-MSC yang berdifrensiasi menjadi sel endotel, mengeluarkan sinyal yang berperan dalam perbaikan jaringan (Moioli *et al.*, 2008).

Percepatan penyembuhan luka bakar pada tikus yang diberi BM-MSC juga sejalan dengan yang ditemukan oleh Sasaki *et al.*, (2008) dan Wu *et al.*, (2007) bahwa BM-MSC akan mempercepat penyembuhan luka dengan mengawali angiogenesis & meningkatkan reepitelisasi dan pembentukan sel diantaranya keratinosit (Wu *et al.*, 2007), meningkatkan proliferasi dan migrasi fibroblast (Dulchavsky *et al.*, 2008). Peran BM-MSC dalam mengawali angiogenesis di antaranya menghasilkan faktor proangiogenik dan antiangiogenik yang mengakibatkan angiogenesis dapat terjadi dengan baik. Faktor proangiogenik ini akan menstimulasi proliferasi, migrasi sel endotel dan mengatur sel untuk membentuk tabung pembuluh (Wu *et al.*, 2007).

Dalam angiogenesis banyak faktor angiogenik yang berperan di antaranya FGF, angiotensin dan TGF- β . Pada penelitian ini kadar VEGF setelah diberi BM-MSC dan kombinasi menurun dibandingkan dengan kontrol dan PBMC. Ini

mungkin disebabkan karena BM-MSC mampu meningkatkan faktor angiogenik lainnya. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut untuk menguji faktor angiogenik lain yang berperan dalam angiogenesis. Kadar VEGF yang tinggi juga dapat mempunyai efek yang tidak baik yaitu dapat menimbulkan jaringan parut (van der Veer *et al.*, 2009).

6.3 Pengaruh Ekspresi Ketebalan Kolagen Tipe I pada Jaringan Kulit Luka Bakar Tikus Setelah diberi PBMC, BM-MSC dan Kombinasi PBMC dengan BM-MSC

Kolagen merupakan komponen matriks ekstraselular yang dihasilkan fibroblast. Kolagen dihasilkan oleh fibroblast aktif yang mengandung mRNA kolagen tipe I, dan selanjutnya akan menghasilkan kolagen tipe I.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara ketebalan kolagen tipe I pada jaringan kulit luka bakar di hari ke 14 setelah diberi PBMC dengan kelompok kontrol. Ini menunjukkan bahwa PBMC mampu mempercepat penyembuhan luka bakar tikus. Peningkatan ketebalan kolagen tipe I ini mungkin disebabkan karena PBMC dapat mengeluarkan sitokin dan faktor pertumbuhan yang akan meningkatkan kerja sel kulit disekitar luka atau PBMC yang mengalami diferensiasi. Hasil penelitian secara *in vitro* telah dilakukan peneliti terdahulu diketahui bahwa PBMC mengandung fibrosit. dengan adanya IL-1 dan TGF- β maka fibrosit akan menghasilkan kolagen tipe I dan monosit PBMC juga bertransdiferensiasi menjadi myofibroblast atau sel otot polos- α (α -SM actin) pada akhir fase inflamasi, sel epitel dan sel endotel (Wu, *et al.*, 2010; Jab *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2003 dan Abe *et al.*, 2001).

Difrensiasi PBMC menjadi myofibroblast dan sel endotel berperan dalam pembentukan jaringan granulasi dan kekuatan luka. Sementara itu TGF- β yang dihasilkan oleh keratinosit pada waktu luka juga akan menstimulasi fibroblast untuk menghasilkan kolagen (Yang *et al.*, 2001).

Peningkatan ketebalan kolagen pada pemberian PBMC secara imunohistokimia dapat dilihat pada Gambar 5.5, bahwa serat kolagen tipe I lebih tebal, dan perbaikan jaringan luka belum sebaik pemberian MSC dan kelompok kombinasi. Pada pemberian PBMC sampai hari ke 7 terlihat adanya keropeng dan proses inflamasi sudah tidak terlihat lagi. Keadaan ini dapat dilihat perbedaannya pada gambar lampiran 20 b, c dan d.

Peningkatan ketebalan kolagen tipe 1 setelah diberi BM-MSK pada tikus berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan ini disebabkan karena BM-MSK menghasilkan mediator yang mempunyai efek parakrin, yang dapat meningkatkan jumlah dan migrasi fibroblast di jaringan luka (Smith *et al.*, 2010) dan mampu berdifrensiasi menjadi fibroblast melalui jalur Wnt/ β -catenin (Liu *et al.*, 2009 dan Cheon *et al.*, 2006). Fibroblast akan migrasi ketempat luka karena adanya TGF- β , CTGF dan monocyte chemoattractan protein-1 (MCP-1) dan mediator ini juga akan menstimulasi fibroblast untuk menghasilkan kolagen tipe 1. BM-MSK juga membantu kontraksi luka *in vivo*, karena pada *in vitro* sel punca ini memperlihatkan fenotipe kontraktil dan ekspresi actin α -smooth muscle/miofibroblast marker dan ekspresi miofibroblast ini akan mempengaruhi

terhadap kontraksi luka (Farlin *et al.*, 2009 ; Lau *et al.*, 2009 dan Smith *et al.*, 2010).

Peningkatan ketebalan kolagen akan berpengaruh terhadap fase penyembuhan luka di antaranya pada fase inflamasi, proliferasi dan *remodelling*. Kolagen pada fase inflamasi akan membantu sel-sel monosit untuk migrasi dari darah perifer ke ekstrasvaskuler untuk melakukan fungsinya sebagai fagositosis (Newman and Tucci, 1990). Pada fase proliferasi kolagen akan berperan dalam pembentukan jaringan granulasi dan kekuatan luka (Yang *et al.*, 1999). Keadaan inilah yang mempercepat penutupan luka bakar yang dilakukan pada penelitian ini dan penebalan kolagen dapat dilihat Gambar 5.6.

Pada fase *remodelling* sintesis dan degradasi kolagen sangat diperlukan untuk mempercepat proses penyembuhan luka. Pada fase ini BM-MSC akan meregulasi deposisi kolagen dan meregulasi MMP/TMMP sehingga terbentuk kekuatan dan integritas jaringan luka dengan baik (Maxon *et al.*, 2012).

Ketebalan kolagen tipe 1 setelah diberi kombinasi PBMC dan BM-MSC pada tikus luka bakar terjadi peningkatan cukup tinggi dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kontrol. Meningkatnya ketebalan kolagen setelah diberikan perlakuan kombinasi ini, menunjukkan bahwa ke dua stem sel ini bekerja secara sinergis. Hasil penelitian yang telah dilakukan dengan pemberian hematopoietik stem sel dan BM-MSC pada luka terlihat bahwa ke dua stem sel ini berperan dalam penyembuhan luka dan PBMC sangat berperan pada awal penyembuhan luka yaitu pada fase inflamasi untuk meningkatkan sel inflamasi ditempat luka, sedangkan BM-MSC berperan dalam ke tiga fase penyembuhan luka. Pada fase

inflamasi BM-MSC berperan sebagai antiinflamasi dan imunosupresi, pada fase proliferasi meningkatkan pembentukan jaringan granulasi, angiogenesis dan reepitelisasi dan pada fase *remodelling* berperan dalam regulasi dari deposisi dan degradasi kolagen serta regulasi dari MMP/TMMP (Fatkhe *et al.*, 2004).

Kolagen merupakan suatu matriksekstraseluler yang berperan sebagai *scaffold* pada jaringan konektif dan terlibat dalam mengontrol fungsi seluler seperti pertumbuhan, diferensiasi dan morfogenesis (Leitinge, 2011) serta berinteraksi dengan molekul adhesi (Twardowski *et al.*, 2007). Peranan kolagen yang membantu proses seluler dan berinteraksi dengan molekul adhesi ini akan menyebabkan mekanisme seluler seperti migrasi akan berjalan dengan baik. Keadaan inilah yang akan membantu mempercepat penyembuhan luka.

Pemberian sel punca PBMC dan BM-MSC secara injeksi langsung di daerah luka dapat memberikan efek yang sangat baik terhadap pembentukan kolagen untuk penyembuhan luka bakar tikus percobaan pada hari ke 14. Untuk melihat efek sel punca ini terhadap fibroblast sebagai penghasil kolagen dan matriks ekstraselular lain yang berperan selama proses penyembuhan luka, perlu dilakukan penelitian lanjutan.

6.4 Pengaruh Persentase Integrin $\alpha 2\beta 1$ Pada jaringan Kulit Luka Bakar Tikus Setelah diberi PBMC, BM-MSC dan Kombinasi PBMC dengan BM-MSC

Integrin $\alpha 2\beta 1$ merupakan molekul adhesi yang berperan dalam ikatan antar sel dan dengan matriks ekstraselular. Integrin sebagai perlekatan sel akan

berhubungan dengan matriks ekstraseluler diantaranya kolagen, laminin dan fibronectin ini akan menyebabkan sel migrasi.

Hasil pengukuran persentase ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada jaringan kulit luka bakar terlihat meningkat pada kelompok perlakuan yang diberi PBMC dan BM-MSC namun tidak menunjukkan perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi pada kelompok yang diberi kombinasi secara statistik terlihat perbedaan. Ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ secara umum akan meningkat pada waktu luka karena integrin ini berperan untuk mempengaruhi fungsi migrasi dan proliferasi sel inflamasi, keratinosit dan fibroblast.

Pada platelet, integrin $\alpha 2\beta 1$ akan berinteraksi dengan kolagen tipe I, sehingga terjadi pengikatan platelet, selanjutnya akan meregulasi agregasi platelet untuk mengeluarkan faktor pertumbuhan yang berperan dalam fase inflamasi penyembuhan luka. Integrin $\alpha 2\beta 1$ sangat dibutuhkan oleh keratinosit untuk berikatan dengan kolagen, sehingga integrin $\alpha 2\beta 1$ memberikan transduksi signal untuk memberikan fenotip untuk mengawali migrasi (Zhang *et al.*, 2006).

Pemberian PBMC dan BM-MSC pada tikus luka bakar hanya sedikit terjadi peningkatan persentase ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$. Ini mungkin disebabkan karena ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ diperlukan hanya untuk meregulasi migrasi dan proliferasi sel platelet dan keratinosit. Selain integrin $\alpha 2\beta 1$ untuk migrasi keratinosit dan penutupan luka diperlukan collagenase-1 (MMP-1) dan kolagen tipe I (Pilcher *et al.*, 1997). Pada pengamatan IHC mungkin ekspresi integrin sudah berkurang karena proses penutupan luka sudah terjadi dengan baik.

Pada leukosit ada beberapa integrin yang diekspresikan dan berikatan dengan ligan yang sama, tetapi dapat dengan selektif mengatur aktivitas dari tipe integrin masing-masing sehingga dapat menyempurnakan ikatannya dengan matriks (Lodish *et al.*, 2000).

Persentase integrin yang tidak berbeda antara PBMC dan MSC mungkin disebabkan banyaknya integrin lain yang bekerja dalam proses penyembuhan. Untuk homing dari *niche* sel punca membutuhkan integrin sehingga sel punca baik endogen atau eksogen akan mampu *homing* pada jaringan yang rusak (Semon *et al.*, 2010; Srour *et al.*, 2001). Hal ini juga disokong oleh penelitian Kanatsu-Shinohara *et al.*, (2008) bahwa ada integrin lain yang berperan untuk bisanya homing sel punca yaitu $\alpha 9\beta 1$ dan $\beta 1$. Jika terjadi penurunan ekspresinya akan menyebabkan pengurangan *homing* sel punca ditempat *niche*nya.

Pada penyembuhan luka khususnya reepitelisasi banyak jenis integrin yang ditemukan di permukaan sel keratinosit yaitu $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 6$, dan $\alpha 5\beta 1$. Keadaan ini mungkin yang menyebabkan ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ tidak berbeda dengan diantara kelompok. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut tentang persentase ekspresi integrin pada penyembuhan luka bakar. Integrin yang ada pada keratinosit ini berperan dalam migrasi sel keratinosit dari pinggir luka dan proliferasi keratinosit sehingga proses reepitelisasi terjadi (Larjava *et al.*, 1993 dan Watt, 2002).

Integrin dalam fungsinya dapat bekerjasama dengan faktor pertumbuhan dengan cara mengaktifkan dan pengaturan sinyal faktor pertumbuhan sehingga membantu dalam fase proliferasi penyembuhan luka (Steffensen *et al.*, 2001)

diantaranya adalah TGF- β (Reynold *et al.*, 2005). Peran integrin lainnya adalah dalam apoptosis, angiogenesis dan fungsi neural (Tsuji, 2004).

Penelitian penggunaan sel punca untuk penyembuhan luka khususnya BM-
MSC sudah banyak dilakukan untuk luka sayat dan hanya sedikit yang baru
dilakukan untuk luka bakar, sedangkan untuk sel punca PBMC dan kombinasi
BM-
MSC dan PBMC belum banyak dilakukan. Penelitian ini menjelaskan
mekanisme molekuler penyembuhan luka bakar dengan terapi PBMC, BM-
MSC dan kombinasi BM-
MSC dan PBMC eksogenus melalui efek parakrin dengan
menginduksi lingkungan mikro. Akibat luka bakar, sel pada kulit mengsekresi
TGF- β dan VEGF untuk mengawali proses penyembuhan luka. BM-
MSC
eksogen mempunyai reseptor TGF- β dan PBMC menghasilkan TGF- β dan VEGF
sehingga ke dua sel punca ini dapat bersifat sinergis.

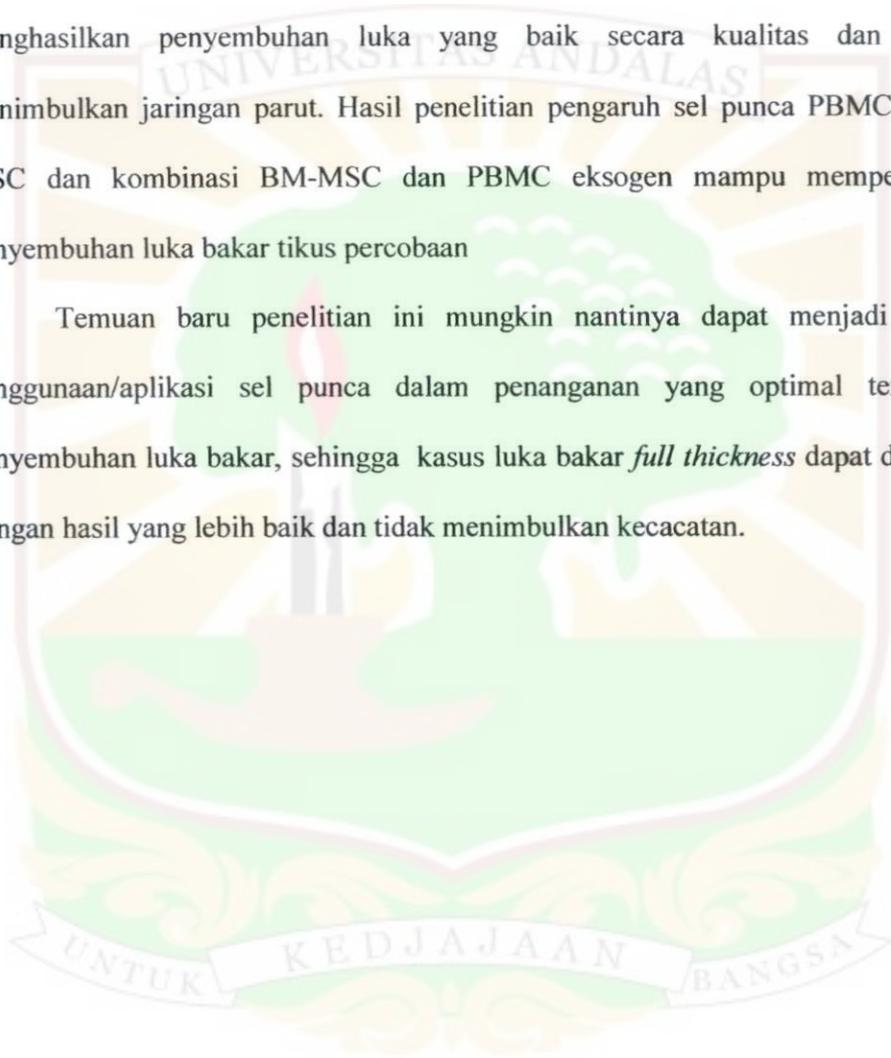
Lingkungan mikro ini menyebabkan sel punca akan menstimulasi
difrensiasi sel progenitor menjadi fibroblast, keratinosit, makrofag dan sel endotel
dan sel ini akan dibutuhkan selama proses penyembuhan luka. Sel tersebut juga
akan menghasilkan mediator solubel diantaranya TGF- β dan VEGF. Ke 2 faktor
pertumbuhan tersebut berperan dalam pembentukan pembuluh darah baru
(angiogenesis) yang akan membawa nutrisi, oksigen dan sel-sel yang dibutuhkan
untuk perbaikan jaringan, untuk percepatan penyembuhan luka.

Percepatan penyembuhan luka terjadi karena TGF- β membantu merekrut
sel inflamasi makrofag, migrasi keratinosit selama proses reepitelisasi dan
mengaktivasi fibroblast untuk meningkatkan produksi kolagen tipe I pada fase
remodelling. Peningkatan kolagen juga menyebabkan terjadi perlekatan sel

dengan integrin, hal ini akan membantu sel migrasi. Integrin juga dapat bekerjasama dengan TGF- β dengan cara mengaktifkan dan pengaturan transduksi sinyal faktor pertumbuhan sehingga mempengaruhi aktivitas intraseluler seperti proliferasi, apoptosis dan survival .

Keseimbangan aktivitas antara proliferasi dan apoptosis akan menghasilkan penyembuhan luka yang baik secara kualitas dan tidak menimbulkan jaringan parut. Hasil penelitian pengaruh sel punca PBMC, BM- MSC dan kombinasi BM- MSC dan PBMC eksogen mampu mempercepat penyembuhan luka bakar tikus percobaan

Temuan baru penelitian ini mungkin nantinya dapat menjadi dasar penggunaan/aplikasi sel punca dalam penanganan yang optimal terhadap penyembuhan luka bakar, sehingga kasus luka bakar *full thickness* dapat diterapi dengan hasil yang lebih baik dan tidak menimbulkan kecacatan.



VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

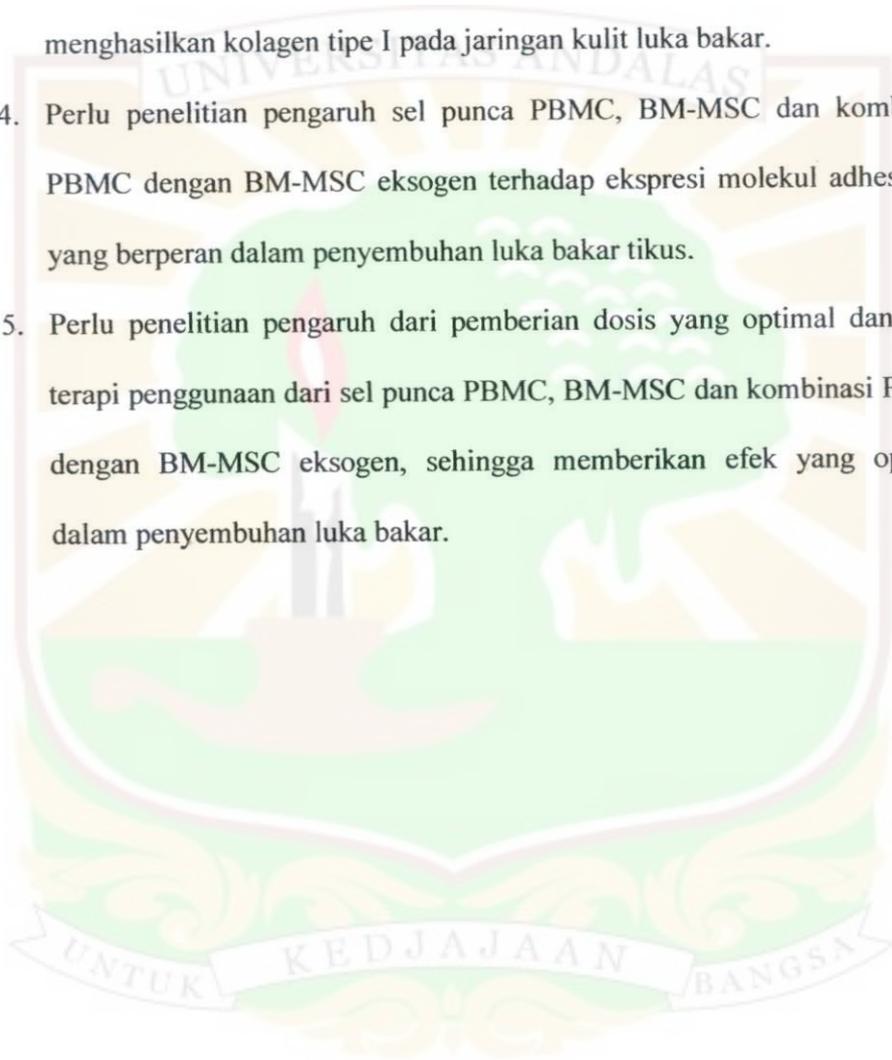
Berdasarkan analisis data dan pembahasan, maka kesimpulan penelitian ini adalah:

1. Pemberian PBMC dan BM-MSC dapat meningkatkan sekresi kadar TGF- β pada tikus luka bakar dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Pemberian PBMC dan BM-MSC dapat meningkatkan sekresi kadar VEGF pada tikus luka bakar dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Pemberian PBMC dan BM-MSC dapat meningkatkan ketebalan kolagen tipe I pada tikus luka bakar dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol.
4. Pemberian PBMC dan BM-MSC dapat meningkatkan persentase ekspresi integrin $\alpha 2\beta 1$ pada tikus luka bakar dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol.

7.2 Saran

1. Perlu penelitian lanjutan pengaruh sel punca PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC terhadap ekspresi TGF- β pada jaringan kulit luka bakar dengan interval waktu yang berbeda.

2. Perlu penelitian lanjutan pengaruh sel punca PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC eksogen terhadap kadar dan ekspresi faktor angiogenik lain yang berperan dalam penyembuhan luka bakar
3. Perlu penelitian pengaruh sel punca PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC eksogen terhadap sel fibroblast yang menghasilkan kolagen tipe I pada jaringan kulit luka bakar.
4. Perlu penelitian pengaruh sel punca PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC eksogen terhadap ekspresi molekul adhesi lain yang berperan dalam penyembuhan luka bakar tikus.
5. Perlu penelitian pengaruh dari pemberian dosis yang optimal dan lama terapi penggunaan sel punca PBMC, BM-MSC dan kombinasi PBMC dengan BM-MSC eksogen, sehingga memberikan efek yang optimal dalam penyembuhan luka bakar.



DAFTAR PUSTAKA

- Abe R, Donnely SC, Peng T, Bucala R and Metz CN. 2001. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *Journal of Immunology*,166: 7556-62
- Akita S, Akino K, Imaizumi T and Hirano A. 2008. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second degree burn wound healing. *J Wound Rep and Reg*, 16:635-41
- Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J and Lachapelle K. 2003. Therapeutic Angiogenesis Using Autologous Bone Marrow Stromal Cells: Improved Blood Flow in a Chronic Limb Ischemia Model. *Ann Thorac Surg* 2003;75:204-209
- Andrzejewska A and Niewiadomska H. 2000. Evaluation of selected parameters of the cytokine system in burn wounds in children, *J Pediatr Surg Int*, 16:80-4
- Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y and Eljaafari A. 2004. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology* 41: 469-476
- Assoian RK, Sporn MB. 1986. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 102(4):1217-23
- Barrientos S, Olivera S, Michael S G, Harold B and Marjana TM. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Persspective article. J Wound repair and regenerat*,16:585-601
- Bao P, Kodra A, Canic MT, Golinko MS, Ehrlich H P and Brem H. 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res*, 153(2):347-58.
- Baum CL and Christopher JA. 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation cellular and molecular evend. *Review Article. J Dermatol Surg*, 31: 674-678.
- Berman A E, Kozlova N I, and Morozevich G E. 2003. Integrins: Structure and Signaling. *J Biochemistry (Moscow)*,68(12):1284-99
- Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, et al. 2010. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *J Wound Rep Reg*,18:50-58

- Bobis S, Jarocha D and Majka M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* Vol. 44, No. 4, 2006 pp. 215-230
- Borkow G. 2004. Copper's Role in Wound Healing. Review of Literature. Property of Cupron Inc.
- Brett D. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. Wound. <http://www.woundsresearch.com/content/a-review-collagen-and-collagen-based-wound-dressings?page=0,1> diunduh 21 September 2012
- Brunnicardi FC. 2005. Schwartz's Principles of surgery. 8 th Ed: Wound healing. New York. McGraw-Hill Health Professions Division.
- Burn surgery Org Educating the burn care professionals around the world. Section II dan III: Burn wound: Histological assessment (zones of injury). Diakses dari [file:///E:/Downloads/epidermis burn 2.htm](file:///E:/Downloads/epidermis%20burn%202.htm), tanggal 5 Januari 2011.
- Canty EG and Kadler K E. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis *Journal of Cell Science* 118, 1341-1353 Published by The Company of Biologists
- Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M and Giannetti A. 1993. Distinctive Integrin Expression in the Newly Forming Epidermis During Wound Healing in Humans. *J Invest Dermatol*, 101:600-604
- Chamberlain G, Fox J, Aston B and Middleton J. 2007. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cell*, 25:2739-2749
- Chen L, Tredget EE, Wu PYG and Wu Y. 2008. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE*; Volume 3. Issue 4. 1886
- Chernykh E R, Shevela E Y, Leplina O Y, Tikhonova M A, Ostanin A A, Kulagin A D, Pronkina N V, Muradov Zh M, Stupak V V and Kozlov V A. 2006. Characteristics of bone marrow cells under conditions of impaired innervation in patients with spinal trauma. *Bull. Exp. Biol. Med.* 141: 117-120.
- Chien S, Li S, Shiu YT and Li YS. 2005. Molecular basis of mechanical modulation of endothelial cell migration. *Frontiers in Bioscience* 10, 1985-2000

- Choi Y H, Burdick MD and Strieter RM. 2010. Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42: 662–671
- Church D; Elsayed S; Reid O; Winston B and Lindsay R. 2006. Burn Wound Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19, No. 2. p. 403–434
- Clemetson KJ and Clemetson J M. 2001. Collagen Receptors as Potential Targets for Novel Anti-Platelet Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 13: 2673-2683
- Cowin AL, Hatzirodos N, Holding, CA, Dunaiski V, Harries RH, Rayner TE *et al.* 2001. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta and receptors in chronic venous leg ulcers. *J. Invest Dermatol.* 117 : 1282-9.
- Culbreath KDM and Zutter MM. 2008. Collagen Receptor Integrins: Rising to the Challenge. *Current Drug Target*, 9: 139-149
- Dennler S, Goumans MJ and Djike P. 2002. Transforming growth factor signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*. Volume 71. p. 731-740
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S and Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843
- Dulchavsky D, Gao X, Liu YB, Deeb D, Arbab AS, McIntosh K, Dulchavsky SA and Gautam S C. 2008. Bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) interact with fibroblasts in accelerating wound healing. *J Invest Surg.* Sep-Oct;21(5):270-9.
- Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Pakrasi MB, Roby J D, Santoro SA and Parks WC. 2001. Pro-collagenase-1 (Matrix Metalloproteinase-1) Binds the $\alpha 2\beta 1$ Integrin upon Release from Keratinocytes Migrating on Type I Collagen. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 31, August 3, pp. 29368–29374
- Eckers B, Zweers M C, Zhang ZG, Hallinger R, Mauch C, Aumailley M and Krieg T. 2006. Mechanical tension and integrin $\alpha 2\beta 1$ regulate fibroblast function. *Journal investigative Dermatology Proceeding*, 11. 66-72.
- Ellis SJ and Tanentzapf G. 2010. Review Integrin-mediated adhesion and stem-cell-niche interaction. *Cell tissue res*, 339. 121-130.
- Ema H and Suda T. 2012. Perspectives Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*;120(11): 2174-2181

- Eming SA and Thomas K. 2006. Molecular mechanism of VEGF-A action during tissue repair. *Journal of investigative dermatology symposium proceeding*, 11 79-86
- Enoch S and Price P. 2004. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the age. Available at <http://www.worldwidewounds.com>. Tanggal 2011
- Evers L H, Bhavsar D and Mailänder P. 2010. The biology of burn injury. *Experimental Dermatology*, 19: 777-783.
- Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L and Sidawy AN. 2006. Transforming Growth Factor- β and Wound Healing. *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy*. Vol 18, No 1, p. 55-62
- Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A and Isik F. 2004. Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Skin: Collagen Deposition and Wound Repair. *Stem Cells* 2004;22:812-822
- Ferrara N and Davis-Smith T. 1997. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* Vol. 18, No. 1:4-25.
- Ferrara N. 1999. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International* Vol 56 pp 794-814 (444 vegf a)
- Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med*; 9: 666-9.
- Ferrara N. 2009. Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29:789-791.
- Fernandez P B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsasser HP, Muller R, and Havemann K. 2000. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*; 65:287-300
- Fibbe WE and Noort WA. 2003. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells transplantation. *Ann NY Acad Sci* 996: 235-244
- Fu XB, Shen ZY, Chen YL, He JH, Guo ZR, Zhang ML and Sheng ZY. 2000. Recombinant bovine basic fibroblast growth factor accelerates wound healing in patients with burns, donor sites and chronic dermal ulcers. *Chin Med J* 113:367-371
- Fu X and Li H. 2009. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. *Minireview. Cell Tissue Res* 335:317-321 319

- Ghahary A, Shen Y J, Nedelec B, Wang R, Scott P G and Tredget E E. 1996. Collagenase Production Is Lower in Post-Burn Hypertrophic Scar Fibroblasts Than in Normal Fibroblasts and Is Reduced by Insulin-Like Growth Factor—1. *J Invest Dermatol* 106:476-481
- Grotendorst GR. 2004. Combinatorial signaling pathway determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. Department of cell biology and Anatomy, University of Miami school of Medicine Florida, USA.
- Hall H. 2007. Modified Fibrin Hydrogel Matrices: Both, 3D-Scaffolds and Local and Controlled Release Systems to Stimulate Angiogenesis. *Current Pharmaceutical Design*, Bentham Science Publishers Ltd 13, 3597-3607.
- Hay ED. 1991. *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. Second edition. Plenum Press, New York
- Herdrich B J, Lind RC and Liechty KW. 2008. REVIEW Multipotent adult progenitor cells: their role in wound healing and the treatment of dermal wounds. *Cytotherapy* Vol. 10, No. 6, 543_550
- Heissig B; Hattori K; Dias S; Friedrich M; Ferris B; Hackett NR *et al.* 2002. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*. 31; 109(5): 625–637
- Hettiaratchy S and Dziewulski P. 2004. Clinical Review *ABC of burns* Pathophysiology and types of burns. *BMJ* Volume 328. p 1427-1429
- Hinz B. 2007. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology*. 127, 526–537
- Ho AD, Hoffman R and Zajani ED. 2006. *Stem cell Transplantation Biology, Processing, and Therapy*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim
- Hong YK, Asschenfeldt BL, Velasco P, Hirakawa S, Kunsfeld R, Brown L F, Bohlen P, Senger DR and Detmar M. 2004. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *The FASEB Journal* Vol. 18
- Hosseinimehr SJ, Khorasani G, Azadbakht M, Zamani P, Ghasemi M, Ahmadi A. 2010. Effect of aloe cream versus silver sulfadiazine for healing burn wound in rats, *Acta Dermatovenerol Croat*, 18 (1), p. 2-7
- Jabs A, Moncada GA, Nichols CE, Waller EK, Wilcox JN. 2005. Peripheral blood mononuclear cells acquire myofibroblasts characteristics in granulation tissue. *J Vasc Res*; 42: 174–80

- Jackson WM, Nesti LJ and Tuan RS. 2012. Concise Review: Clinical Translation of Healing Therapies Based on Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Wound Medicine*. 1:44–50
- Jeon Y K, Jang Y H, Yoo D R, Kim S N, Lee S K and Nam M J. 2010. Mesenchymal stem cells' interaction with skin: Wound-healing effect on fibroblast cells and skin tissue. *Wound Rep Reg* 18 655–661
- Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton A J and Ferguson MW. 2002. Transforming growth factor-beta 1,2 and 3 and receptor I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med*. 19: 440-7
- Jung S M and Moroi M. 2001. Platelet collagen receptor integrin $\alpha 2\beta 1$ activation involves differential participation of ADP-receptor subtypes P2Y1 and P2Y12 but not intracellular calcium change. *Eur. J. Biochem*. 268, 3513±3522
- Junquiera LC and Carneiro J. 2003. *Basic Histology: Text and atlas*. 10 th Edition: Skin. New York, McGraw-Hill.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*;97:3422-3427.
- Kato M, Ishizaki A, Hellman U, Wernstedt C, Kyogoku M et al. 1995. A human keratinocyte cell line produces two autocrine growth inhibitors, TGF- β and insuline-like growth factor binding protein-6, in a calcium and cell density-dependent manner. *The journal of Biological Chemistry*.
- Kim S S, Song C K, Shon S K, Lee K Y, Kim C H, Lee M J and Wang L. 2007. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell Tissue Res* 336:59–66
- Kingsley DM. 1994. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Review. Genes & Development* 8:133-14
- Kobayashi N, Hideo N, Yoshikazu Y and Kyotaro K. 2004. The early influence of albumin administration on protein metabolism and wound healing in burned rats. *Wound Repair and Regeneration* VOL. 12, NO. 1, p 109-114.
- Kotowict KGL, Dixon JN, Klein NJ, Peter MJ and Callard RE. 2000. Biological function of CD 40 on human endothelial cells, costimulation with CD 40 ligand and IL-4 selectively induces expression of VCAM and p-selectin resulting in preferential adhesion of lymphosites. *Journal immunology*. 100. 441-448

- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E and Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of native and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101: 3722-3729
- Kiritsy CP and Lynch SE. 1993. Role of Growth Factors in Cutaneous Wound Healing: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(5):729-760
- Kumar S, Peng FW and David JL. 2004. What is new in wound healing. *Turk J Med Sci*. 34: 147 – 160.
- Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH and Heino J. 1993. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest* ;92:1425–1435
- Lau K, Paus R, Tiede S, Day P and Bayat A. 2009. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology* 18: 921–933
- Leitinger B and Hohenester E. 2007. Mini review Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* 26 146–155
- Li L and Xie T. 2005. Stem cell Niche structure and function. *Annu.Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 605-31
- Li Y, Paczesny S, Lauret E et al. 2008. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the notch pathway. *J Immunol*: 180: 1598–1608.
- Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N *et al.* 2008. Tissue-Engineered Skin Containing Mesenchymal Stem Cells Improves Burn Wounds. *Artificial Organs* 32(12):925-931, Wiley Periodicals, Inc.
- Liu ZJ, Zhuge Y and Velazquez O.C. 2009. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 106:984–991
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. ISBN-10: 0-7167-3136-3
- Lorenz HP and Longaker M T. 2003. Wounds: Biology, Pathology, and Management. Dalam *Essential Practice of Surgery Basic Science and Clinical Evidence*. Edited by Jeffrey A. Norton, MD. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg

- Marshak DR, Gottlieb D and Gardner RL. 2001. Stem Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mayhall CG. 2003. The Epidemiology of Burn Wound Infections: Then and Now Health care epidemiology.
- Mayoclinic. 2010. Diakses dari <http://www.mayoclinic.com/health/drug-information/DR601953>.
- Manjas M, Henky J and Agus S. 2011. Application of amniotic gel in wound healing. Dibacakan pada pertemuan International symposium and workshop Research & clinical application on the stem cell and tissue engineering Surabaya 20-23 September.
- Mattoli S, Bellini A and Schmidt M. 2009. The Role of a Human Hematopoietic Mesenchymal Progenitor in Wound Healing and Fibrotic Diseases and Implications for Therapy. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4, 266-280
- Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Miagkova AD and Leroux MA. 2012. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem cells translational medicine*; 1:142-149
- Medina RJ, Kataoka K, Miyazaki M. et al. 2006. Efficient differentiation into skin cells of bone marrow cells recovered in a pellet after density gradient fractionation. *Int J Mol Med* ;17:721-727
- Medina A, Erin B, Nicholas C and Aziz G. 2009. Circulating monocytes have the capacity to be transdifferentiated into keratinocyte-like cells. *Wound Repair and Regeneration* 17. 268-277 by the Wound Healing Society
- Mercandetti M, Cohen A and Paletta. 2013. Wound healing, healing and repair. E Medicine Available from: URL: <http://www.eMedicine.com/Inc>
- Metcalf AD and Ferguson MWJ. 2007. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal Royal Society interface*. 4. 413-437.
- Minguell JJ and Erices A. 2006. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp. Biol. Med.* 231: 39-49.
- Miyazono K, Thyberg J and Heldin CH. 1992. Retention of the Transforming Growth Factor- β 1 Precursor in the Golgi Complex in a Latent Endoglycosidase H-sensitive Form The *Journal of Biological Chemistry* Vol 267. No.8 p 5668-5675

- Moenadjat Y. 2009. Efektifitas dan keamanan aplikasi stem cells pada luka bakar derajat dua dalam Unit Luka Bakar FKUI. "Penelitian Multisenter Sel Punca di Indonesia" yang diselenggarakan oleh Asosiasi Sel Punca Indonesia (ASPI). Jakarta
- Moioli E K, Clark PA, Chen M, Dennis JE, Erickson HP *et al.* 2008. Synergistic Actions of Hematopoietic and Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Vascularizing Bioengineered Tissues. *Plos One* .Volume 3 . Issue 12 p. 1-11
- Morrison SJ and Spradling AC. 2008. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 132, 598–611 Elsevier Inc.
- Morris L M, Klanke C A, Lang S A, Pokall S, Maldonado A R, Vuletin JF, Alaei D and Keswani SG *et al.* 2010. Characterization of endothelial progenitor cells mobilization following cutaneous wounding. *Wound Rep Reg.* 18 383–390
- Morton LF, Peachey A R, and Barnes MJ. 1989. Platelet-reactive sites in collagens type I and type III Evidence for separate adhesion and aggregatory sites. *Biochem. J.* Printed in Great Britain. 258, 157-163
- Nagami M, Tomaki H, Mayuni K, Tomoni A, Michiko T and Ichiro T. 2007. VEGF expression in rat skin incision wound. *Journal Med. Mol. Morphol.* 40. 82-87
- Nagoka A, Yuko K, Yushito H, Minoru H, Kazuhiko T, Douglas AS, Thomas FT and Shinichi S. 2000. Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *American journal of pathology.* 157. 237-247
- Nakayama Y, Kon S, Kurotaki D, Morimoto J, Matsui Y and Uede T. 2010. Blockade of interaction of $\alpha 9$ integrin with its ligands hinders the formation of granulation in cutaneous wound healing. *Laboratory Investigation*: 90, 881–894
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*; 13: 9-22.
- Newman S L and Tucci MA. Regulation of Human Monocyte/Macrophage Function by Extracellular Matrix Adherence of Monocytes to Collagen Matrices Enhances Phagocytosis of Opsonized Bacteria by Activation of Complement Receptors and Enhancement of Fc Receptor Function. *J. Clin. Invest.* Volume 86, September 1990, 703-714

- Orgel P R O, San Antonio J D and Antipova O. 2011. Review Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connective Tissue Research*, 52(1): 2-17
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G *et al.* 2007. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells* ;22:377-384
- Othman N and Kendrick D. 2010. Epidemiology of burn injuries in the East Mediterranean Region: a systematic review. *BMC Public Health*, 10:83
- Parenti A; Morbidelli L; Cui XL; Douglas JG; Hood JD; Granger HJ; Ledda F and Ziche M. 1998. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem*. 13;273(7):4220-6
- Parks WC. 2007. What is the $\alpha 2\beta 1$ integrin doing in the epidermis?. *Journal investigative Dermatology*. 127. 264-266.
- Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak D R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Poerwantoro PD. 2008. Simposium Mini Luka Bakar - Rumah Sakit Pusat Pertamina 26 Januari diakses dari <http://www.lukabakar.net/index.php>.
- Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL and Kang AH. 1987. Transforming Growth Factor- β 1 Increases Steady State Levels of Type I Procollagen and Fibronectin Messenger RNAs Posttranscriptionally in Cultured Human Dermal Fibroblasts *J. Clin. Invest.* Vol 79. p. 1285-1288
- Rangaraj A, Harding K and Leaper D. 2011. Clinical REVIEW Role of collagen in wound management. *Wounds uk*, 2011, Vol 7, No 2 p.54-63.
- Rantam FA, Ferdiansyah, Nasronudin and Purwati. 2009. Stem cell exploration methods of isolation and culture. First edition. Airlangga University Press.
- Rehman J, Li J, Orschell CM and March KL. 2003. Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation*;107:1164-1169;
- Reynold LE, Conti FJ, Lucas M, Groose R, Robinson S, Slone M, Sauderns G *et al.* 2005. Accelerated re-epithelization in β integrin deficient mice is associated with enhanced TGF- β 1 signaling. *Natural medicine*. Volume 11. Number 21 February 167-174.

- RSUP M.Djamil. 2011. Data laporan pasien yang dirawat di RSUP M. Djamil Padang dari tahun 2009 sampai 2010.
- Sabiston C D. 1997. Wound healing : Biologic and Clinical Features. Textbook of Surgery The Biological Basis of Modern Surgical Practice, 15th ed .Philadelphia: WB Saunders Comp; 207 – 219.
- Salvolini E, Lucarini G, Zizzi A, Orciani M, Di Benedetto G and Di Primio R. 2010 Human skin-derived mesenchymal stem cells as a source of VEGF and nitric oxide. Arch Dermatol Res 302:367–374
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D and Hiroshi S. 2008. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Skin Cell Type Repair by Transdifferentiation into Multiple Wounded Skin and Contribute to Wound J Immunol 2008; 180:2581-2587
- Scanlon V and Sanders T. 2007. Essentials of Anatomy and Physiology. Fifth edition. Copyright by F. A. Davis Company Philadelphia.
- Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C *et al.* 2003. Wound bed preparation : a systemic approach to wound management. Wound repair and regeneration 11: 1-28
- Scott EM, Leaper DJ, Clark M. 2001. Effects of warming therapy on pressure ulcers – a randomised trial. AORN Journal 73: 921-938.
- Semon JA, Nagy L H, Llamas C B, Tucker H A, Lee R, H Darwin J. 2010. Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. Prockop Cell Tissue Res 341: 147–158
- Senger DR; Ledbetter SR; Claffey KP; Papadopoulos-Sergiou A; Peruzzi CA and Detmar M. 1996. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. Am J Pathol;149:293–305
- Shuid AN, Mohamad SA and Ahmad AY. 2005. The effects of Carica papaya Linn latex on the healing of burn wound in rats. Jurnal Sains Kesihatan Malaysia 3 (2); 39-47.
- Singer AJ and Clark RAF. 1999. Review Article *Mechanisms of Disease* Cutaneous Wound Healing. The New England Journal of Medicine Volume 341 Number 10 p. 738-746
- Singh V; Devgan L; Bhat S and Milner SM. 2007. Review Article The Pathogenesis of Burn Wound Conversion. Annals of Plastic Surgery Volume 59; 1.

- Smethurst PA, Onley D.J, Jarvis GE, O'Connor MN, and Knight CG *et al.* 2007. Structural Basis for the Platelet-Collagen Interaction The smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet glycoprotein VI contains glycine-proline hydroxyproline triplets. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282, No. 2, pp. 1296–1304.
- Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, Gibran NS and Hocking AM. 2010. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res.* January 1; 316(1): 48–54.
- Srouf EF, Jetmore A, Wolber FM, Plett PA, Abonour R. *et al.* 2001. Homing, cell cycle kinetics and fate of transplanted hematopoietic stem cells. *Leukemia* Nature Publishing Group All rights 15, 1681–1684
- Steffensen B, Hakkinen L and Lariava H. 2001. Proteolytic events of wound – healing coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrin and extracellular matrix molecules. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 12(5): 373-398
- Sun W, Hang L, Hua X, Bing C, Wenxue Z *et al.* 2007. Collagen membranes loaded with collagen binding human PDGF-BB accelerate wound healing in a rabbit dermal ischemic ulcer model. *Journal Growth factors.* October. 25(5). 309 -318
- Suarez SC, Fjällman AZ and Hofer KB. 2006. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 63. 601–615
- Syamsuhidayat R. 1997. Buku ajar ilmu bedah. Edisi Revisi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Takakura N. 2006. Review article Role of hematopoietic lineage cells and accessory components in blood vessel formation. *Journal cancer sci* vol. 97 No. 7. 568-574
- Tarran S, Langlois NE, Dziewulski P, and Szynda T. 2006. Using the inflammatory cell infiltrate to estimate the age of human burn wounds: A review and immunohistochemical study. *Med Sci Law.* Apr;46(2):115-26.
- Taylor G, Lehrer MS, Jenson PJ, Sun TT and Lavker RM. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*: 102: 451–461.
- Tettamanti G, Grimaldi A, Congiu T, Perletti G *et al.* 2005. Collagen reorganization in leech wound healing. *Biol. Cell*; 97,557-568.
- Toole EA. 2001. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clinical and experimental dermatology.* 26. 525-530.

- Traci A, Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA, Dovi JV, Burns A L, Shankar R and DiPietro L.A. 2005. Novel Function for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 on Epidermal Keratinocytes. *American Journal of Pathology*, Vol. 167, No. 5 1257-1266.
- Traversa B and Sussman G. 2001. The role of growth factors, cytokines and proteases in wound management. *Primary Intention* Vol. 9 No. 4 p. 161-167.
- Tredget EB, Demare J, Chandran G, Tredget EE, Yang L and Ghahary A. 2005. Transforming growth factor- β and its effect on reepithelialization of partial-thickness ear wounds in transgenic mice. *Wound Repair and Regeneration*. 13 Issue 1 p. 61-67.
- Tsuji T. 2004. Physiological and pathological role of $\alpha 3 \beta 1$ integrin. *Journal membrane boil*. 200. 115-132 .
- Twardowski T, Fertala A, Orgel JPRO and San Antonio JD. 2007. Type I Collagen and Collagen Mimetics as Angiogenesis Promoting Superpolymers. *Current Pharmaceutical Design*, Bentham Science Publishers Ltd. 13, 3608-3621
- van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrico MM, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E and Niessen FB. 2009. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns*, 35, 15-29.
- Vern AK and Latense BA. 2001. Specimen collection and analysis burn wound. *Methods in molecular medicine wound healing*. Edited by Luisa D and Aime, L.B. Human Press Inc. Totowa, N.J Vol. 78.
- Vogelstein B, Bloom BR, Goodman C S, King PA, and Mckhann GM *et al.* 2003. Stem cells and the future of regenerative medicine / Committee on the Biological and Biomedical Applications of Stem Cell Research. Commission on Life Sciences National Research Council National Academy Press Washington, D.C.
- Voronkina IV, Kalmykova NV, Sharlaimova NA, Kuz'minykh EV, Zinacheva VK, Krylov KM, Blinova M I and Pinaev GP. 2004. Changes in human burn fluid biological activity during normal burn healing. *Tsitologiya*. 2004;46(4):361-75.
- Wang G, Bunnell BA, Painter RG *et al.* 2005. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: Potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102:186 -191.
- Watt F M. 2002. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J*;21:3919-3926.

- Watt FM and Hogan BLM. 2000. Out of eden: stem cells their niches. *Science*; 287; 1427-30
- Werner S and Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Zurich, Switzerland. American Physiological Society.; 83: 835 - 870
- Werr J, Xie X, Hedqvist P, Ruoslahti E and Lindbom L. 1998. β 1 Integrins Are Critically Involved in Neutrophil Locomotion in Extravascular Tissue In Vivo. *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press Volume 187; 12: 2091-2096.
- Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA Dovi JV, Burns AL, Shankar R and DiPietro I A. 2005. Epithelial and Mesenchymal Cell Biology Novel Function for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 on Epidermal Keratinocytes. *American Journal of Pathology*, Vol. 167, No. 5, p 1257-1266.
- Winslow T and Kibuik L. 2001. Stem cells: Scientific progress and future research directions chapter 5. National Institutes of Health Department of Health and Human Services.
- Wolfe M, Pochampally R, Swaney W and Reger RL. 2008. Isolation and Culture of Bone Marrow-Derived Human Multipotent Stromal Cells (hMSCs). *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 449. Edited by D.J. Prockop, D.G. Phinney, and B.A. Bunnell. Humana Press
- Wu Y, Chen L, Scott PG and Tredget EE. 2007. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *STEM CELLS* ;25:2648-2659
- Wu Y, Wang JF, Scott PG and Tredget EE. 2010. Concise review Bone marrow-derived stem cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem cells* 28. 910-915.
- Yang L, Chan T, Demare J, Iwashina T, Ghahary A, Scott PG and Tredget EE. 2001. Healing of Burn Wounds in Transgenic Mice Overexpressing Transforming Growth Factor- β 1 in the Epidermis. *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 6.
- Yang L, Qiu CX, Ludlow A, Ferguson MWJ and Brunner G. 1999. Technical Advance Active Transforming Growth Factor-b in Wound Repair *Determination Using a New Assay. Am J Pathol*; 154:105-111



No : 0051/UN3.1.1/KU/ME/2013
Lampiran : -
Hal : Surat Keterangan

Surabaya, 13 Mei 2013

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan dibawah ini saya:

Nama : Dr. I Ketut Sudiana, M.Si.
Jabatan : Ketua Unit Mikroskop Elektron dan Lab. Medis Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Menerangkan bahwa,

Nama : Gusti Revilla
Pekerjaan : Mahasiswa S3 Biomedik Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Telah melakukan pemrosesan jaringan, pemotongan jaringan, pengecatan, pengamatan preparat dan penilaian ekspresi ketebalan kolagen dan persentase integrin pada preparat imunohistokimia jaringan kulit luka bakar dalam rangka penelitian disertai yang berjudul: PENGARUH *PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC)* DAN *BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC)* TERHADAP SEKRESI TGF- β , VEGF DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I, INTEGRIN $\alpha 2\beta 1$ PADA PENYEMBUHAN LUKA BAKAR TIKUS.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Unit Mikroskop Elektron
dan Lab. Medis Terpadu
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga



Dr. I Ketut Sudiana

NIP. 195507051980031005



No: 141/KEP/FK/2012

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL CLEARANCE

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azazi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:

The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

Efektivitas pemberian stem sel PBMCs dan MSC terhadap kadar faktor pertumbuhan dan ekspresi integrin dan kolagen pada proses penyembuhan luka bakar pada tikus percobaan

Nama Peneliti Utama : Dra. Gusti Revilla, M.Kes
Name of the Investigator

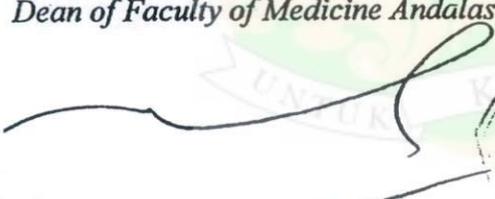
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Name of Institution

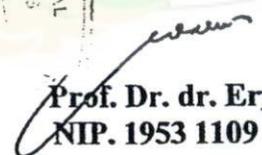
dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.
and recommended the above research protocol.

Padang, 16 Juli 2012

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Faculty of Medicine Andalas University

Ketua
Chairperson


Dr. dr. Masrul, MSc, Sp.GK
NIP. 1956 1226 1987 101 001


Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)
NIP. 1953 1109 1982 112 001



SURAT MELAKUKAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Prof. Dr. Fedik A. Rantam
Jabatan : Kepala Laboratorium Stem Cell ITD Universitas
Airlangga Surabaya

Menerangkan bahwa

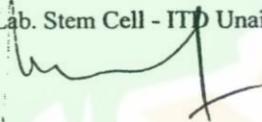
Nama : Gusti Revilla
Pekerjaan : Mahasiswa S3 Biomedik Program Pascasarjana Fakultas
Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Telah melakukan isolasi sel punca PBMC, menggunakan sel punca MSC yang sudah ada, melaksanakan penelitian tentang luka bakar pada tikus dan pemeriksaan kadar faktor pertumbuhan (TGF- β dan VEGF A) dalam rangka penelitian disertasi yang berjudul: *PENGARUH PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL (PBMC) DAN BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELL (BM-MSC) TERHADAP SEKRESI TGF- β , VEGF DAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE I, INTEGRIN $\alpha 2\beta 1$ PADA PENYEMBUHAN LUKA BAKAR TIKUS.*

Demikianlah surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 10 Agustus 2012

Ka Lab. Stem Cell - ITD Unair


Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh
NIP.195910031987011001

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

Lampiran 1 a.

Kadar Faktor pertumbuhan TGF- β serum tikus pada hari ke 3 dan 7 setelah pemeriksaan dengan Elisa

Ulangan	Kadar Faktor Pertumbuhan TGF- β masing kelompok ($\mu\text{g/ml}$)							
	Kontrol		Perlakuan I		Perlakuan II		Perlakuan III	
	3	7	3	7	3	7	3	7
1	164.6	730.6	724.6	961.6	474.6	929.6	825.6	813.6
2	916.6	690.6	810.6	1065.6	630.6	593.6	817.6	762.6
3	734.6	573.6	750.6	944.6	556.6	684.6	898.6	840.6
4	740.6	684.6	998.6	852.6	551.6	576.6	762.6	694.6
5								
Jumlah	2431.4	2679.4	3284.4	3824.4	2215.4	2784.4	3304.4	3121.4
Rata-rata	607.85	669.85	821.1	956.1	553.85	696.1	826.1	780.35

Lampiran 1 b.

Analisis deskriptif dan analisis varian kadar TGF- β 1 pada serum tikus hari ke 3 dan ke 7 setelah luka bakar pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	
TGF- β 3	K	3	797.2667	103.38923	59.69180	540.4336	1054.0998	734.60	916.60
	PI	4	821.1000	123.69182	61.84591	624.2787	1017.9213	724.60	998.60
	PII	4	553.3500	63.72532	31.86266	451.9488	654.7512	474.60	630.60
	PIII	4	826.1000	55.85994	27.92997	737.2144	914.9856	762.60	898.60
7	K	4	669.8500	67.33684	33.66842	562.7021	776.9979	573.60	730.60
	PI	4	956.1000	87.30216	43.65108	817.1828	1095.0172	852.60	1065.60
	PII	4	696.1000	162.72779	81.36389	437.1638	955.0362	576.60	929.60
	PIII	4	777.8500	64.23589	32.11795	675.6364	880.0636	694.60	840.60

Dependent Variable: Respons

	(I) Perlakuan	J) Perlakuan	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
Tukey HSD	1	2	-23.83333	68.63109	.985	-230.3819	182.7152
		3	243.91667(*)	68.63109	.020	37.3681	450.4652
		4	-28.83333	68.63109	.974	-235.3819	177.7152
	2	1	23.83333	68.63109	.985	-182.7152	230.3819
		3	267.75000(*)	63.54004	.007	76.5232	458.9768
		4	-5.00000	63.54004	1.000	-196.2268	186.2268
	3	1	-243.91667(*)	68.63109	.020	-450.4652	-37.3681
		2	-267.75000(*)	63.54004	.007	-458.9768	-76.5232
		4	-272.75000(*)	63.54004	.006	-463.9768	-81.5232
	4	1	28.83333	68.63109	.974	-177.7152	235.3819
		2	5.00000	63.54004	1.000	-186.2268	196.2268
		3	272.75000(*)	63.54004	.006	81.5232	463.9768
7	1	2	-286.25000(*)	73.11164	.010	-503.3112	-69.1888
		3	-26.25000	73.11164	.983	-243.3112	190.8112
		4	-108.00000	73.11164	.480	-325.0612	109.0612
	2	1	286.25000(*)	73.11164	.010	69.1888	503.3112
		3	260.00000(*)	73.11164	.018	42.9388	477.0612
		4	178.25000	73.11164	.122	-38.8112	395.3112
	3	1	26.25000	73.11164	.983	-190.8112	243.3112
		2	-260.00000(*)	73.11164	.018	-477.0612	-42.9388
		4	-81.75000	73.11164	.686	-298.8112	135.3112
	4	1	108.00000	73.11164	.480	-109.0612	325.0612
		2	-178.25000	73.11164	.122	-395.3112	38.8112

* The mean difference is significant at the .05 level.



Respons
Hari 3

	Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Tukey HSD(a)	1	4	669.8500	
	3	4	696.1000	
	4	4	777.8500	777.8500
	2	4		956.1000
	Sig.		.480	.122

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

hari 7

	Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	1
Tukey HSD(a)	1	4	669.8500		
	3	4	696.1000		
	4	4	777.8500	777.8500	
	2	4		956.1000	
	Sig.		.480	.122	

Lampiran 2 a.

Kadar Faktor pertumbuhan VEGF serum tikus pada hari ke 3 dan 7 setelah pemeriksaan dengan Elisa

Ulangan	Kadar Faktor Pertumbuhan VEGF pada hari ke 3 dan 7 dari masing-masing kelompok (pg/ml)							
	Kontrol		Perlakuan I		Perlakuan II		Perlakuan III	
	3	7	3	7	3	7	3	7
1	22.25	26.00	66.00	108.50	11.00	32.25	7.25	9.00
2	37.25	54.00	124.00	153.50	12.25	77.25	13.5	5.25
3	37.25	228.50	66.00	23.50	11.00	9.75	78.5	49.75
4	51.00	43.50	94.75	58.50	24.75	9.00	51.00	24.75
5	119.75	519.75	84.75	124.75	5.25	14.75	79.75	67.25
6	102.50	328.50	59.75	74.75	23.50	18.50	7.75	6.00
Jumlah	370.00	1200.25	495.25	543.50	77.25	143.50	223.25	133.50
Rata-rata	61.67	200.04	82.54	90.58	12.88	23.92	37.21	22.25

Lampiran 2 b.

Analisis deskriptif dan analisis varian kadar VEGF pada serum tikus hari ke 3 dan ke 7 setelah luka bakar pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
VEGF K	6	61.6667	39.75131	16.22840	19.9502	103.3831	22.25	119.75
3 PI	6	82.5417	24.24635	9.89853	57.0967	107.9866	59.75	124.00
PII	6	12.8750	10.86134	4.43412	1.4767	24.2733	-5.25	24.75
PIII	6	37.0417	37.90957	15.47652	-2.7420	76.8253	-7.75	79.75
7 K	6	200.0417	197.81244	80.75659	-7.5498	407.6331	26.00	519.75
PI	6	90.5833	47.38583	19.34518	40.8550	140.3117	23.50	153.50
PII	6	23.9167	29.36480	11.98813	-6.8998	54.7331	-9.00	77.25
PIII	6	22.2500	30.93340	12.62851	-10.2126	54.7126	-9.00	67.25

Dependent Variable: Respons

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
LSD	1	2	-20.87500	17.61428	.250	-57.6178	15.8678
		3	48.79167(*)	17.61428	.012	12.0489	85.5344
		4	24.62500	17.61428	.177	-12.1178	61.3678
	2	1	20.87500	17.61428	.250	-15.8678	57.6178
		3	69.66667(*)	17.61428	.001	32.9239	106.4094
		4	45.50000(*)	17.61428	.018	8.7572	82.2428
	3	1	-48.79167(*)	17.61428	.012	-85.5344	-12.0489
		2	-69.66667(*)	17.61428	.001	-106.4094	-32.9239
		4	-24.16667	17.61428	.185	-60.9094	12.5761
	4	1	-24.62500	17.61428	.177	-61.3678	12.1178
		2	-45.50000(*)	17.61428	.018	-82.2428	-8.7572
		3	24.16667	17.61428	.185	-12.5761	60.9094

Tukey	1	2	109.45833	59.99607	.292	-58.4668	277.3835
		3	176.12500(*)	59.99607	.038	8.1998	344.0502
		4	177.79167(*)	59.99607	.036	9.8665	345.7168
	2	1	-109.45833	59.99607	.292	-277.3835	58.4668
		3	66.66667	59.99607	.687	-101.2585	234.5918
		4	68.33333	59.99607	.671	-99.5918	236.2585
	3	1	176.12500(*)	59.99607	.038	-344.0502	-8.1998
		2	-66.66667	59.99607	.687	-234.5918	101.2585
		4	1.66667	59.99607	1.000	-166.2585	169.5918
	4	1	177.79167(*)	59.99607	.036	-345.7168	-9.8665
		2	-68.33333	59.99607	.671	-236.2585	99.5918
			-1.66667	59.99607	1.000	-169.5918	166.2585

* The mean difference is significant at the .05 level.

Respos

	Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
			1	3
Tukey HSD(a)	3	6	12.8750	
	4	6	37.0417	37.0417
	1	6	61.6667	61.6667
	2	6		82.5417
	Sig.		.053	.077

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Respos

	Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
			2	1
Tukey HSD(a)	3	6	22.2500	
	4	6	23.9167	
	1	6	90.5833	90.5833
	2	6		200.0417
	Sig.		.671	.292

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 3 a

Ketebalan rata-rata kolagen tipe I (μ) pada jaringan kulit luka luka bakar dari masing-masing kelompok dengan pengamatan imunohistokimia

No	Ketebalan rata-rata kolagen tipe I (μ) pada jaringan kulit luka luka bakar dari masing-masing kelompok			
	Kontrol	Perlakuan I	Perlakuan II	Perlakuan III
1	0.53	0.96	1.08	1.12
2	0.50	0.84	0.88	1.24
3	0.49	0.88	1.15	1.47
4	0.46	0.92	0.96	1.26
5	0.38	0.70	0.96	1.96
6	0.49	-	0.83	1.32
Rata-rata	0.475	0.86	0.977	1.399

Lampiran 3 b.

Analisis deskriptif dan analisis varian ekspresi kolagen I pada jaringan kulit tikus hari ke 14 setelah luka bakar pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum		Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
K	6	0.4750	0.05167	0.02110	0.4208	.5292	.38	.53		
PI	6	0.8600	0.10000	0.04472	0.7358	.9842	.70	.96		
PII	6	0.9767	0.12011	0.04904	0.8506	1.1027	.83	1.15		
PIII	6	1.3996	0.29945	0.12225	1.0807	1.0932	1.12	1.96		

ANOVA

VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,577	3	,859	28,443	,000
Within Groups	,574	19	,030		
Total	3,151	22			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00001

LSD

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K	P.1	-,38500*	,10523	,002	-,6053	-,1647
	P.2	-,50167*	,10034	,000	-,7117	-,2917
	P.3	-,92000*	,10034	,000	-1,1300	-,7100
P.1	K	,38500*	,10523	,002	,1647	,6053
	P.2	-,11667	,10523	,281	-,3369	,1036
	P.3	-,53500*	,10523	,000	-,7553	-,3147
P.2	K	,50167*	,10034	,000	,2917	,7117
	P.1	,11667	,10523	,281	-,1036	,3369
	P.3	-,41833*	,10034	,001	-,6283	-,2083
P.3	K	,92000*	,10034	,000	,7100	1,1300
	P.1	,53500*	,10523	,000	,3147	,7553
	P.2	,41833*	,10034	,001	,2083	,6283

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 4 a

Jumlah sel yang memberikan reaksi positif terhadap ekspresi anti integrin di bagi dengan jumlah total sel/ $15625\mu^2$ (%) dari masing-masing perlakuan dengan pengamatan imunohistokimia

No	Jumlah sel yang memberikan reaksi positif terhadap ekspresi integrin (%) dari masing-masing perlakuan			
	Kontrol	Perlakuan I	Perlakuan II	Perlakuan III
1	2.16	3.99	3.33	3.60
2	1.97	2.62	2.12	3.76
3	2.82	2.12	3.55	3.22
4	2.18	3.81	3.10	4.88
5	2.24	2.32	2.57	2.16
6	2.67	-	2.96	2.16
Rata-rata	2.34	2.972	2.938	3.297

Lampiran 4 b.

Analisis deskriptif dan analisis varian ekspresi integrin pada jaringan kulit tikus hari ke 14 setelah luka bakar pada kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III

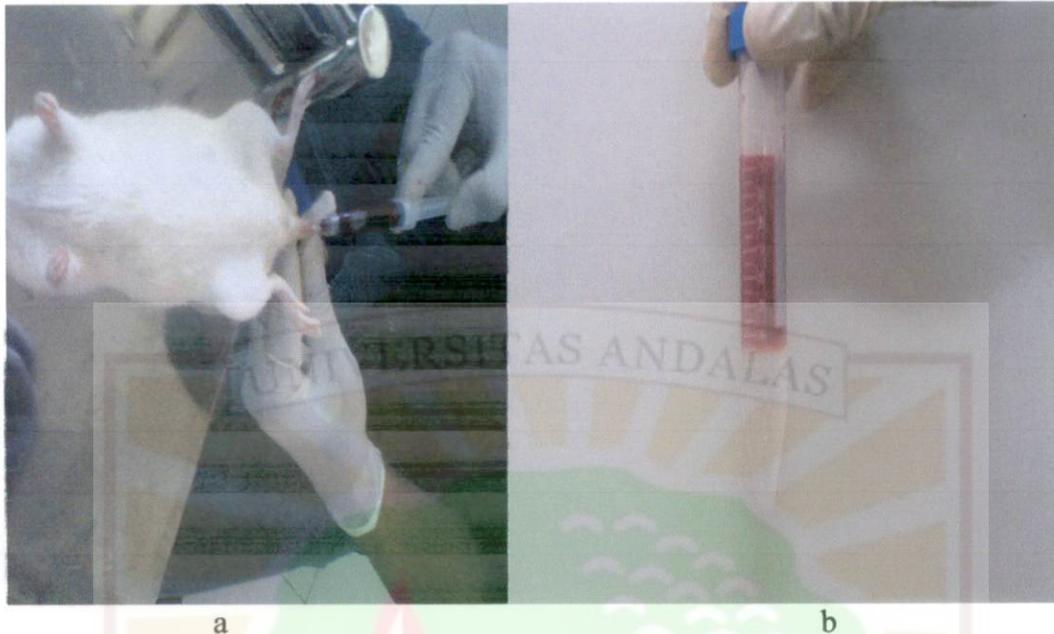
Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K	6	2.3400	0.3299	0.1347	1.9938	2.6862	1.97	2.82
PI	6	2.9720	0.8679	0.3882	1.8943	4.0497	2.12	3.99
PII	6	2.9383	0.5214	0.2129	2.3911	3.4855	2.12	3.55
PIII	6	3.2967	1.0395	0.4244	2.2057	4.3876	1.97	4.88

ANOVA

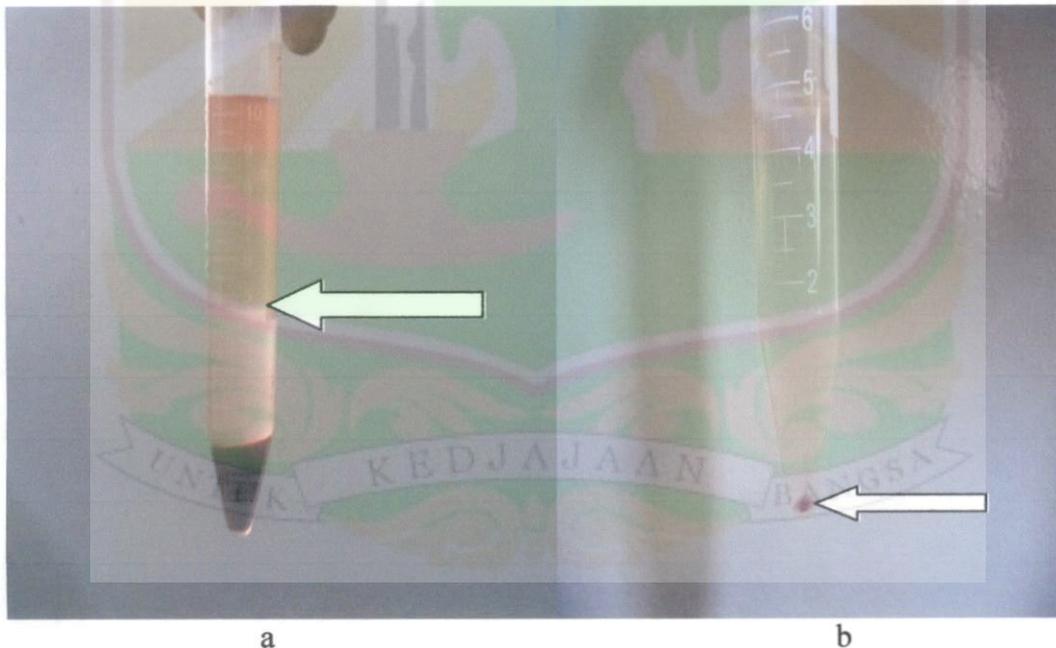
VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,854	3	,951	1,751	,191
Within Groups	10,321	19	,543		
Total	13,174	22			

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA



Gambar 1. Pengambilan darah lewat ekor untuk isolasi PBMC (a) dan darah yang didapatkan dimasukkan ketabung sentrifus yang sudah berisi ficol histofaque (b)



Gambar 2 Darah yang telah disentrifus terlihat ada beberapa lapisan dan bagian PBMC berada diatas ficol histofaque (tanda panah gambar 3a) dan diresuspensi terlihat pelet PBMC di dasar tabung sentrifus (tanda panah gambar 3 b)



Gambar 3. Pelet yang sudah didapatkan ditambahkan PBS kemudian dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan hematositometer



Gambar 4. MSC dalam kondisi monolayer



Gambar 5. Persiapan alat dan Tempat kerja yang sudah dibersihkan dengan desinfektan



Gambar 6. Tikus yang sudah dianestesi kemudian dicukur bulu di punggung yang sebelumnya sudah diberi sapron



Gambar 7. Tikus yang sudah dicukur bulu di punggung kemudian diberi betadin dan NaCl fisiologis



Gambar 8. Tikus dicap dengan plat diameter 15 mm yang sudah dipanaskan dalam air mendidih untuk mendapatkan luka bakar *full thickness*



Gambar 9. Punggung Tikus yang sudah selesai dicap



Gambar 10. Tikus yang diinjeksi sesuai dengan kelompoknya



Gambar 15. Koleksi darah yang didapatkan disentrifus untuk mendapatkan serum



Gambar 16. Pada hari ke 14 setelah luka bakar jaringan luka bakar kulit diambil untuk pembuatan preparat imunohistokimia ekspresi kolagen dan integrin .



Gambar 17 Persiapan untuk gukuran kadar faktor pertumbuhan TGF- β dan VEGF



Gambar 18. Pelaksanaan dan langkah kerja dari pengukuran Kadar Faktor pertumbuhan TGF- β dan VEGF serum tikus pada hari ke 3 dan 7



Gambar 19. Perbaikan Luka bakar pada tikus pada Hari ke 7 dari masing-masing kelompok a kelompok kontrol, b kelompok perlakuan I, c perlakuan II, dan d perlakuan III.



Gambar 20. Perbaikan luka pada tikus pada hari ke 14 setelah luka bakar terlihat dari masing-masing kelompok a kelompok kontrol, b kelompok perlakuan I, c perlakuan II, dan d perlakuan III.