



UNIVERSITAS INDONESIA

**Efek medium terkondisi (*conditioned medium*) sel punca adiposa
pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague
Dawley**

TESIS

**TWIDY TARCISIA
1306362806**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
MEI 2016**



UNIVERSITAS INDONESIA

**Efek medium terkondisi (*conditioned medium*) sel punca adiposa
pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague
Dawley**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Biomedik**

**TWIDY TARCISIA
1306362806**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN HISTOLOGI
JAKARTA
MEI 2016**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Twidy Tarcisia

NPM : 1306362806

Tanda Tangan :



Tanggal : 28 Mei 2016

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama :

: Twidy Tarcisia

NPM :

: 1306362806

Program Studi :

: Magister Ilmu Biomedik

Judul Tesis :

: Efek medium terkondisi (*conditioned medium*) sel punca adiposa pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley

Tesis berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI


Presiding I :

Prof. Dr. Darmayanti, M. Biomed., Sp.PA

()

Presiding II :

Prof. Dr. D. Antariato, M.Biomed., Ph.D

()

Presiding III :

Prof. Dr. Janne Adiwinata P., M.S., Ph.D

()

Presiding IV :

Prof. Dr. Wafa Moenadjat, Sp.BP(K)

()

Presiding V :

Prof. Dr. Novi Silvia Hardiany, M.Biomed.

()

Tempat Uji : Jakarta

Tanggal : 28 April 2016

Revisi/Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Revisi/Presiding dr. Septelia Inawati Wanandi

()

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul “Efek medium terkonsumsi (*conditioned medium*) sel punca adiposa pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley”. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Dr. Ratna Sitompul, Sp.M (K) dan Prof. dr. Pratiwi Pudjilestari Sudarmono, Ph.D.,Sp.MK (K) selaku Dekan dan Wakil Dekan FKUI atas kesempatan yang telah diberikan untuk mengikuti perkuliahan di Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI.
2. Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI, atas kesempatan dan arahan yang telah diberikan guna kelancaran dalam menempuh pendidikan di program studi ini.
3. dr. Lia Damayanti, M. Biomed., Sp.PA. dan dr. Radiana D. Antarianto, M.Biomed., Ph.D. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing, memberikan dukungan, semangat dan saran selama pengerjaan penelitian tesis ini. Terima kasih untuk setiap diskusi dan *sharing* pengetahuan yang akan berguna untuk pengembangan keilmuan penulis kedepannya.
4. Prof. dr. Jeanne Adiwinata P., M.S., Ph.D., Dr. dr. Yefta Moenadjat, Sp.BP(K). dan Dr. dr. Novi Silvia Hardiany, M.Biomed. selaku dewan penguji yang telah memberikan sarana, arahan, penilaian dan saran yang membangun dalam upaya pelaksanaan dan perbaikan tesis ini.

5. dr. Marcella E. Rumawas, M.S., Ph.D. atas bimbingan analisis data statistik selama pengerjaan penelitian tesis ini. Terima kasih untuk setiap diskusi dan *sharing* pengetahuan yang akan berguna untuk pengembangan keilmuan penulis kedepannya.
6. Segenap dosen dan karyawan Departemen Histologi FKUI atas bimbingan dan bantuan selama mengikuti perkuliahan di kekhususan Histologi.
7. Segenap kepala dan staf Laboratorium Histologi dan Litbangkes atas bantuan, diskusi, serta penyediaan sarana dan prasarana yang dibutuhkan untuk mempermudah pengerjaan penelitian tesis ini.
8. Yayasan dan Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, atas kesempatan yang telah diberikan untuk mengikuti program tugas belajar di Program studi Magister Ilmu Biomedik FKUI.
9. Orang tua dan keluarga besar atas doa, dukungan moral dan material yang tiada hentinya selama ini.
10. Rekan- rekan mahasiswa program studi Ilmu Biomedik FKUI angkatan masuk 2013/2014-1 atas dukungan dan kebersamaan yang telah dilewati selama ini.

Banyak hal yang perlu diperbaiki dalam penyusunan tesis ini karena penulis sadari masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu kritik membangun dan saran sangat penulis harapkan. Semoga tesis ini dapat memberikan sumbangsih terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 28 Mei 2016

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Twidy Tarcisia

NPM : 1306362806

Program Studi : Magister Ilmu Biomedik

Departemen : Histologi

Fakultas : Kedokteran

Jenis karya : Tesis

dimana pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Efek medium terkondisi (conditioned medium) sel punca adiposa pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 28 Mei 2016

Yang menyatakan,



(Twidy Tarcisia)

ABSTRAK

Nama : Twidy Tarcisia
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul : Efek medium terkonsumsi (*conditioned medium*) sel punca adiposa pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley

Penyembuhan luka adalah peristiwa kompleks yang meliputi kemotaksis, angiogenesis, pembelahan sel, sintesis matriks ekstraseluler, pembentukan dan *remodeling* jaringan parut. Angiogenesis, densitas kolagen, kontraksi luka, epitelisasi dan luas area luka adalah beberapa parameter yang dapat digunakan untuk menilai baiknya penyembuhan luka. Pemberian ADSC-CM pada penelitian terdahulu terbukti meningkatkan proses penyembuhan luka melalui mekanisme parakrin ADSC. Penelitian ini menilai efek pemberian ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoxia selama tiga hari terhadap angiogenesis, kontraksi luka, epitelisasi dan kualitas penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley. Adanya konsentrasi *growth factor* seperti VEGF dan EGF dinilai melalui pemeriksaan ELISA. Efek angiogenesis, densitas kolagen, kontraksi luka, epitelisasi dan luas area luka dinilai dengan pemeriksaan histologi menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin dan Masson's Trichome. Dua puluh sembilan tikus dibalurkan ADSC-CM pada bagian punggung (*full thickness wound*) dan dinilai gambaran histologinya pada hari ke-3, 7, 14, 21 dan 28. Konsentrasi VEGF dan EGF ditemukan dalam ADSC-CM dengan $5052,698 \pm 0,31$ pg/mL dan $0,233 \pm 0,08$ pg/mL. Gambaran histologi pada parameter angiogenesis, densitas kolagen, kontraksi luka, epitelisasi dan luas area luka menunjukkan perbedaan tidak bermakna antara kelompok luka yang dibalurkan ADSC-CM dan kelompok kontrol namun secara klinis dan epidemiologis pembaluran ADSC-CM meningkatkan proses penyembuhan luka.

Kata kunci : penyembuhan luka, ADSC-CM, angiogenesis, epitelisasi, kontraksi luka, densitas kolagen, luas area luka

ABSTRACT

Name : Twidy Tarcisia
Study Program : Master Program in Biomedical Sciences
Title : Adipose stem cell derived conditioned medium effect on proliferation phase of wound healing in Sprague Dawley rat

Wound healing is a complex event that consist chemotaxis, angiogenesis, proliferation, synthesis of matrix extracellular, formation and remodeling scar tissue. Angiogenesis, collagen density, wound contraction, epithelialization and wound area is a several parameter to analyze wound healing. Previous studies have shown that ADSC-CM are able to accelerate wound healing due to paracrine effect. This study investigate the effect of monolayer ADSC-CM on angiogenesis, collagen density, wound contraction, epithelialization and wound area in a rat full thickness wound. Consentration of growth factor such as EGF and VEGF were assessed with ELISA examination. Angiogenesis, collagen density, wound contraction, epithelialization and wound area were analyzed histologically with Hematoxylin-Eosin and Masson's Trichome staining. Twenty nine rats were administered topically with ADSC-CM. Histological examination was measured on day 3, 7, 14, 21 and 28. Amount of VEGF and EGF is 5052,698 pg/mL dan 0,233 pg/mL. Histology examination angiogenesis, collagen density, wound contraction, epithelialization and wound area show there is no significant difference between ADSC-CM group and control group but meaningful difference to accelerate wound healing.

Key word: wound healing, ADSC-CM angiogenesis, collagen density, wound contraction, epithelialization, wound area.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR GRAFIK	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Perumusan masalah	3
1.3 Hipotesis	3
1.4 Tujuan penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.5 Manfaat penelitian	4
1.6 Kerangka teori	5
1.7 Kerangka konsep	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Histologi kulit	7
2.1.1 Epidermis	7
2.1.2 Dermis	8
2.1.2.1 Lapisan papilaris dermis	8
2.1.2.2 Lapisan retikularis dermis	9
2.2 Penyembuhan luka	10
2.2.1 Tahap hemostasis	10
2.2.2 Tahap inflamasi	10
2.2.3 Tahap proliferasi	11
2.2.4 Tahap remodeling	13
2.3 Peran <i>vascular endothelial growth factor</i> pada penyembuhan luka	14
2.4 Peran <i>epidermal growth factor</i> pada penyembuhan luka	15
2.5 Peran sel punca pada penyembuhan luka	16
2.5.1 Peran <i>adipose-derived stem cell</i> dalam penyembuhan luka	17
2.5.2 Peran <i>adipose-derived stem cell conditioned medium</i> dalam penyembuhan luka	18

3. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Desain penelitian	20
3.2 Waktu dan tempat Penelitian	20
3.3 Sampel penelitian	20
3.4 Alat dan bahan penelitian	20
3.5 Prosedur penelitian	21
3.5.1 Persiapan <i>adipose-derived stem cell conditioned medium</i>	21
3.5.2 Prosedur ELISA <i>vascular endothelial growth factor</i>	21
3.5.3 Prosedur ELISA <i>epidermal growth factor</i>	22
3.5.4 Perlukaan kulit tikus	23
3.5.5 Prosesing jaringan	24
3.5.6 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin	24
3.5.7 Pewarnaan Masson's Trichome	25
3.6 Analisis data	26
3.6.1 Densitas pembuluh darah	26
3.6.2 <i>Wound contraction index</i>	26
3.6.3 Epitelisasi	28
3.6.2.1 Ratio epitelisasi	28
3.6.2.2 Jarak epitelisasi	28
3.6.4 Kualitas epitelisasi	29
3.6.4.1 Jumlah lapisan epitel	29
3.6.4.2 Densitas kolagen	30
3.6.4.3 Luas area luka	31
3.7 Analisis statistik	31
3.8 Alur penelitian	32
4 HASIL	33
4.1 ELISA	33
4.1.1 Konsentrasi <i>vascular endothelial growth factor</i>	33
4.1.2 Konsentrasi <i>epidermal growth factor</i>	33
4.2 Angiogenesis	34
4.3 Kontraksi luka	35
4.4 Epitelisasi.....	37
4.5 Kualitas penyembuhan luka	39
4.5.1 Jumlah lapisan epitel	39
4.5.2 Densitas kolagen	40
4.5.3 Luas area luka	41
5. PEMBAHASAN	42
6. KESIMPULAN DAN SARAN	52
6.1 Kesimpulan	52
6.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	60
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	
DRAFT ARTIKEL UNTUK PUBLIKASI	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1	Gambar <i>dillution series</i> untuk larutan standar ELISA VEGF	22
Gambar 3.2	Gambar <i>dillution series</i> untuk larutan standar ELISA EGF	23
Gambar 3.3	Skema tikus dengan empat luka sayat pada area punggung	24
Gambar 3.4	Gambar <i>Image Raster 3</i> untuk menghitung angiogenesis	26
Gambar 3.5	Skema celah luka untuk mengukur kontraksi luka	27
Gambar 3.6	<i>Image Raster 3</i> untuk menghitung kontraksi luka	28
Gambar 3.7	<i>Image Raster3</i> untuk menghitung epitelisasi	29
Gambar 3.8	<i>Image Raster3</i> untuk menghitung jumlah epitel	30
Gambar 3.9	<i>Image Raster3</i> untuk menghitung densitas kolagen	30
Gambar 3.10	<i>Image Raster3</i> untuk menghitung luas area luka	31
Gambar 4.1	Densitas pembuluh darah dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 400 kali)	34
Gambar 4.2	WCI hari ke-3 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali)	35
Gambar 4.3	WCI hari ke-7 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali)	36
Gambar 4.4	Epitelisasi hari ke-3 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali)	37
Gambar 4.5	Epitelisasi hari ke-7 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40x)	37
Gambar 4.6	Jumlah lapisan epitel dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 400 kali)	39
Gambar 4.7	Densitas kolagen dengan pewarnaan Masson's Trichome (pembesaran lensa onjektif 400 kali).....	40
Gambar 4.8	Luas area luka dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali).....	41

DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1 Grafik angiogenesis sediaan luka kulit tikus.....	35
Grafik 4.2 Grafik rasio epitelisasi sediaan luka kulit tikus.....	36
Grafik 4.3 Grafik jarak epitelisasi sediaan luka kulit tikus.....	38
Grafik 4.4 Grafik kontraksi luka pada sediaan luka kulit tikus.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Tabel <i>range</i> jumlah lapisan epitel pada epidermis sediaan luka kulit tikus	39
Tabel 4.2 Tabel <i>range</i> densitas kolagen sediaan luka kulit tikus.....	40
Tabel 4.3 Tabel luas area luka sediaan luka kulit tikus.....	41

DAFTAR SINGKATAN

AAPE	<i>Advanced Adipose-derived stem cell Protein Extract</i>
ADSC	<i>Adipose-Derived Stem Cell</i>
ADSC-CM	<i>Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Medium</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
C3a	<i>Convertase complement 3a</i>
C5a	<i>Convertase complement 5a</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
HE	<i>Hematoksilin-Eosin</i>
HRP-Streptavidin	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor-Binding Protein</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IGF	<i>Insulin like Growth Factor</i>
KGF	<i>keratinocyte Growth Factor</i>
MCSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MHC1	<i>Major Histocompatibility Complex 1</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGF1	<i>Prostaglandin F1</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	60
Lampiran 2	61
Lampiran 3	62
Lampiran 4	63
Lampiran 5	64
Lampiran 6	65
Lampiran 7	66
Lampiran 8	67
Lampiran 9	68
Lampiran 10	69
Lampiran 11	70
Lampiran 12	72
Lampiran 13	74
Lampiran 14	75
Lampiran 15	76
Lampiran 16	77
Lampiran 17	78
Lampiran 18	79
Lampiran 19	80
Lampiran 20	81

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Penyembuhan luka adalah rangkaian peristiwa kompleks yang meliputi kemotaksis, angiogenesis, pembelahan sel, sintesis matriks ekstrasel, pembentukan dan *remodeling* jaringan parut.¹ Rangkaian peristiwa ini melibatkan koordinasi berbagai sel seperti keratinosit, fibroblas, sel endotel, makrofag dan trombosit yang diregulasi oleh berbagai *growth factors*, sitokin dan *chemokines*.² Penyembuhan luka terbagi dalam empat tahap yang tumpang tindih, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling*. Gangguan atau disregulasi pada sitokin, *growth factors*, selular dan matriks ekstrasel dapat menghambat keberhasilan penyembuhan luka.¹

Vaskularisasi yang baik dapat menjamin terpenuhinya suplai nutrisi dan oksigen pada sel dan jaringan area luka sehingga proses penyembuhan luka berjalan optimal. Gangguan pada vaskularisasi luka merupakan salah satu ciri luka kronis.³ Angiogenesis sebagai mekanisme revaskularisasi dibutuhkan untuk mencegah terjadinya luka kronis. Angiogenesis terinisiasi pada tahap hemostasis oleh berbagai *growth factors* seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *platelet derived growth factor* (PDGF).⁴ VEGF adalah mediator utama angiogenesis karena peranannya dalam menstimulasi migrasi sel endotel dan efek mitogen pada sel endotel.⁵

Kolagen adalah komponen penting dalam proses penyembuhan luka. Kolagen disintesis oleh fibroblas dan berperan dalam memberi kekuatan dan integritas pada jaringan luka.⁴ Peranan kolagen ini dapat dinilai dalam kemampuan luka berkontraksi. Kontraksi luka terjadi akibat tarikan antara myofibroblas dan serat kolagen. Maka dari itu kekuatan kontraksi luka berbanding lurus dengan jumlah myofibroblas dan serat kolagen.⁵ *Growth factors* yang berperan dalam kontraksi luka adalah TGF- β dan PDGF.⁶

Epitelisasi adalah proses regenerasi epidermis pada area luka yang distimulasi oleh berbagai *growth factors* seperti *epidermal growth factor* (EGF), PDGF, FGF-2 dan *transforming growth factor β* (TGF- β). Proses ini dimulai dengan pelepasan

kontak antar sel maupun kontak sel dengan matriks ekstrasel sehingga terjadi migrasi sel epitel ke area luka. Sel epitel kemudian akan mengalami proliferasi dan diferensiasi membentuk lapisan epidermis sehingga didapat struktur epidermis seperti semula.⁶

Terapi sel punca pada beberapa dekade terakhir telah diuji dalam terapi berbagai penyakit. Sel punca memiliki kemampuan untuk meregenerasi diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Sel punca dapat ditemukan di berbagai jaringan dan berperan dalam proses regenerasi jaringan.⁷ Peranan sel punca dalam regenerasi jaringan meningkatkan minat peneliti untuk mengembangkan kegunaan sel punca dalam terapi berbagai penyakit, termasuk penyembuhan luka.

Adipose derived stem cell (ADSC) atau dikenal dengan sel punca adiposa berpotensi menjadi sumber sel punca mesenkim untuk masa depan terapi berbasis sel. Hal ini disebabkan ADSC memiliki beberapa keuntungan seperti mudah diisolasi, mudah dikultur dan bersifat multipoten.⁸ Pada awalnya ADSC dikenal sebagai sel *processed lipoaspirate* (PLA) dan berasal dari lipoaspirasi manusia.⁹ Kesamaan kemampuan diferensiasi dan *surface protein marker* antara PLA dan sel punca mesenkim secara *in vitro* menunjukkan bahwa PLA memenuhi karakteristik sebagai sel punca dan untuk selanjutnya dikenal sebagai ADSC.¹⁰

Penggunaan *conditioned medium* sel punca sebagai terapi telah diteliti baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan hasil yang memuaskan. Penggunaan *conditioned medium* sel punca lebih menjanjikan daripada sel punca sendiri karena kemudahan produksi, pengemasan dan distribusi.¹¹ Telah dilakukan penelitian untuk mengelaborasi efek *conditioned medium* kultur tali pusat (HuSC-CM) dan sel punca adiposa pada penyembuhan luka.^{12,13} ADSC melepaskan sejumlah sekretom ke medianya yaitu sitokin dan *growth factors* seperti EGF, FGF 4, *Insulin-like growth factor-binding protein 1* (IGFBP 1), IGFBP 2, IGFBP 3, IGFBP 4, IGFBP 5, *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *Insulin like growth factor III* (IGF-III), *Macrophage colony stimulating factor* (MCSF), PDGF, TGF- β dan VEGF.¹⁴ Dengan demikian, *adipose-derived stem cell conditioned medium* (ADSC-CM) pun diperkirakan masih mengandung sejumlah sitokin dan *growth factor* yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan proses penyembuhan. Penelitian terdahulu

membuktikan pemberian ADSC-CM dapat meningkatkan migrasi sel keratinosit, fibroblas dan endotel secara *in vitro*. Peningkatan migrasi sel tersebut diharapkan dapat meningkatkan angiogenesis, epitelisasi dan fibroplasia penyembuhan luka melalui peran parakrin sekretom ADSC.^{15,16} Pada tahun 2013, Zhou dkk melakukan uji klinik pada pasien mengenai efek media ADSC pada penyembuhan luka setelah perlukaan dengan laser karbondioksida. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan penyembuhan luka dan penurunan eritema pasca laser karbondioksida. Hal ini menunjukkan bahwa ADSC-CM dapat meningkatkan proses penyembuhan luka.¹³

Kandungan dan peranan ADSC-CM yang didapat dari inkubasi normoxia selama tiga hari dalam α -MEM dan 10% *platelet rich plasma* (PRP) terhadap proses angiogenesis, kualitas kolagen dan epitelisasi masih sedikit diketahui, Karena itu peneliti ingin menganalisis kadar *growth factors* (VEGF dan EGF) dalam ADSC-CM dan gambaran histologi ketiga proses tersebut (angiogenesis, kualitas kolagen, dan epitelisasi) pasca luka insisi kulit hewan coba tikus Sprague Dawley.

1.2 Perumusan masalah

Efek ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari terhadap tahap proliferasi penyembuhan luka kulit secara *in vivo* masih belum jelas dan belum banyak diteliti.

1.3 Hipotesis

Aplikasi ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari meningkatkan kuantitas dan kualitas tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley.

1.4 Tujuan penelitian

Tujuan umum:

Diperoleh hasil analisis efek ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari pada kuantitas dan kualitas tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley.

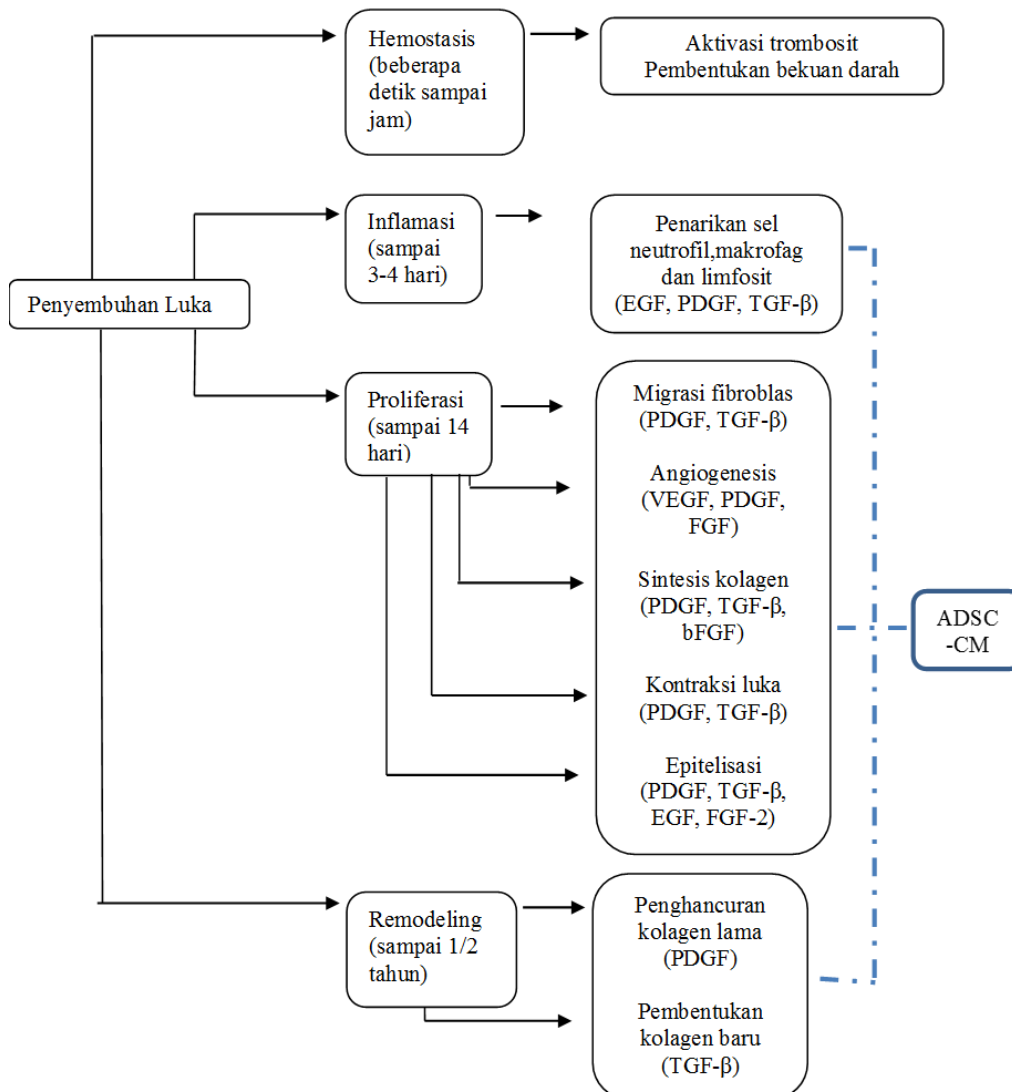
Tujuan khusus:

1. Diperoleh hasil analisis konsentrasi VEGF dan EGF dalam ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari.
2. Diperoleh hasil perbandingan densitas pembuluh darah antara luka pembaluran ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari dengan luka pembaluran medium kultur, luka pembaluran medium basal dan luka tanpa pembaluran pada luka kulit tikus Sprague Dawley.
3. Diperoleh hasil perbandingan rasio epitelisasi dan jarak epitelisasi antara luka pembaluran ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari dengan luka pembaluran medium kultur, luka pembaluran medium basal dan luka tanpa pembaluran pada luka kulit tikus Sprague Dawley.
4. Diperoleh hasil perbandingan *wound contraction indeks* (WCI) antara luka pembaluran ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari dengan luka pembaluran medium kultur, luka pembaluran medium basal dan luka tanpa pembaluran pada luka kulit tikus Sprague Dawley.
5. Diperoleh hasil perbandingan jumlah lapisan epitel pada epidermis, densitas kolagen dan luas area luka antara luka pembaluran ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari dengan luka pembaluran medium kultur, luka pembaluran medium basal dan luka tanpa pembaluran pada luka kulit tikus Sprague Dawley.

1.5 Manfaat penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat membuka wawasan mengenai efek parakrin sel punca adiposa terhadap penyembuhan luka. Penelitian ini bersama dengan penelitian tentang *conditioned medium* lainnya dapat digunakan sebagai dasar penggunaan ADSC-CM dan *conditioned medium* lainnya terutama di bidang penyembuhan luka.

1.6 Kerangka teori



Keterangan

— . . — : dipengaruhi

EGF : *epidermal growth factor*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

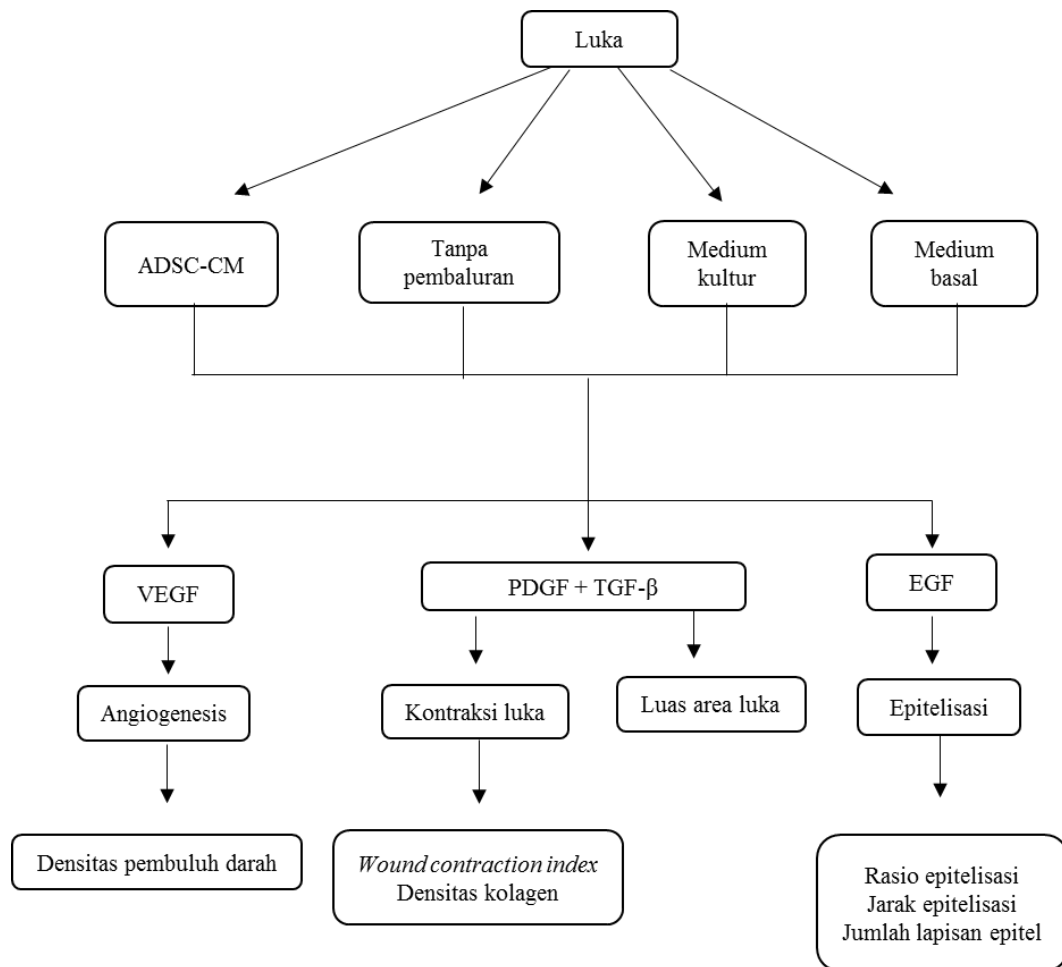
PDGF : *platelet derived growth factor*

TGF-β : *transforming growth factor β*

bFGF : *basic fibroblast growth factor*

FGF : *fibroblast growth factor*

1.7 Kerangka konsep



Keterangan

EGF : *epidermal growth factor*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

PDGF : *platelet derived growth factor*

TGF- β : *transforming growth factor β*

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Histologi kulit

Kulit merupakan organ terbesar tubuh yang tersusun atas epidermis dan dermis. Kulit mempunyai fungsi sebagai pelindung tubuh dari lingkungan luar, pengatur temperatur tubuh, reseptor sensasi dari lingkungan luar, ekskresi kelenjar keringat dan absorpsi radiasi ultraviolet dari matahari untuk sintesis vitamin D. Epidermis tersusun atas epitel berlapis gepeng berkeratin, sedangkan lapisan di bawah epidermis dinamakan dermis.¹⁷

2.1.1 Epidermis

Kulit manusia dibedakan menjadi kulit tipis dan kulit tebal. Kulit tipis terdiri atas empat lapisan epidermis dan kulit tebal terdiri atas lima lapisan epidermis. Epidermis tersusun atas lima populasi sel yaitu sel Merkel, melanosit, sel Langerhans, keratinosit dan *corneocytes*.¹⁸ Lapisan kulit teratas adalah stratum korneum dan terbentuk dari *corneocytes* yang merupakan diferensiasi akhir keratinosit.¹⁹ Stratum dibawah stratum korneum adalah stratum lusidum yang merupakan lapisan keratinosit tipis tanpa inti, jernih dan hanya terdapat pada kulit tebal.¹⁷ Stratum granulosum terdiri dari lapisan keratinosit yang mulai kehilangan inti dan mengandung granula keratohialin. Lapisan keratinosit teratas stratum ini mensekresi lipid sehingga berperan sebagai sawar kedap air.¹⁹ Dua lapisan terbawah epidermis adalah stratum spinosum dan stratum basal yang disebut stratum malpighi dan bertanggung jawab atas pembaruan keratinosit. Stratum spinosum merupakan lapisan paling tebal pada epidermis. Sel Langerhans dapat ditemukan dalam stratum ini dan terletak diantara keratinosit. Stratum basal yang terletak dibawah stratum spinosum tersusun dari keratinosit berbentuk kuboid hingga silindris rendah, melanosit dan sel merkel.¹⁷

Keratinosit adalah sel terbanyak yang dapat ditemukan di epidermis. Keratinosit pada stratum basal secara terus menerus melakukan mitosis untuk pembaruan keratinosit. Mitosis tersebut akan mendesak keratinosit pada lapisan diatasnya menuju permukaan kulit. Bersamaan dengan desakan ke permukaan kulit,

keratinosit tersebut mengalami diferensiasi dan mulai mengakumulasi filamen keratin pada sitoplasmanya. Keratinosit akan kehilangan inti dan organelnya saat memasuki stratum lusidum dan akhirnya mati saat memasuki stratum korneum. Keratinosit kemudian akan kehilangan desmosomnya dan terdeskuamasi pada permukaan kulit.¹⁷

Sel Langerhans adalah sel yang mempresentasikan antigen dan sebagian besar terletak pada stratum spinosum. Sel Langerhans memiliki aktivitas bermitosis yang terbatas sehingga sel ini terus menerus digantikan oleh sel prekursor yang meninggalkan aliran darah untuk bermigrasi dan berdiferensiasi menjadi sel Langerhans.¹⁷ Kemokin yang disekresi keratinosit dan fibroblas akan menstimulasi sel prekursor Langerhans untuk meninggalkan aliran darah. Sel prekursor Langerhans akan mendegradasi membran basal endotel dan membran basal *epidermal-dermal junction* untuk berpenetrasi menuju dermis dan epidermis kulit. Matriks metaloprotein berperan dalam migrasi ini untuk mendegradasi matriks ekstraseluler.²⁰

Melanosit merupakan sel produksi pigmen melanin yang memberi warna coklat pada kulit. Sel ini sebagian besar terletak diantara sel stratum basal.¹⁷ Variasi pigmentasi kulit antar etnik disebabkan oleh perbedaan aktivitas melanosit dan distribusi melanosom pada epidermis.²¹

Sel terakhir pembentuk epidermis adalah sel Merkel. Sel Merkel merupakan sel mekanoreseptor yang tersebar diantara sel stratum basal. Densitas sel ini bervariasi tergantung lokasi tubuh, namun sel ini banyak dijumpai pada ujung jari dan pangkal folikel rambut.^{17,21}

2.1.2 Dermis

Dermis tersusun atas jaringan ikat kolagen dan elastin yang tidak teratur. Dermis dapat dibedakan menjadi dua lapisan yaitu lapisan papilaris dermis dan lapisan retikularis dermis.¹⁷

2.1.2.1 Lapisan papilaris dermis

Lapisan papilaris dermis adalah lapisan superfisial dermis yang berinterdigitasi dengan epidermis. Lapisan ini tersusun atas serat kolagen tipe 3 (serat retikuler) dan

serat elastin. Lapisan papilaris mengandung fibroblas, makrofag, sel plasma dan sel lainnya yang sering berada dalam jaringan ikat. Ketebalan lapisan papilaris tidak merata karena lapisan ini membentuk rigi dermis (papilla) pada daerah yang berintedigitasi dengan epidermis. Pada beberapa papilla dapat ditemukan badan Meissner yang bertugas sebagai mekanoreseptor tekanan ringan. Pada lapisan ini banyak ditemukan kapiler yang mengatur temperatur tubuh dan menutrisi sel epidermis.¹⁷

2.1.2.2 Lapisan retikularis dermis

Lapisan retikularis dermis adalah lapisan di bawah papilaris dermis. Lapisan ini tersusun atas serat kolagen tipe 1 yang tersusun padat dengan diselingi oleh serat elastin. Terdapat dua mekanoreseptor yang terletak dalam bagian dalam dermis, yaitu badan Pacini dan badan Ruffini. Badan Pacini bertugas merespons tekanan dan getaran sedang badan Ruffini bertugas merespons terhadap regangan. Pada lapisan ini dapat ditemui sel mast, fibroblas, limfosit, makrofag dan turunan epidermis seperti kelenjar sebacea, kelenjar keringat dan folikel rambut.¹⁷

Kelenjar sebacea dapat ditemukan di seluruh bagian tubuh pada area dermis dan hipodermis kecuali telapak kaki dan telapak tangan. Kelenjar sebacea adalah kelenjar yang berfungsi mempertahankan kekenyalan kulit dengan mensekresi sebum. Kelenjar keringat kulit terdiri dari kelenjar keringat ekrin dan apokrin. Kelenjar keringat ekrin adalah kelenjar merokrin yang berperan dalam proses termoregulasi dan dapat ditemui pada kulit hampir seluruh bagian tubuh. Kelenjar keringat apokrin hanya ditemui pada areola mammae, aksila dan daerah anal. Kelenjar ini diperkirakan berkembang dari kelenjar yang mensekresi atraktan seksual pada hewan.¹⁷

Folikel rambut adalah organ tempat asal rambut yang merupakan invaginasi epidermis ke dermis dan hipodermis. Folikel rambut terdiri dari rambut, sarung akar rambut dalam, sarung akar rambut luar dan membran kemaca. Rambut tumbuh sekitar 1cm/bulan dengan siklus pertumbuhan rambut yang terbagi menjadi tiga fase, yaitu fase anagen, katagen dan telogen.

2.2 Penyembuhan luka

Perlukaan adalah kerusakan terhadap struktur dan fungsi anatomi yang normal. Penyembuhan luka adalah mekanisme tubuh untuk mengembalikan struktur dan fungsi yang rusak. Penyembuhan luka terdiri atas empat tahap yang saling tumpang tindih, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling.⁴

2.2.1 Tahap hemostasis

Tahap pertama pada penyembuhan luka adalah hemostasis yang terjadi saat perlukaan dan selesai dalam beberapa jam kemudian. Tujuan utama tahap ini adalah menghentikan perdarahan dan menyediakan matriks sebagai tempat migrasi sel pada tahap penyembuhan luka berikutnya. Saat luka melewati lapisan epidermis, pembuluh darah dan limfe terputus sehingga terjadi ekstrasvasi darah ke area luka.^{22,23} Saat terjadi perdarahan, otot polos vaskular akan berkontraksi sehingga terjadi hemostasis pada area luka (vasokonstriksi). Trombosit adalah sel pertama yang muncul setelah terjadi luka dan memegang peranan penting dalam proses hemostasis normal.⁵ Saat terjadi perdarahan, trombosit akan berinteraksi dengan kolagen dan matriks ekstraseluler pada area luka. Interaksi ini akan memicu pelepasan faktor koagulasi dari trombosit sehingga terbentuk bekuan darah yang terdiri atas faktor von Willebrand, fibronectin, fibrin, vitronectin dan trombospandin.^{1,4} Bekuan darah yang terbentuk akan berperan sebagai matriks ekstraseluler sementara untuk kerangka migrasi leukosit, keratinosit, fibroblas dan endotel.²² Sitoplasma trombosit mengandung granula α yang berisi *growth factor* dan sitokin, seperti PDGF, TGF- β dan EGF. Molekul-molekul ini akan berperan sebagai promotor dengan menarik dan mengaktifkan neutrofil, makrofag, sel endotel dan fibroblas.⁴

2.2.2 Tahap inflamasi

Tahap inflamasi diaktivasi saat tahap hemostasis masih berlangsung. Mekanisme selular dan humoral yang terjadi pada tahap ini berfungsi sebagai pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme dan jaringan nekrosis. Respon inflamasi akan mengaktifkan jalur komplemen dan menginisiasi penarikan neutrofil ke area luka. Sel neutrofil mulai tertarik ke area luka dalam waktu 24-36 jam oleh

berbagai agen kemoatraktif seperti TGF- β , komponen komplemen: C3a dan C5a, serta peptida formilmetionil yang diproduksi dari bakteri dan trombosit.⁷ Aktivitas neutrofil sangat penting pada hari pertama perlukaan karena kemampuan neutrofil untuk memfagositosis bakteri dan jaringan nekrosis.²² Setelah menyelesaikan tugasnya, neutrofil akan keluar dari area luka dan mengalami apoptosis. Badan apoptotik dan sel yang tersisa akan difagositosis oleh makrofag. Pada 48-72 jam pasca trauma, makrofag timbul pada area luka dan melanjutkan tugas neutrofil untuk memfagositosis. Makrofag berasal dari monosit darah yang bertransformasi saat monosit mencapai area luka.⁴ Keberadaan makrofag pada area luka menandakan bahwa tahap inflamasi akan berakhir dan akan dilanjutkan ke tahap proliferasi.²⁴ Makrofag akan membersihkan area luka dari debris dan mikroba serta melepaskan sitokin proinflamasi dan *growth factor* seperti FGF, TGF- β , PDGF dan EGF yang akan menginisiasi pembentukan jaringan granulasi dengan menarik fibroblas dan sel otot polos ke area luka.^{23,24,25} Dengan demikian makrofag tidak hanya berfungsi untuk fagositosis namun juga menunjang proliferasi sel dan restorasi jaringan.²² Sel terakhir yang bermigrasi ke area luka adalah limfosit, yang akan ditarik pada 72 jam pasca trauma oleh IL-1. Peran sel ini pada penyembuhan luka masih dipertanyakan.⁴

2.2.3 Tahap proliferasi

Tahap proliferasi dimulai setelah terjadi respon inflamasi pada luka. Tahap ini dicirikan dengan migrasi fibroblas dan sintesis matriks ekstrasel sebagai pengganti matriks luka sementara yang terbentuk dari fibrin dan fibronectin. Fibroplasia adalah proses proliferasi dan migrasi fibroblas ke dalam bekuan fibrin dan memproduksi kolagen baru serta protein matriks lain yang berperan dalam pembentukan jaringan granulasi.⁵ Fibroblas bermigrasi ke area luka dengan ditarik oleh FGF, TGF- β dan PDGF yang dilepaskan oleh makrofag dan trombosit. Di area luka, fibroblas akan berproliferasi dan memproduksi protein matriks hyaluronan, fibronectin, proteoglikan dan prokolagen tipe 1 dan 3. Pada akhir minggu pertama matriks ekstrasel terakumulasi untuk menunjang migrasi sel dan proses regenerasi.⁴

Angiogenesis berlangsung pada tahap ini, bersamaan dengan pembentukan matriks ekstrasel. Faktor yang menginisiasi angiogenesis adalah VEGF, PDGF,

basic fibroblast growth factor (bFGF) dan serine protease trombin. VEGF adalah mediator kunci dalam pembentukan vaskular embriologi dan angiogenesis baik fisiologi maupun patologi sehingga VEGF merupakan *growth factor* vital dalam proses angiogenesis penyembuhan luka.^{26,27} Langkah awal angiogenesis adalah pengikatan *growth factors* dengan reseptor di sel endotel pada pembuluh darah area luka. Pengikatan ini mengaktifasi jalur sinyal intrasel, sehingga sel endotel akan teraktivasi untuk mensekresi enzim proteolitik yang akan menghancurkan lamina basalis. Sel endotel kemudian akan berproliferasi dan bermigrasi ke area luka. Proses proliferasi dan migrasi ini dinamakan pertunasan. Tunas endotel akan membentuk kanal tubular yang saling berhubungan sehingga terbentuk pembuluh darah baru. Pembuluh darah baru tersebut akan berdiferensiasi menjadi arteri dan vena. Pembuluh darah baru tersebut menjadi matur dengan merekrut perisit dan sel otot polos.^{4,22}

Jaringan granulasi adalah jaringan yang kaya akan vaskularisasi dan komponen seluler. Sel yang berperan pada pembentukan jaringan granulasi adalah fibroblas. Matriks ekstrasel yang telah terbentuk akan memberikan kerangka bagi adhesi sel sehingga mengorganisasi pertumbuhan, pergerakan dan diferensiasi sel didalamnya.^{4,22}

Myofibroblas adalah sel yang berperan dalam kontraksi luka karena kemampuan mereka untuk kontraksi. Myofibroblas dicirikan dengan adanya konsentrasi tinggi mikofilamen aktin pada membran plasma. Fibronectin disekresikan untuk meningkatkan aktivitas fibroblas dengan memungkinkan fibroblas untuk berikatan dengan matriks ekstrasel. Sitoplasmik aktin akan berikatan dengan fibronectin dan melekatkan diri pada serat kolagen sehingga terjadi kontraksi yang mendekatkan sel dengan kolagen sehingga menghasilkan kontraksi luka.⁵ Kontraksi luka merupakan aspek penting dalam penyembuhan luka. Lemo dkk menetapkan indikator penyembuhan luka melalui model matematika pada perlukaan kulit kelinci. Indikator tersebut (WCI) menilai kontraksi luka pada penyembuhan luka kulit. Kontraksi luka meliputi kontraksi lapisan superfisial kulit dan kontraksi lapisan dalam kulit. WCI menganalisis kontraksi luka dengan metode matematika. Untuk merefleksikan proses tersebut WCI dinilai dengan menjumlahkan dua parameter yaitu kontraksi luka superfisial

(*superficial contraction indeks*= SCI) dan kontraksi luka dalam (*deep contraction indeks*= DCI). SCI didapat dari pengurangan area epitelisasi dan jarak antara dua tepi luka yang dibagi area epitelisasi. DCI dihitung dari pengurangan ketebalan dermis normal dan kedalaman luka yang dibagi ketebalan dermis normal.²⁸

Epitelisasi adalah proses regenerasi jaringan epidermis setelah terjadi luka pada jaringan kulit. Proses ini meliputi migrasi keratinosit, proliferasi keratinosit, diferensiasi neoepitelium menjadi lapisan epidermis dan restorasi *basement membrane zone* (BMZ) yang akan menghubungkan epidermis dan dermis.⁵ Epitelisasi diinisiasi oleh jalur sinyal dari sel epitel dan sel non-epitel di area tepi luka. Sel tersebut melepaskan berbagai sitokin dan *growth factors* seperti EGF, *keratinocyte growth factor* (KGF), IGF-1 dan *nerve growth factor* (NGF). Keratinosit teraktivasi untuk bermigrasi dalam 24 jam setelah perlukaan. Migrasi dimulai dari tepi luka melalui serangkaian modifikasi subseluler seperti hilangnya kontak hemidesmosom antara epidermis dan membran basal, retraksi tonofilamen intrasel dan filamen keratin, hilangnya kontak desmosom antar sel, pembentukan lamellipodia dan kontak fokal.^{5,29} Migrasi keratinosit akan terhenti oleh kontak inhibisi saat keratinosit kedua tepi luka saling bertemu.⁴ Proliferasi keratinosit untuk menutup celah luka terjadi setelah keratinosit bermigrasi.⁵ Parameter epitelisasi yang dianalisis adalah rasio epitelisasi, jarak epitelisasi dan jumlah lapisan epitel pada epidermis. Rasio epitelisasi dan jarak epitelisasi dianalisis untuk menilai migrasi epitel ke area luka. Rasio epitelisasi menilai perbandingan panjang migrasi epitel terhadap panjang area luka. Jarak epitelisasi mengamati jarak luka antara dua migrasi epitel terakhir di area luka sedangkan jumlah lapisan epitel pada epidermis dianalisis untuk menilai proliferasi epitel di area luka.

2.2.4 Tahap *remodeling*

Tahap *remodeling* adalah tahap akhir penyembuhan luka yang berlangsung selama 1-2 tahun atau lebih. Tahap ini bertujuan untuk menyeimbangkan proses sintesis yang terjadi sehingga penyembuhan dapat berjalan normal.⁴ Pada tahap ini terjadi regresi pembuluh darah dan *remodeling* jaringan granulasi.²⁵ Kolagen tipe III yang terbentuk pada tahap proliferasi akan digantikan oleh kolagen tipe I.²² Kolagen yang terbentuk dapat dianalisis dengan menghitung densitas kolagen.

Densitas kolagen menilai pembentukan kolagen yang terwarnai biru oleh pewarnaan khusus Masson Trichome. Area yang terwarnai biru tersebut akan dianalisis sehingga didapat data numerik dengan satuan *pixel*.^{30,31}

Kolagen tersebut akan didegradasi oleh *matrix metalloproteinase* (MMP) yang diproduksi dari trombosit, neutrofil, makrofag dan fibroblas. Aktivitas ini diregulasi oleh faktor inhibitor (inhibitor TGF- β 1) Bila inhibitor terhadap enzim *metalloproteinase* meningkat maka akan terjadi akumulasi matriks yang baru.²⁵ Dengan berjalannya waktu, proses angiogenesis akan terhenti sehingga terjadi penurunan aliran darah dan tingkat metabolik pada area tersebut. Kepadatan pembuluh darah menurun seiring dengan akumulasi kolagen yang mengakibatkan maturasi jaringan granulasi, sehingga terbentuk jaringan parut. Hasil akhir yang didapat adalah jaringan parut yang matang dengan kekuatan tegangan jaringan yang tinggi.^{4,22} Luas jaringan baru yang terbentuk pada area luka dapat dihitung menggunakan *software image raster* untuk mengamati penurunan luas jaringan baru antar hari perlukaan.

2.3 Peran *vascular endothelial growth factor* pada penyembuhan luka

Vascular endothelial growth factor family (VEGFs) adalah *angiogenic growth factor* yang berperan sebagai mitogen sel endotel, agen kemotaksis dan stimulator permeabilitas pembuluh darah. VEGF berperan dalam beberapa tahap penyembuhan luka, antara lain: angiogenesis, epitelisasi dan deposisi kolagen. VEGF terdiri dari VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan *placenta growth factor* (PLGF). VEGF disintesis oleh berbagai sel yang berpartisipasi dalam penyembuhan luka seperti sel endotel, fibroblas, sel otot polos, trombosit, neutrofil dan makrofag.³²

VEGF-A dihasilkan oleh sel endotel, keratinosit, fibroblas, trombosit, neutrofil dan makrofag. VEGF-A berperan menstimulasi angiogenesis dengan meningkatkan proliferasi dan migrasi sel endotel.³³ VEGF-C dilepaskan oleh makrofag dan berperan menarik sel inflamasi dan hematopoetik. Secara *in vitro* VEGF-C berperan dalam penyembuhan luka dengan menstimulasi angiogenesis dan *lymphoangiogenesis*.² Pembentukan pembuluh limfe oleh VEGF-C terjadi bersamaan dengan pembentukan pembuluh darah.³² PLGF disekresi oleh

keratinosit dan endotel pada jaringan kulit. PLGF berperan dalam meregulasi tahap inflamasi dan menstimulasi proliferasi fibroblas. PLGF bekerja sinergik dengan VEGF untuk mengaktifkan angiogenesis.²

VEGF memiliki kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas vaskular yang lebih baik dari histamin. VEGF menstimulasi sintesis *nitric oxide* (NO) dan aktivitas *cyclooxygenase*. NO dan *prostacyclin* akan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah secara simultan. Peningkatan permeabilitas vaskular dalam angiogenesis bertujuan meningkatkan sensitivitas sel endotel terhadap *growth factors* dan mempunyai mekanisme umpan balik positif terhadap ekspresi VEGF.³²

Peranan VEGF dalam mendegradasi membran basal dan matriks ekstrasel diperlukan untuk memfasilitasi pergerakan sel endotel dalam ruang ekstrasvaskular. VEGF akan menginduksi sel endotel dan sel otot polos untuk mensekresi MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, serta *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) dan *tissue type plasminogen activator* (tPA) untuk menghasilkan keadaan proteolitik untuk menghancurkan membran basal dan matriks ekstrasel.³²

VEGF berperan secara tidak langsung dalam migrasi sel endotel. VEGF menginduksi uPA dan osteopontin (OPN) yang dapat menstimulasi kemotaksis sel endotel. VEGF menginduksi vasodilatasi yang menyebabkan lepasnya protein fibrinogen plasma ke jaringan sehingga terbentuk gel fibrin. Gel fibrin dapat memfasilitasi migrasi sel endotel.³²

VEGF akan menginduksi sel endotel untuk tumbuh dan berproliferasi pada permukaan serat kolagen sehingga dapat memulai invasi serat kolagen. Namun masih belum jelas molekul yang berperan dalam efek mitotik ini. VEGF akan menginduksi protein antiapoptosis sehingga masa hidup sel endotel menjadi lebih panjang.³²

2.4 Peran *epidermal growth factor* pada penyembuhan luka

EGF adalah polipeptida yang tersusun dari 53 asam amino dan bertanggungjawab terhadap maturasi sel epitel.^{34,35} EGF pertama kali diisolasi pada tahun 1962 oleh Stanley Cohen dari kelenjar submaksilaris tikus. *EGF family* terdiri dari empat protein yaitu EGF, *transforming growth factor-α* (TGF-α), *heparin-binding* EGF (HB-EGF) dan amphiregulin. Pada kulit dewasa normal, EGF reseptor

(EGF-R) terekspresi di keratinosit stratum basal dan berperan dalam proliferasi, diferensiasi dan migrasi keratinosit. Pada penyembuhan kulit terjadi peningkatan ekspresi EGF-R untuk menginduksi proliferasi dan migrasi keratinosit. Penelitian mengungkapkan pemberian EGF eksogen pada penyembuhan luka akan menstimulasi kerja *growth factor* ini.³⁵ Ikatan EGF dan EGF-R akan mengaktifkan *intracytoplasmic janus kinase* (JAK) yang akan berinteraksi dengan protein transduser sinyal dan mengaktifkan STAT yang mengalami dimerisasi. Akumulasi dimer STAT teraktivasi (*activated STAT dimers*) dalam nukleus akan mengaktifkan transkripsi gen target sehingga terjadi sintesis DNA dan proliferasi sel.³⁴

EGF, TGF- α dan HB-EGF berperan sebagai *growth factor* endogen dalam penyembuhan luka.³³ EGF dapat menjadi regulator kunci bagi migrasi keratinosit pada area luka.²⁹ EGF disekresi oleh trombosit, makrofag dan fibroblas bekerja secara parakrin. Uji *in vitro* menunjukkan EGF meningkatkan proliferasi dan migrasi keratinosit ke area luka (epitelisasi). Pemberian EGF secara topikal pada luka kronis meningkatkan epitelisasi dan memperpendek waktu penyembuhan. Pemberian EGF secara sistemik mempertahankan konsentrasi *growth factor* sehingga proses penyembuhan dapat berjalan baik.^{2,33} TGF- α disekresi oleh trombosit, keratinosit, makrofag dan fibroblas bekerja secara autokrin. Defisiensi *growth factor* ini tidak menimbulkan gangguan pada penyembuhan luka karena terdapat kompensasi dari jenis lain *epidermal growth factor family*.² HB-EGF disekresi oleh keratinosit bekerja secara autokrin. HB-EGF terbukti bekerja sinergik dengan IGF dalam menstimulasi proliferasi keratinosit.^{2,34}

2.5 Peran sel punca pada penyembuhan luka

Sel punca berdasarkan definisi mempunyai dua karakteristik yaitu regenerasi diri dan berdiferensiasi menjadi sel lain. Berdasarkan sumbernya sel punca terbagi menjadi sel punca embrionik, sel punca non-embrionik dan *induced pluripotent stem cell* (iPS).³⁶ Sel punca embrionik bersifat totipoten dan pluripoten. Sel punca non-embrionik atau sel punca dewasa memiliki sifat multipoten dan unipoten.^{36,37} *Induced pluripotent stem cell* adalah sel non-embrionik yang diinduksi sehingga memiliki kemampuan diferensiasi sel punca embrionik.³⁷ Berdasarkan kemampuan yang dimiliki dan pengetahuan untuk mengisolasi serta

memproduksi sel punca maka dunia kedokteran akan memasuki era baru dalam mengobati berbagai penyakit.

2.5.1 Peran *adipose-derived stem cell* dalam penyembuhan luka

Jaringan lemak terdiri dari adiposit dewasa (>90%) dan berbagai populasi sel lain seperti preadiposit, fibroblas, sel endotel, makrofag, limfosit dan ADSC, yang dinamakan *stromal vascular fraction* (SVF). ADSC adalah sel punca multipoten yang terdapat di jaringan lemak.^{38,39} ADSC pertama kali dipublikasikan oleh Frohlich pada tahun 1972 sebagai populasi sel yang adheren dan dikenal sebagai prekursor proliferasi adiposit. Berbagai nama telah diberikan untuk mendeskripsikan populasi sel ini antara lain lipoblas, perisit, preadiposit dan *processed lipoaspirates* (PLA). Untuk menyamakan nomenklatur *International fat applied technology society* (IFATS) mengusulkan nama *adipose-derived stromal cells* untuk mengidentifikasi sel tersebut.⁴⁰ ADSC dapat diisolasi dari jaringan lemak melalui prosedur *liposuction* atau operasi rekonstruksi lainnya. Jaringan lemak yang diisolasi diberi kolagenase dan sentrifugasi untuk membentuk SVF. SVF kemudian akan dikultur sehingga sel dapat berkembang.^{41,42}

Identifikasi ADSC dapat dilakukan melalui pemeriksaan kombinasi *surface protein marker* CD13, CD29, CD34, CD54, CD73, CD90, CD 105 dan MHC I. Karakteristik lain dari ADSC adalah dapat berdiferensiasi secara invitro menjadi osteoblas, adiposit dan kondrosit.^{41,43}

ADSC mempunyai sifat yang serupa dengan *bone marrow stem cell* (BMSC), namun ADSC memiliki beberapa keunggulan antara lain: pengambilan ADSC tidak invasif seperti BMSC dan jumlah sel isolasi BMSC sangat rendah dibanding ADSC karena hanya 0.01-0.001% dari isolasi sel mononuklear BMSC yang membentuk koloni.³⁶ Keunggulan tersebut menempatkan ADSC sebagai salah satu alternatif *stem cell based therapy*.

ADSC meregenerasi jaringan yang rusak melalui mekanisme differensiasi dan sinyal parakrin. Differensiasi ADSC dapat secara langsung menggantikan sel yang rusak sedangkan sinyal parakrin ADSC akan meregulasi respon lokal selular terhadap kerusakan melalui sekretom yang dihasilkan. Peran serta ADSC melalui efek differensiasi terbatas karena rendahnya viabilitas ADSC di dalam jaringan.

Penelitian terdahulu mengungkapkan peran utama ADSC dalam regenerasi jaringan adalah efek parakrin ADSC.⁴⁴ ADSC mensekresi berbagai *growth factors*, sitokin, matriks ekstrasel (ECM), protease ECM dan hormon.³⁸ Penggunaan sekretom ADSC dalam terapi klinik merupakan langkah pertama penggunaan ADSC-CM. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi *growth factors* yang terkandung dalam ADSC-CM.

Peran ADSC pada penyembuhan luka telah dipelajari dengan hasil yang menjanjikan. Transplantasi ADSCs pada luka dapat menstimulasi proliferasi fibroblas sehingga meningkatkan reepitelisasi dan pembentukan jaringan granulasi.^{7,45} Penelitian Ebrahimian dkk menunjukkan pemberian ADSC pada model perlukaan tikus menstimulasi proliferasi dan migrasi keratinosit melalui sekresi VEGF dan KGF.⁴⁶ Pemberian ADSC pada tikus dengan ulkus radiasi menunjukkan peningkatan konsentrasi VEGF dan HGF sehingga menstimulasi penutupan celah luka.⁴⁷ Pada penelitian mengenai efek ADSC pada cangkuk kulit tikus diabetik ditemukan peningkatan konsentrasi VEGF dan TGF- β . Pada uji klinik pada pasien ulkus iskemia didapatkan pemberian ADSC meningkatkan penyembuhan ulkus.⁴⁸

2.5.2 Peran *adipose-derived stem cell conditioned medium* dalam penyembuhan luka

ADSC-CM mengandung sejumlah sekretom yang dapat menstimulasi proses penyembuhan luka. Penelitian terdahulu telah menganalisis sekretom yang dihasilkan oleh ADSC-CM dengan berbagai pemeriksaan antara lain: ELISA, *Western blot* dan *antibody array*.^{11,49}

Penelitian Kim dkk (2009) telah menganalisis ADSC-CM dengan analisa antibodi dan telah terdeteksi 14 *growth factors*, yaitu EGF, FGF 4, IGFBP 1, IGFBP 2, IGFBP 3, IGFBP 4, IGFBP 5, G-CSF, GM-CSF, IGF III, MCSF, PDGF, TGF- β dan VEGF.¹⁶ Moon dkk (2012) mendeteksi *connective tissue growth factor* (CTGF), *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1/SERPINE-1), *hepatocyte growth factor* (HGF), FGF-1, G-CSF, GM-CFS, *interleukin-6* (IL-6), VEGF dan TGF- β .⁵⁰ Amos dkk (2010) menemukan IGF-1; IGFBP 5; *periostin*; TGF- β 1; TGF- β 2; *Syndecan 1*; *Syndecan 2*; *Biglycan*; kolagen VIII A2; kolagen XV A1;

kolagen XVIII A1; kolagen VI A3; *Decorin*; elastin; fibronectin 1; laminin A1; MMP1,2,8,9,14; *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP)-123; Tenascin-C.⁵¹

Efek ADSC-CM dalam menstimulasi penyembuhan luka telah diteliti baik secara *in vitro* dan *in vivo*. Hu dkk menganalisis efek ADSC-CM secara *in vitro* terhadap migrasi fibroblas, sel endotel dan keratinosit dalam berbagai konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan migrasi fibroblas, sel endotel dan keratinosit meningkat optimal pada konsentrasi 50% ADSC-CM.¹⁸ Migrasi dan kontraktilitas fibroblas telah diteliti secara *in vitro* oleh Lee dkk. Hasil analisis memperlihatkan peningkatan bermakna migrasi dan kontraktilitas fibroblas pada aplikasi ADSC-CM konsentrasi 50%.¹⁵ Pemberian ekstrak protein ADSC-CM (AAPE = *Advanced Adipose-derived stem cell*) telah dianalisis efeknya terhadap migrasi dan proliferasi keratinosit secara *in vitro*. AAPE memberi perbedaan bermakna pada migrasi dan proliferasi keratinosit pada konsentrasi 1.22 µg/mL.⁵⁰

Penelitian penyembuhan luka secara *in vivo* telah dilakukan oleh Zhou dkk dan Kwon dkk. Pada tahun 2013 Zhou dkk melakukan uji klinik mengenai efek ADSC-CM pada penyembuhan luka setelah perlukaan dengan laser karbondioksida. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan penyembuhan luka dan penurunan eritema post laser karbondioksida.¹⁵ Efek ADSC-CM dalam menstimulasi angiogenesis diteliti oleh Kwon dkk dengan hasil yang baik. Pemberian ADSC-CM spheroid memberi peningkatan bermakna terhadap angiogenesis dibanding kontrol.⁵² Hal ini menunjukkan bahwa ADSC dan ADSC-*conditioned medium* (ADSC-CM) dapat meningkatkan proses penyembuhan luka.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian

Penelitian ini menerapkan desain penelitian eksperimental *randomized controlled parallel* menggunakan hewan coba.

3.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan Januari 2015 sampai bulan November 2015 di Laboratorium UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca RSCM-FKUI, Laboratorium Histologi FKUI dan Laboratorium hewan coba Kemkes.

3.3 Sampel penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus Sprague Dawley dengan perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus Federer $(n-1)(t-1) \geq 15$; jumlah perlakuan terhadap luka adalah empat.

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

Berdasarkan perhitungan di atas sampel penelitian ini berjumlah 30 ekor tikus dengan jumlah tiap kelompok hari perlukaan enam ekor tikus.

3.4 Alat dan bahan penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Kassa
- b. *Centrifuge*
- c. Mesin *shaker*
- d. *Syringe filter*
- e. Medium Basal
- f. Pendingin -20°C
- g. *Biosafety cabinet*
- h. Tabung Eppendorf
- i. Medium Komplit 10%
- j. Optilab advance plus

- k. Ketamin dan Xylazine
- l. Kaca objek dan penutup
- m. Tabung *centrifuge* 15 mL
- n. *Syringe* 1 mL, 3 mL dan 5 mL
- o. *Conditioned medium* ADSC
- p. Mikroskop cahaya Olympus
- q. *Micropipette* tip kuning, biru
- r. *Micropipette* berbagai ukuran
- s. Formalin, kaset dan pot 100 mL
- t. *Povidone iodine* dan alkohol 70%
- u. Alat bedah minor (pinset, *scalpel*, gunting)
- v. Elisa kit EGF (RAB0149) dan VEGF (RAB0507) @sigma-aldrich
- w. Larutan untuk pulasan Hematoksilin-Eosin (HE) dan Masson's Trichome

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Persiapan *Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Medium*

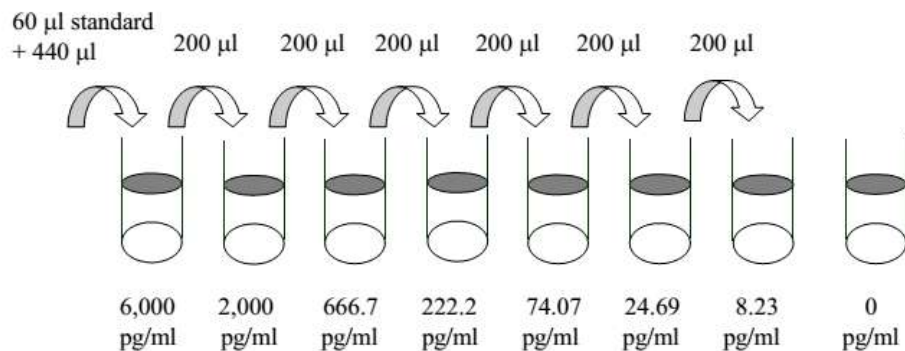
ADSC-CM didapat dari Laboratorium UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca RSCM-FKUI. ADSC-CM disimpan dalam mesin pendingin dengan suhu -20°C . ADSC-CM didapat dari kultur ADSC pasase tiga dengan medium kultur : α -MEM dan 10% *platellet rich plasma* (PRP) dalam kondisi normoksia selama tiga hari. ADSC-CM didapat dari sel yang telah memberikan karakteristik ADSC yaitu positif terhadap CD 34, CD 73 dan CD 90, serta dapat berdiferensiasi menjadi tiga galur sel: osteogenik, kondrogenik dan adipogenik.

3.5.2 Prosedur ELISA *vascular endothelial growth factor*

Prosedur ELISA VEGF secara ringkas sebagai berikut: Seluruh reagen dan sampel disiapkan dalam temperatur ruangan; Larutan standar dibuat dan dilakukan pengenceran bertingkat; Larutan pendeteksi antibodi VEGF, *wash buffer* dan HRP-Streptavidin dipersiapkan; Larutan standar dan sampel dimasukkan dalam *mikroplate* sebesar 100 μL ; *Mikroplate* diinkubasi selama semalam dalam suhu 4°C ; *Mikroplate* dicuci dengan *wash buffer* sebanyak empat kali; Larutan deteksi antibodi VEGF dimasukan sebesar 100 μL ke *mikroplate* dan diinkubasi selama 1

jam dalam gerakan memutar ringan; *Mikroplate* kemudian dicuci dengan *wash buffer* sebanyak empat kali; HRP-Streptavidin dimasukan sebesar 100 μ L ke *mikroplate* dan diinkubasi selama 45 menit dalam gerakan memutar ringan; Reagen TMB dimasukan sebesar 100 μ L ke *mikroplate* dan diinkubasi selama 30 menit dalam gelap dengan gerakan memutar ringan; ELISA *stop solution* dimasukan 100 μ L ke *mikroplate* dan *mikroplate* ditempatkan dalam ELISA *reader* untuk dibaca.

Dilution Series for Standards

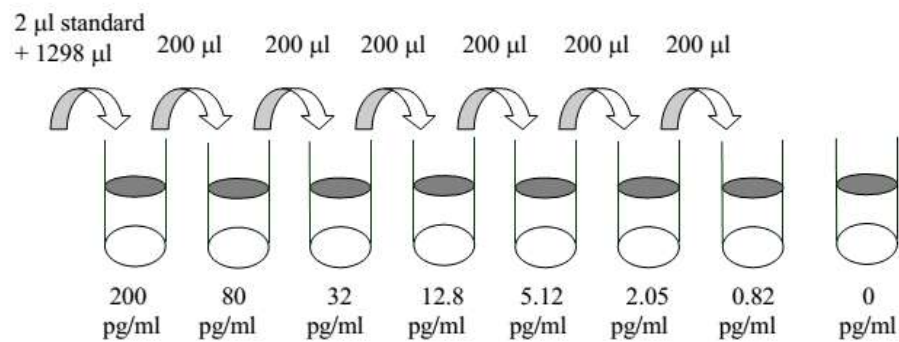


Gambar 3.1 Gambar *dillution series* untuk larutan standar ELISA VEGF

3.5.3 Prosedur ELISA *epidermal growth factor*

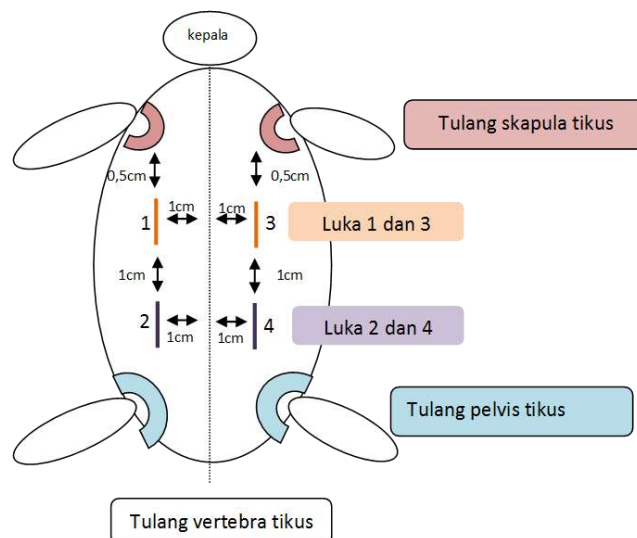
Prosedur ELISA EGF secara ringkas sebagai berikut: Seluruh reagen dan sampel disiapkan dalam temperatur ruangan; Larutan standar yang telah dibuat dimasukan dalam tabung *Eppendorf* dan dilakukan pengenceran bertingkat; Larutan pendeteksi antibodi EGF, *wash buffer* dan HRP-Streptavidin dipersiapkan; Larutan standar dan sampel dimasukkan dalam *mikroplate* sebesar 100 μ L; *Mikroplate* diinkubasi selama semalam dalam suhu 4°C; Larutan deteksi antibodi EGF dimasukan sebesar 100 μ L ke *mikroplate* dan diinkubasi selama 1 jam dalam gerakan memutar ringan; *Mikroplate* kemudian dicuci dengan *wash buffer* sebanyak empat kali; HRP-Streptavidin dimasukan sebesar 100 μ L ke *mikroplate* dan diinkubasi selama 45 menit dalam gerakan memutar ringan; Reagen TMB dimasukan sebesar 100 μ L ke *mikroplate* dan diinkubasi selama 30 menit dalam gelap dengan gerakan memutar ringan; ELISA *stop solution* dimasukan 100 μ L ke *mikroplate* dan *mikroplate* ditempatkan dalam ELISA *reader* untuk dibaca.

Dilution Series for Standards

Gambar 3.2 Gambar *dilution series* untuk larutan standar ELISA EGF

3.5.4 Perlukaan kulit tikus

Hewan coba tikus diadaptasikan dalam laboratorium selama satu minggu (hari penelitian ke-1 sampai ke-7) dengan dikandangkan secara tersendiri. Makan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Tikus dianestesi menggunakan kombinasi ketamine (40mg/kg BB) dan xylazine (5 mg/kg BB) secara intraperitoneal.⁵³ Rambut pada bagian punggung tikus dicukur sampai bersih dengan ukuran 5x5 cm. Masing-masing tikus akan mendapat empat luka sayatan pada daerah punggungnya. Luka dibuat sejajar garis vertebra tikus dengan jarak 1 cm sisi kanan dan kiri tulang vertebra; 0,5 cm di bawah tulang skapula dan jarak antar luka yang berurutan secara vertikal 1 cm. Dilakukan tindakan aseptis dan antisepsis pada daerah kulit yang akan dilukai dengan menggunakan larutan *povidone iodine*. Kulit tikus dilukai dengan panjang 2 cm dan tebal 5 mm (*full thickness wound*). Kulit dilukai dengan mengangkat kedua ujung kulit yang akan dilukai dengan pinset (jarak antar pinset 1cm) kemudian dilakukan sayatan menggunakan pisau bedah. Setelah perdarahan berhenti, luka diberikan perlakuan sesuai dengan lokasi luka. Pembaluran hanya dilakukan satu kali yaitu setelah kulit tikus dilukai. Tikus dibagi kedalam empat kelompok berdasarkan waktu dikorbankannya (hari ke-3, 7, 14, 21 dan 28). Setelah tikus dikorbankan, dilakukan pemeriksaan mikroskopik pada jaringan luka kulit. Jaringan kulit yang telah diambil dimasukan dalam pot berisi formalin sebelum memproses jaringan.



Gambar 3.3 Skema tikus dengan empat luka sayat pada area punggung

- Luka 1: luka dibalurkan ADSC-CM konsentrasi 100% sebanyak 0,1 mL
- Luka 2: luka tanpa pembaluran sebagai kontrol negatif
- Luka 3: luka dibalurkan PRP 10% dan medium basal sebanyak 0,1 mL sebagai kontrol medium kultur
- Luka 4: luka dibalurkan medium basal sebanyak 0,1 mL sebagai kontrol pelarut

3.5.5 Processing jaringan

Processing jaringan secara ringkas sebagai berikut: Sediaan didehidrasi dalam larutan alkohol 70% - alkohol 80% - alkohol 95% - alkohol 95% - alkohol 100% - alkohol 100% - alkohol 100% - xylol, masing-masing selama satu hari kemudian dimasukan dalam larutan xylol selama dua jam; Sediaan diimpregnasi dalam parafin cair sebanyak dua kali selama dua jam; *Embedding* sediaan dilakukan dalam parafin cair dan ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin kemudian dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m dan ditempelkan dalam kaca sediaan untuk dilakukan pewarnaan HE dan Masson's Trichome.

3.5.6 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Pewarnaan HE secara ringkas sebagai berikut: Deparafinisasi sediaan dilakukan dalam larutan xylol, selama 10 menit sebanyak dua kali; Sediaan direhidrasi dalam larutan alkohol 100% - alkohol 95% - alkohol 80% – alkohol 70%

– akuades, masing-masing sebanyak dua kali dan selama lima menit; Sediaan kemudian dicelup dalam larutan Hematoksin Harris selama satu menit 30 detik; Sediaan kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit; dan dimasukkan dalam larutan eosin sebanyak tiga celupan; Sediaan didehidrasi dalam larutan alkohol 70% - 80% - alkohol 95% - alkohol 100%, masing-masing sebanyak dua kali dan selama lima menit; Sediaan kemudian dijernihkan dalam larutan xylol, sebanyak dua kali dan selama 10 menit. Sediaan kemudian direkatkan dengan *deck glass* dan diamati dengan mikroskop cahaya. Sediaan didokumentasi menggunakan pembesaran lensa objektif 40 kali dan 400 kali dengan kamera Optilab advance plus.

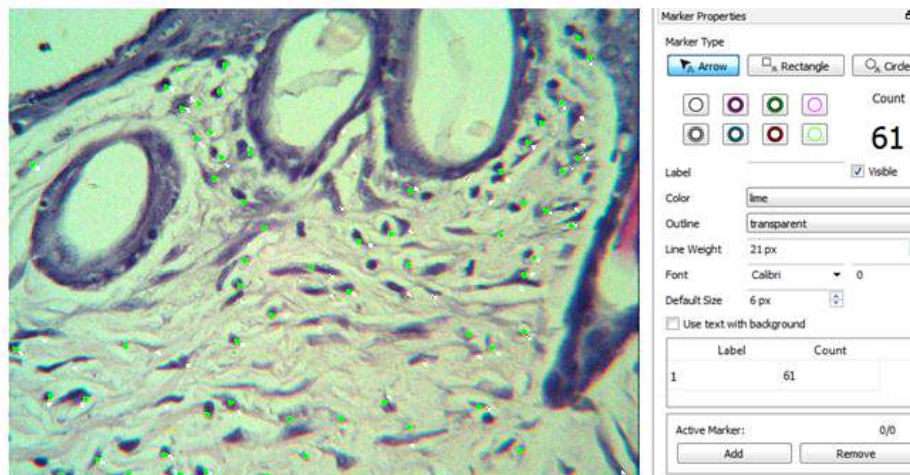
3.5.7 Pewarnaan Masson's Trichrome

Pewarnaan Masson's Trichrome adalah sebagai berikut: Deparafinisasi sediaan dalam xylol dilakukan sebanyak dua kali selama masing-masing lima menit; sediaan kemudian direhidrasi sediaan dalam alkohol 100% - alkohol 95%, masing-masing selama lima menit dan akuades selama 30 detik; Sediaan lalu dimasukkan dalam larutan Bouin selama satu jam dengan temperatur 56^o; Sediaan didinginkan dalam air mengalir selama 35 menit kemudian dicuci dalam akuades selama 30 detik; Sediaan kemudian dimasukkan dalam larutan *Weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit; Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 30 detik; Sediaan dimasukkan dalam larutan *Biebrich scarlet – Acid fuchsin* selama 15 menit dan dicuci dengan akuades selama 30 detik; Sediaan kemudian dimasukkan dalam larutan *Phosphomolybdic acid – Phosphotungstic acid* selama 15 menit dan *Anilin blue* selama 10 menit; Sediaan dicelupkan dalam akuades sebanyak lima kali; Kemudian sediaan dimasukkan dalam larutan air asetat selama tiga menit; Sediaan didehidrasi dalam alkohol 95% - alkohol 100% - alkohol 100%, masing-masing selama 30 detik; Kemudian dijernihkan dengan xylol sebanyak dua kali selama masing-masing tiga menit. Sediaan kemudian direkatkan dengan *deck glass* dan diamati dengan mikroskop cahaya. Sediaan didokumentasi menggunakan pembesaran lensa objektif 400 kali dengan kamera Optilab advance plus.

3.6 Analisis data

3.6.1 Densitas pembuluh darah

Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 400 kali menggunakan kamera Optilab advance plus (Optilab, Indonesia). Penilaian dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pada sediaan dengan pewarnaan HE menggunakan *software* Image Raster 3 (*software* yang disertakan oleh Optilab advance plus). Densitas pembuluh darah dinilai dengan menentukan jumlah kapiler pada lima lapangan pandang. Hasil penilaian diambil dari nilai rata-rata jumlah pembuluh darah. Pembuluh darah ditandai dengan lumen yang dibatasi endotel dan membran basal dengan /tanpa sel otot polos. Hasil penilaian angiogenesis dilakukan oleh dua penilai sehingga dinilai kesesuaiannya dengan teknik Bland-Altman untuk menentukan kesesuaian hasil pengukuran.⁵⁴ Densitas pembuluh darah dianalisis pada perlakuan hari ke-7, 14, 21 dan 28. Data disajikan dalam bentuk grafik.



Gambar 3.4 Image Raster 3 untuk menghitung angiogenesis

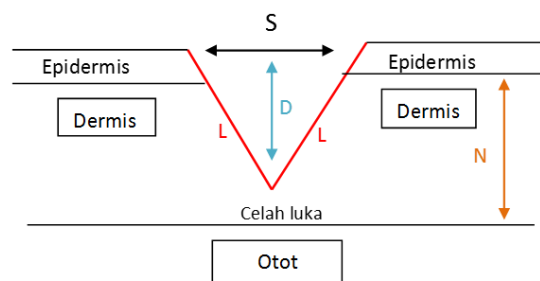
3.6.2 Wound contraction index

Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya menggunakan pembesaran lensa objektif 40 kali dengan kamera Optilab advance plus. Penilaian dilakukan dengan menggunakan *software* Image Raster 3 untuk menentukan *wound contraction index* (WCI). WCI didapat dari penjumlahan SCI (*superficial contraction index*) dan DCI (*deep contraction index*). SCI didapat dari $(L-S)/L$ sedangkan DCI didapat dari $(N-D)/N$ dengan hasil bervariasi dari 0 dan 1. L adalah

panjang area epitelisasi; S adalah jarak antara kedua tepi luka; N adalah ketebalan dermis normal di kedua tepi luka dan D adalah kedalaman luka dari lapisan epidermis. WCI dianalisis pada perlukaan hari ke-3, 7 dan 14.²⁸ Data disajikan dalam bentuk grafik.

Kontraksi luka dapat dinilai berdasarkan 3 kategori :

- Inisiasi kontraksi luka superfisial baik
Didapatkan pada penyembuhan luka yang berjalan dengan baik. Pada kategori ini nilai SCI tinggi dan nilai DCI rendah. Seiring dengan berjalannya proses penyembuhan SCI akan menurun dan DCI akan meningkatkan sehingga terjadi penutupan luka ($WCI=1$).⁴⁹
- Inisiasi kontraksi luka lemah
Didapatkan pada proses penyembuhan luka yang lemah. Nilai SCI, DCI dan WCI mendekati 0,⁴⁹
- Kontraksi luka dalam
Didapatkan pada luka yang superfisial sehingga SCI terlihat lemah. Nilai SCI mendekati 0, DCI akan meningkat dan akhirnya luka tertutup ($WCI=1$).⁴⁹



Gambar 3.5 Skema celah luka untuk mengukur kontraksi luka

L adalah panjang area epitelisasi

S adalah jarak antara kedua tepi luka

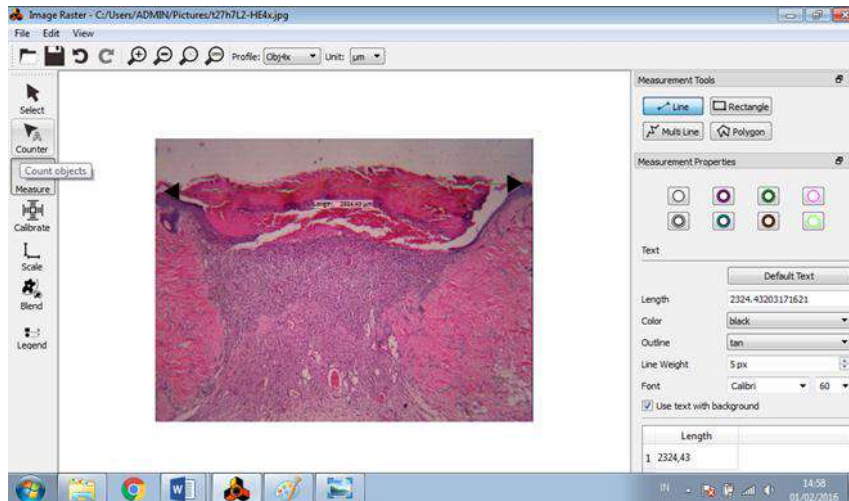
N adalah ketebalan dermis normal di kedua tepi luka

D adalah kedalaman luka dari lapisan epidermis

Penilaian kontraksi luka

Inisiasi kontraksi luka baik WCI mendekati 1

Inisiasi kontraksi luka buruk WCI mendekati 0



Gambar 3.6 Image Raster 3 untuk menghitung kontraksi luka

3.6.3 Epitelisasi

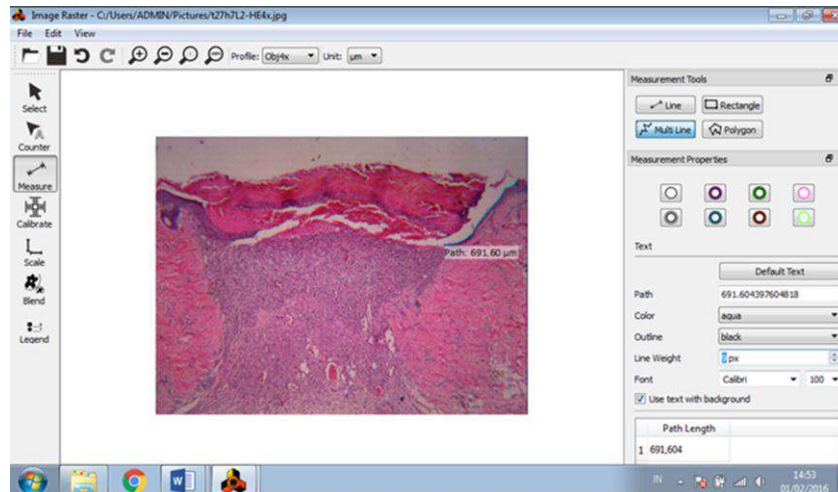
Epitelisasi dinilai dengan rasio epitelisasi dan jarak epitelisasi. Analisis epitelisasi dilakukan pada perlakuan hari ke-3 dan 7.

3.6.3.1 Rasio epitelisasi

Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 4x10 dengan kamera Optilab advance plus. Mikrofoto hasil dokumentasi kemudian dianalisis menggunakan menggunakan *software* Image Raster 3. Panjang area regenerasi epitel adalah penjumlahan area epitelisasi yang telah mengalami regenerasi epitel. Rasio epitelisasi adalah panjang area regenerasi epitel dibagi dengan panjang area epitelisasi. Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan μM . Data disajikan dalam bentuk grafik.

3.6.3.2 Jarak epitelisasi

Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40 kali menggunakan kamera Optilab advance plus. Mikrofoto hasil dokumentasi kemudian dianalisis menggunakan *software* Image Raster 3. Jarak epitelisasi adalah jarak antara dua tepi luka pada area epitelisasi yang telah mengalami regenerasi epitel. Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan μM . Data disajikan dalam bentuk grafik.



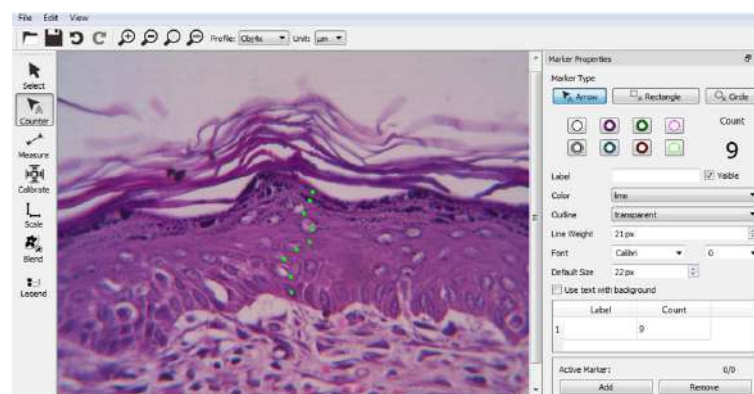
Gambar 3.7 Image Raster 3 untuk menghitung rasio dan jarak epitelisasi

3.6.4 Kualitas penyembuhan luka

Kualitas penyembuhan luka dinilai dengan menganalisis jumlah lapisan epitel, densitas kolagen dan luas area luka.

3.6.4.1 Jumlah lapisan epitel

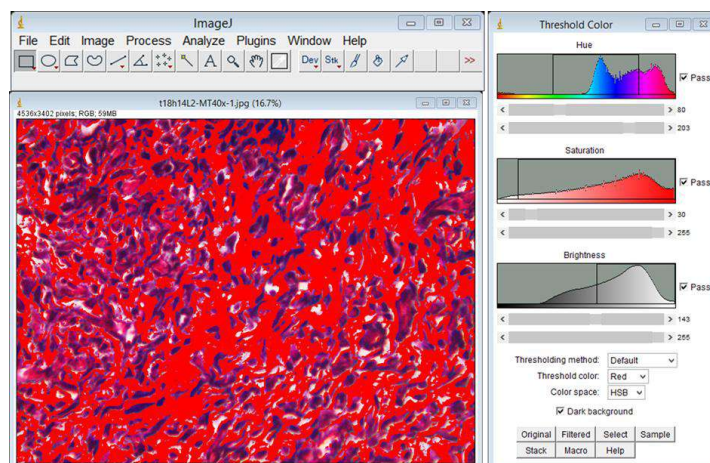
Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x10 menggunakan kamera Optilab advance plus. Mikrofoto hasil dokumentasi kemudian dianalisis menggunakan *software* Image Raster 3. Analisis kualitas epitelisasi dilakukan dengan menghitung jumlah lapisan epitel pada epidermis pada perlukaan hari ke-3, 7 dan 14.⁵⁵ Data kuantitatif yang didapatkan diubah menjadi data kualitatif dengan membuat range dari data terendah ke data tertinggi kemudian dibagi menjadi dua kategori: kurang dan baik. Hasil pengukuran diperoleh dalam bentuk data numerik dan kategorik. Data disajikan dalam bentuk *range*.



Gambar 3.8 Image Raster 3 untuk menghitung jumlah epitel

3.6.4.2 Densitas kolagen

Analisis dilakukan pada perlukaan hari ke-14 dan 28. Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 400 kali menggunakan kamera Optilab advance plus. Penilaian dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pada sediaan dengan pewarnaan Masson's Trichome menggunakan ImageJ (*software* diunduh dari <https://imagej.nih.gov/ij/>) dengan menentukan densitas kolagen pada 5 lapangan pandang. Hasil penilaian diambil dari nilai rata-rata densitas kolagen. Densitas kolagen dinilai dengan menghitung jumlah pixel area berwarna biru. Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan *pixel*. Data kuantitatif yang didapatkan diubah menjadi data kualitatif dengan membuat range dari data terendah ke data tertinggi kemudian dibagi menjadi dua kategori: positif lemah dan positif kuat.^{30,31} Hasil pengukuran diperoleh dalam bentuk data numerik dan kategorik. Data disajikan dalam bentuk *range*.

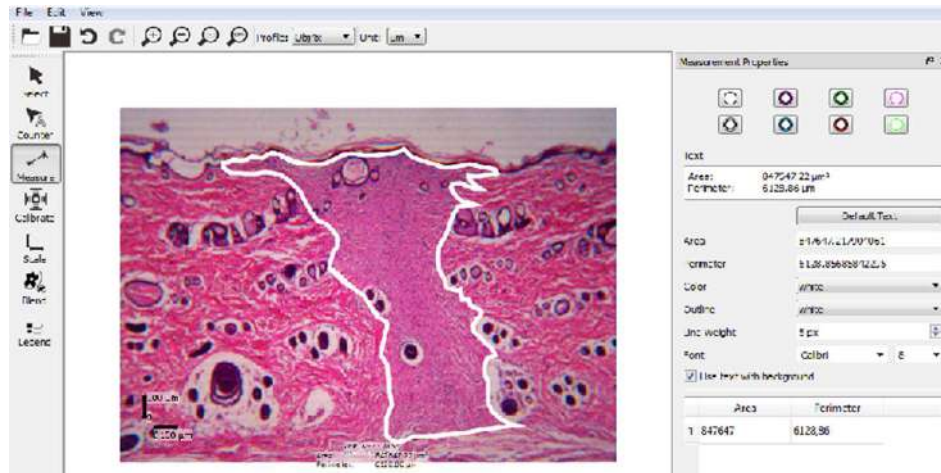


Gambar 3.9 ImageJ untuk menghitung densitas kolagen. Keterangan gambar: area berwarna merah adalah area yang diukur

3.6.4.3 Luas area luka

Analisis dilakukan pada perlukaan hari ke-21 dan 28. Dokumentasi area luka dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40 kali menggunakan kamera Optilab advance plus. Penilaian dilakukan menggunakan *software* Image Raster 3 dengan menentukan luas area luka. Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan μm^2 . Data kuantitatif yang didapatkan diubah menjadi data kualitatif dengan membuat range dari data terendah ke data tertinggi kemudian dibagi menjadi dua kategori: penurunan lemah dan penurunan baik. Hasil

pengukuran diperoleh dalam bentuk data numerik dan kategorik. Data disajikan dalam bentuk tabel.

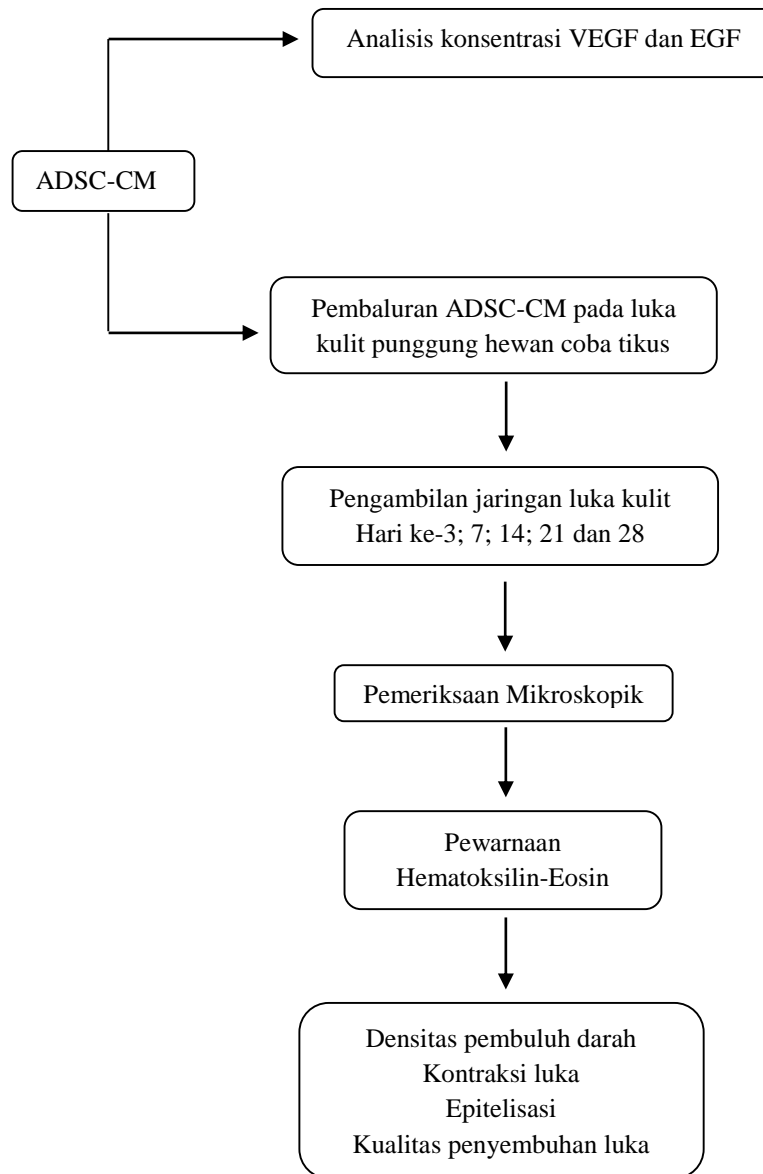


Gambar 3.10 Image Raster 3 untuk menghitung luas area luka.

3.7 Analisis statistik

Data yang diperoleh berbentuk data numerik dan kategorik. Data akan disajikan dalam bentuk tabel, gambar dan grafik. Data penelitian dianalisis menggunakan program SPSS versi 22 dengan uji parametrik ANOVA dan Chi Square. Bila hasil data tidak memenuhi syarat uji parametrik dan Chi Square maka data akan dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan uji Fisher.

3.8 Alur penelitian



BAB 4 HASIL

Efek ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari terhadap tahap proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley telah diteliti dalam studi kami dengan hasil uji statistik tidak ada perbedaan bermakna antara luka baluran ADSC-CM dan luka kontrol. Namun secara kualitatif ditemukan peningkatan tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley. Secara rinci hasil penelitian kami laporkan sebagai berikut.

4.1 ELISA

Pemeriksaan ELISA ditujukan untuk menentukan konsentrasi VEGF dan EGF yang terkandung dalam ADSC-CM *monolayer* dengan inkubasi normoksia selama tiga hari.

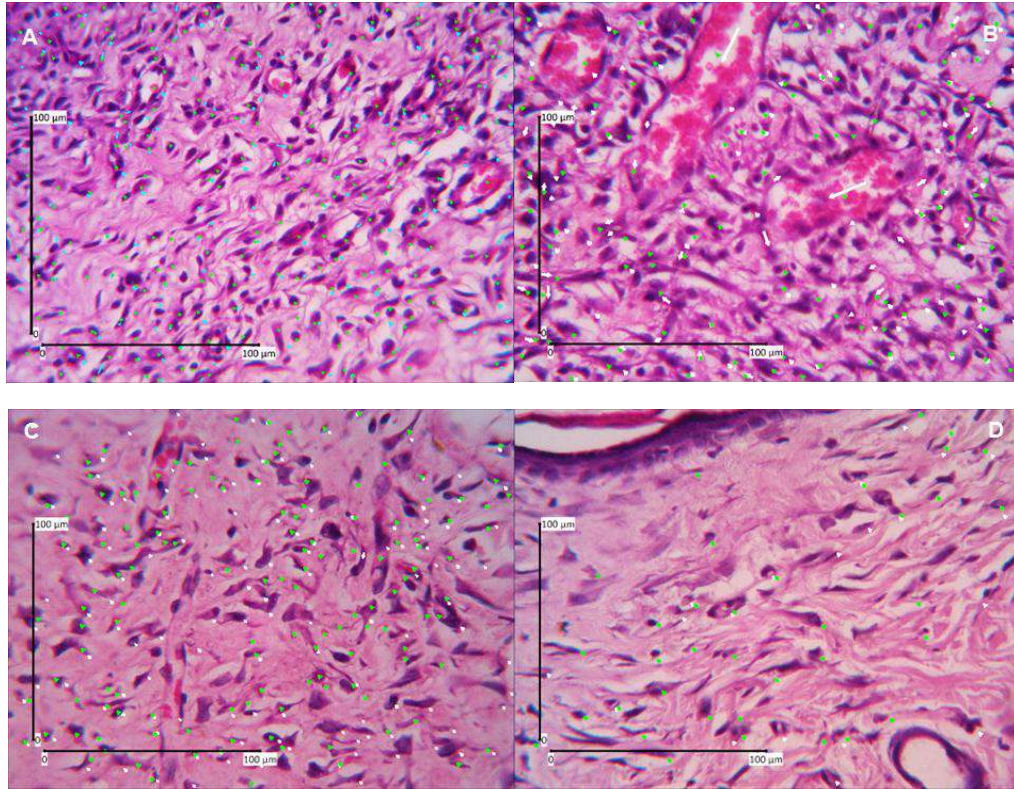
4.1.1 Konsentrasi *vascular endothelial growth factor*

Penentuan keberadaan VEGF dalam ADSC-CM dilakukan *quadruple* dengan nilai absorban: 3,207; 2,462; 2,816 dan 2,794. Rerata VEGF didapat dari perhitungan tiga nilai absorban yang tidak melebihi angka tiga. Hal ini dikarenakan nilai absorban maksimal kurva ini adalah tiga. Hasil pemeriksaan ELISA didapatkan rerata konsentrasi VEGF dalam ADSC-CM sebesar $5052,698 \pm 0,31 \text{ pg/mL}$.

4.1.2 Konsentrasi *epidermal growth factor*

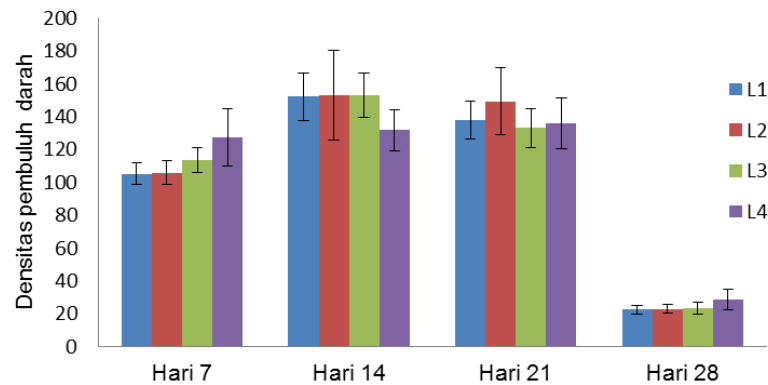
Pemeriksaan ELISA menunjukkan bahwa ADSC-CM mengekspresikan EGF. Pemeriksaan dilakukan *quadruple* dengan nilai absorban: 0,231; 0,239; 0,247 dan 0,234. Rerata konsentrasi EGF dalam ADSC-CM adalah $0,233 \pm 0,08 \text{ pg/mL}$.

4.2 Angiogenesis



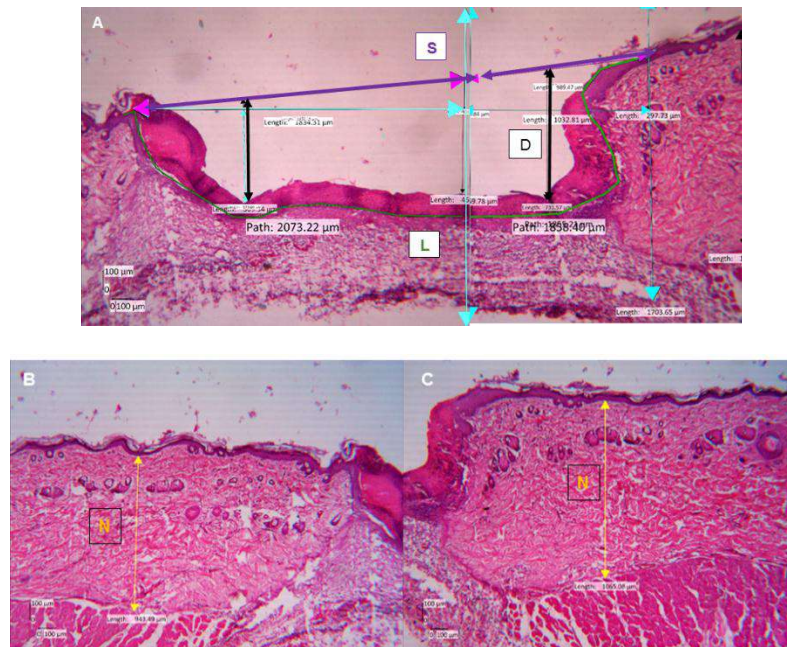
Gambar 4.1. Densitas pembuluh darah dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 400 kali) (A) Hari ke-7; (B) Hari ke-14; (C) Hari ke-21; (D) Hari ke-28. Keterangan gambar: titik hijau menunjukkan hasil perhitungan penilai satu, titik biru dan titik putih menunjukkan hasil perhitungan penilai dua.

Data perhitungan dinilai kesesuaiannya antar dua penilai dengan teknik Bland-Altman. Karena ada ketidaksesuaian antara dua penilai maka data penilaian angiogenesis yang dianalisis adalah data penilai 1. Analisis statistik untuk menilai angiogenesis menunjukkan bahwa proporsi data tidak normal dan tidak homogen sehingga untuk analisis statistik data angiogenesis digunakan uji Kruskal-Wallis. Dari analisis statistik tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna antara luka yang dibalurkan ADSC-CM atau tidak ($p > 0,05$). Data penilaian angiogenesis pada area luka ditampilkan pada gambar 4.1.

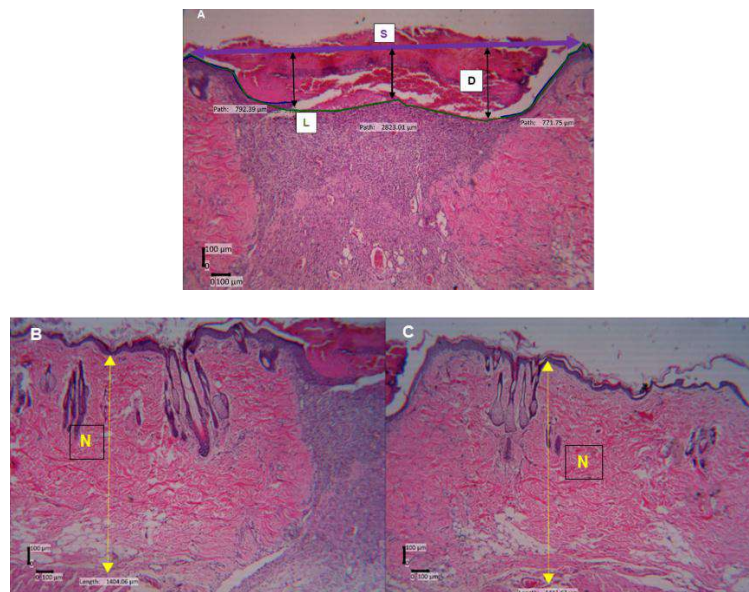


Grafik 4.1 Grafik angiogenesis sediaan luka kulit tikus. Perbandingan densitas pembuluh darah pada sediaan luka kulit tikus dengan pewarnaan HE menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Keterangan gambar: L1 menunjukkan luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2 menunjukkan luka tanpa pembaluran; L3 menunjukkan luka pembaluran medium kultur; L4 menunjukkan luka pembaluran medium basal.

4.3 Kontraksi luka

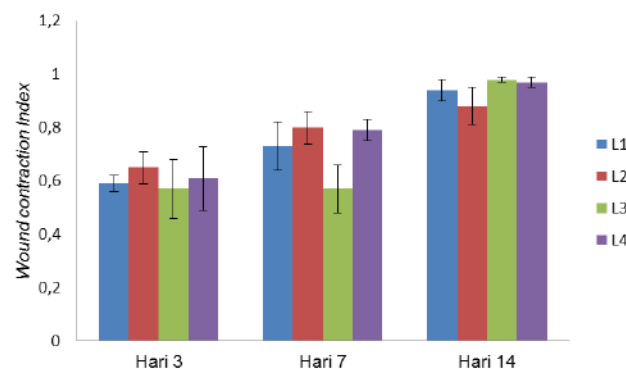


Gambar 4.2 WCI hari ke-3 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali). (A) Sediaan celah luka; (B) Sediaan tepi luka kiri; (C) Sediaan tepi luka kanan. Keterangan gambar: panah ungu menunjukkan jarak antara kedua tepi luka (S), panah hitam menunjukkan kedalaman luka (D), panah kuning menunjukkan ketebalan dermis normal (N), garis hijau menunjukkan panjang area epitelisasi (L), panah biru muda menunjukkan batasan pengukuran. Jarak antara tepi luka menunjukkan penjumlahan hasil penjumlahan panah ungu di kedua gambar; kedalaman luka menunjukkan panah hitam yang terdalam dari kedua gambar; panjang area epitelisasi dihitung dengan menjumlahkan panjang garis hijau di kedua gambar.



Gambar 4.3 WCI hari ke-7 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali). (A) Sediaan celah luka; (B) Sediaan tepi luka kiri; (C) Sediaan tepi luka kanan. Keterangan gambar: panah ungu menunjukkan jarak antara kedua tepi luka (S), panah hitam menunjukkan kedalaman luka (D), panah kuning menunjukkan ketebalan dermis normal (N), garis hijau menunjukkan panjang area epitelisasi (L).

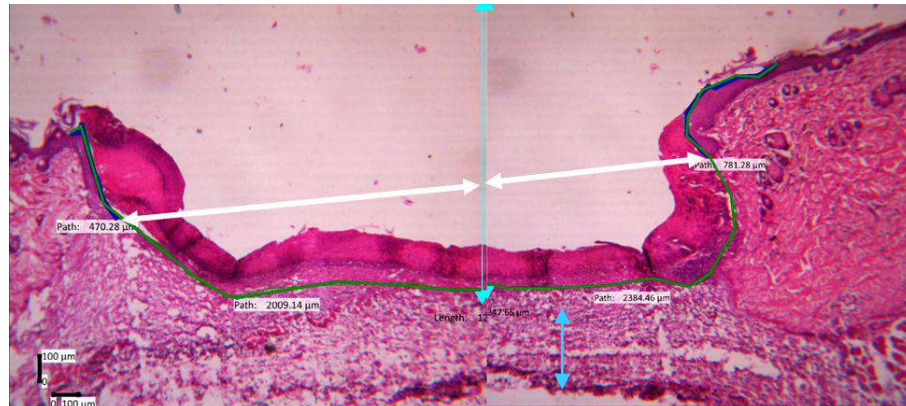
Kontraksi luka dianalisis pada perlakuan hari ke-3, 7 dan 14. Perbedaan jumlah sampel antara perlakuan hari ke-3, 7 dan 14 disebabkan kerusakan jaringan pada sediaan kulit satu tikus hari ke-3 sehingga tidak dapat dilakukan pengukuran kontraksi luka. Hasil kontraksi luka menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara luka yang dibalurkan ADCM dan luka yang tidak dibalurkan. Hasil analisis kontraksi luka ditampilkan pada gambar 4.2 dan 4.3 serta grafik 4.2.



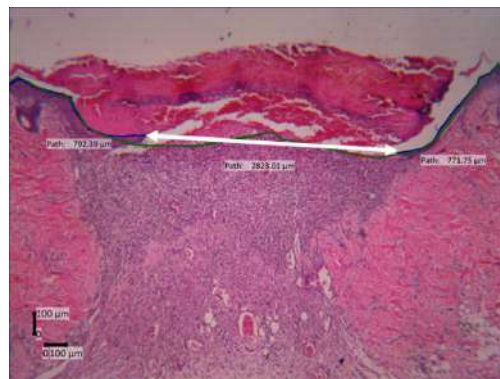
Grafik 4.2 Grafik kontraksi luka pada sediaan luka kulit tikus. Tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) antara luka yang dibalurkan dan luka yang tidak dibalurkan. Keterangan gambar: L1 menunjukkan luka pembaluran ADCM dengan konsentrasi 100%; L2 menunjukkan luka tanpa

pembaluran; L3 menunjukkan luka pembaluran medium kultur; L4 menunjukkan luka pembaluran medium basal.

4.4 Epitelisasi



Gambar 4.4 Epitelisasi hari ke-3 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali). Keterangan gambar: garis hijau menunjukkan panjang area luka, garis biru menunjukkan panjang area regenerasi epitel, panah biru muda menunjukkan batas pengukuran, panah putih menunjukkan jarak dua tepi luka. Panjang area luka dihitung dengan menjumlahkan panjang garis hijau dikedua gambar dan panjang area regenerasi epitel dihitung dengan menjumlahkan panjang garis biru dikedua gambar. Panah putih dihitung dengan menjumlahkan panjang panah putih pada kedua gambar.

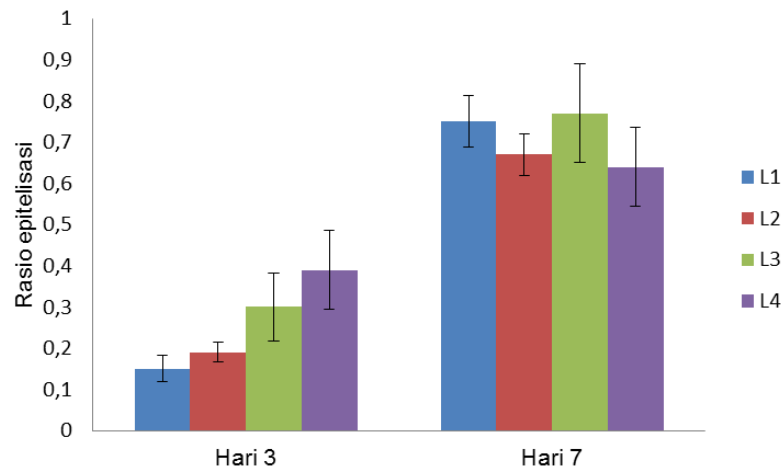


Gambar 4.5 Epitelisasi hari ke-7 dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali). Keterangan gambar: garis hijau menunjukkan panjang area luka, garis biru menunjukkan panjang area regenerasi epitel, panah putih menunjukkan jarak dua tepi luka.

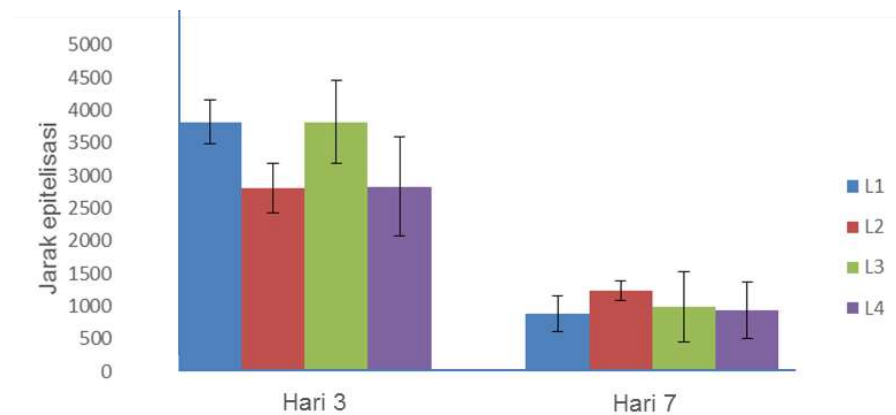
Epitelisasi dianalisis pada perlukaan hari ke-3 dan 7 (gambar 4.4 dan 4.5). Perbedaan jumlah sampel antara perlukaan hari ke-3 dan 7 disebabkan kerusakan jaringan pada sediaan kulit satu tikus hari ke-3 sehingga tidak dapat dilakukan pengukuran epitelisasi. Hasil uji statistik epitelisasi menunjukkan tidak ada perbedaan

bermakna ($p > 0,05$) antara luka yang dibalurkan ADSC-CM dan tidak dibalurkan. Hasil analisis epitelisasi ditampilkan pada grafik 4.3 dan 4.4.

Didapatkan pelebaran celah luka pada luka hari ketiga dan tujuh bila dibandingkan celah luka hari pertama perlukaan pada tikus yang sama serta keterlambatan epitelisasi pada satu luka hari ke-14 dimana luka tersebut adalah luka tanpa pembaluran.



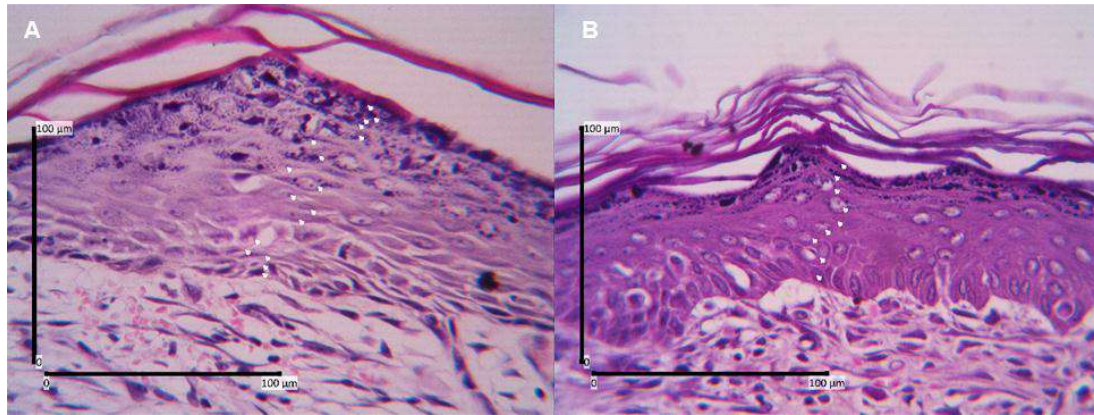
Grafik 4.3 Grafik rasio epitelisasi sediaan luka kulit tikus. Perbandingan ratio epitelisasi pada sediaan luka kulit tikus dengan pewarnaan HE menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Keterangan gambar: L1: luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2: luka tanpa pembaluran; L3: luka pembaluran medium kultur; L4: luka pembaluran medium basal.



Grafik 4.4 Grafik jarak epitelisasi sediaan luka kulit tikus. Perbandingan jarak epitelisasi pada sediaan luka kulit tikus dengan pewarnaan HE menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Keterangan gambar: L1: luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2: luka tanpa pembaluran; L3: luka pembaluran medium kultur; L4: luka pembaluran medium basal.

4.5 Kualitas penyembuhan luka

4.5.1 Jumlah lapisan epitel



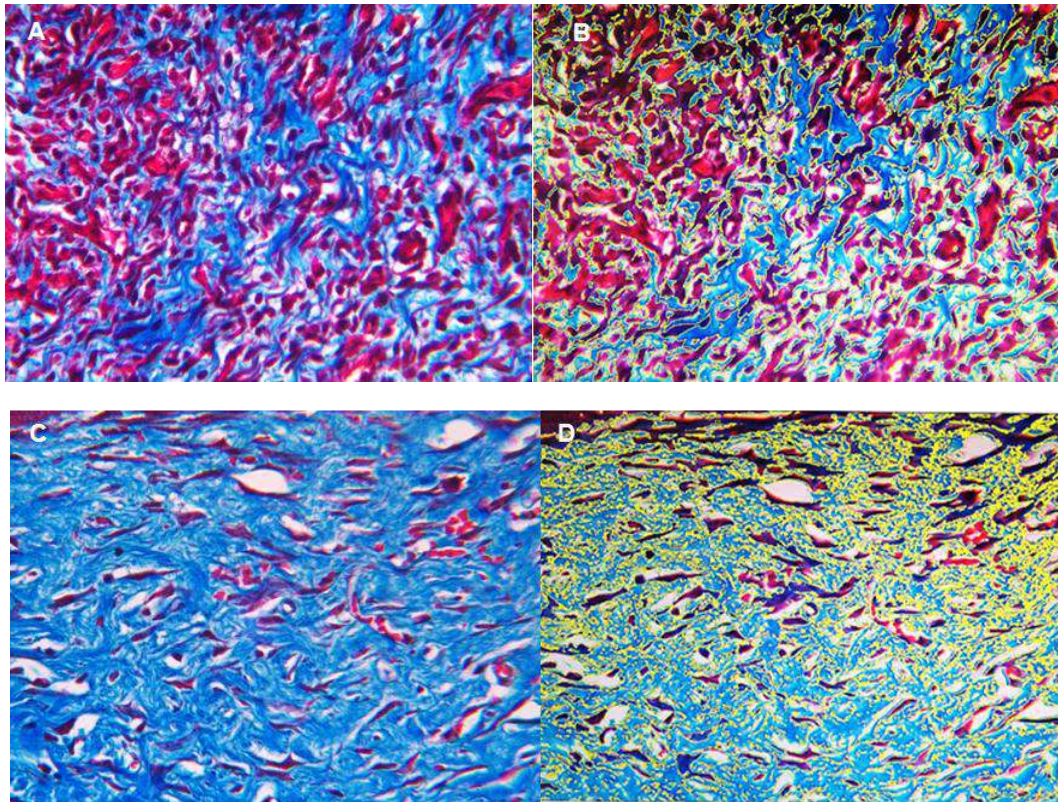
Gambar 4.6 Jumlah lapisan epitel dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 400 kali) (A) Hari ke-7; (B) Hari ke-14. Keterangan gambar: titik putih menunjukkan lapisan epitel pada epidermis.

Jumlah lapisan epitel dianalisis pada perlukaan hari ke-3, 7 dan 14. Analisis statistik untuk menilai data numerik jumlah lapisan epitel menunjukkan bahwa proporsi data tidak normal dan tidak homogen sehingga untuk analisis statistik digunakan uji Kruskal-Wallis. Untuk penilaian data kategorik digunakan uji Fisher karena data penelitian tidak memenuhi syarat Chi square. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka baluran ADSC-CM dan luka kontrol ($p > 0,05$). Jumlah lapisan epitel pada epidermis ditampilkan pada gambar 4.6 dan tabel 4.1

Tabel 4.1 Tabel *range* jumlah lapisan epitel pada epidermis sediaan luka kulit tikus.

	L1	L2	L3	L4
Perlukaan hari ke-3	0-3	0-4	0-4	0-3
Perlukaan hari ke-7	8-19	7-15	11-17	8-13
Perlukaan hari ke-14	7-12	7-11	7-10	7-11

4.5.2 Densitas kolagen



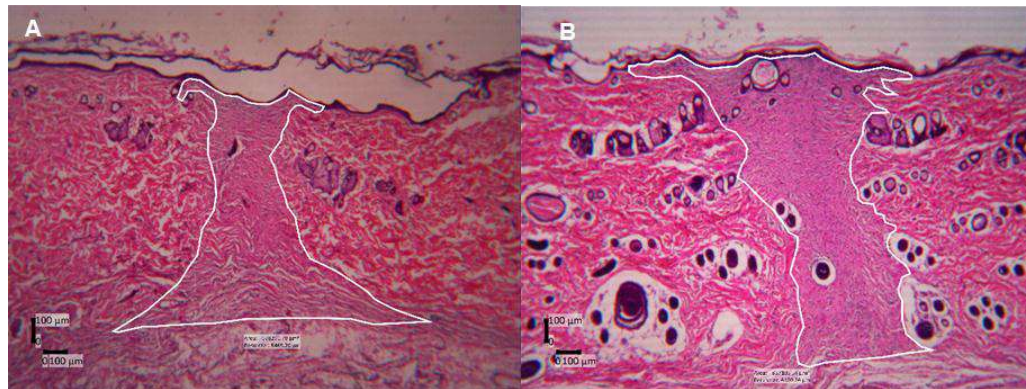
Gambar 4.7 Densitas kolagen dengan pewarnaan Masson's Trichome (pembesaran lensa objektif 400 kali) (A) Hari ke-14; (B) Hari ke-28. Keterangan gambar: area yang dibatasi garis kuning menunjukkan area yang dianalisis dengan ImageJ.

Densitas kolagen dianalisis pada perlukaan hari ke-14 dan 28. Penilaian statistik uji Kruskal Wallis dan uji Fisher menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dengan luka lainnya ($p > 0,05$). Densitas kolagen ditampilkan pada gambar 4.7 dan tabel 4.2.

Tabel 4.2 Tabel *range* densitas kolagen sediaan luka kulit tikus

	L1	L2	L3	L4
Perlukaan hari ke-14	2945188-9882202 <i>pixel</i>	2421588-7734235 <i>pixel</i>	2870265-9203981 <i>pixel</i>	4318235-8511473 <i>pixel</i>
Perlukaan hari ke-28	5228102-10310693 <i>pixel</i>	5643233-10198324 <i>pixel</i>	4911472-11047102 <i>pixel</i>	4856773-10697693 <i>pixel</i>

4.5.3 Luas area luka



Gambar 4.8 Luas area luka dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 40 kali) (A) Hari ke-21 (B) Hari ke-28. Keterangan gambar: area yang dibatasi garis putih menunjukkan area yang dianalisis dengan Image Raster 3.

Luas area dianalisis pada perlukaan hari ke-14, 21 dan 28. Tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) pada parameter luas area luka baik uji Kruskal Wallis maupun uji Fisher. Luas area luka ditampilkan pada gambar 4.8 dan tabel 4.3.

Tabel 4.3 Tabel luas area luka sediaan luka kulit tikus.

	L1	L2	L3	L4
Perlukaan hari ke-14	876081,8 ± 118814,8 μM^2	1001529,7 ± 426847,8 μM^2	784860,3 ± 149110,55 μM^2	846900,33 ± 144501 μM^2
Perlukaan hari ke-21	734749,2 ± 120592,9 μM^2	1967517,1 ± 1119220 μM^2	587676,2 ± 108910,9 μM^2	565572,7 ± 64198,2 μM^2
Perlukaan hari ke-28	686032,7 ± 113552,2 μM^2	681484 ± 111095,9 μM^2	684346,5 ± 93427,1 μM^2	731347,3 ± 116435,4 μM^2

BAB 5 PEMBAHASAN

Pada studi ini efek ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari terhadap tahap proliferasi penyembuhan luka kulit telah diteliti secara kuantitatif maupun kualitatif. Studi ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara luka pembaluran tunggal ADSC-CM dengan luka kontrol. Namun secara kualitatif didapatkan peningkatan proses penyembuhan luka tahap proliferasi seperti rasio epitelisasi dan jarak epitelisasi yang mengindikasikan migrasi epitel terjauh ditemukan pada luka baluran ADSC-CM; jumlah lapisan epitel dalam epidermis terbanyak ditemukan pada luka baluran ADSC-CM serta luka baluran ADSC-CM lebih berpotensi untuk meningkatkan proliferasi epitel dan sintesis kolagen. Luka baluran ADSC-CM juga menurunkan luas area luka antar hari perlukaan lebih baik dari luka lainnya.

Penelitian terdahulu telah membuktikan peranan ADSC dalam meningkatkan proses penyembuhan luka baik pemberian intralesi maupun topikal. Peningkatan proses penyembuhan luka tersebut didominasi oleh efek parakrin *mesenchymal stem cell* (MSC) dibanding dengan proliferasi dan diferensiasi MSC di jaringan.⁵⁶ Berdasarkan hal tersebut penelitian terkini juga mengungkapkan bahwa *conditioned medium* dari kultur sel punca adiposa mengandung sejumlah *growth factor* dan sitokin seperti VEGF, EGF, PDGF dan TGF β .^{11,14} VEGF adalah mitogen spesifik untuk sel endotel vaskular. VEGF adalah komponen kunci proses angiogenesis dalam berbagai proses antara lain penyembuhan luka.^{27,57} Pembaluran ADSC-CM pada luka diharapkan dapat meningkatkan proses angiogenesis pada luka kulit tikus. Epitelisasi merupakan salah satu proses penting penyembuhan luka. Luka kulit tidak akan menutup jika proses epitelisasi tidak berlangsung. Proses ini didominasi oleh migrasi, proliferasi dan diferensiasi keratinosit.^{58,59} Molekul-molekul yang berperan dalam proses ini meliputi EGF, FGF dan TGF- β dengan EGF sebagai regulator kunci epitelisasi.²⁹

Konsentrasi VEGF dan EGF dalam penelitian kami diukur dengan pemeriksaan ELISA. Rerata konsentrasi VEGF dan EGF dalam ADSC-CM adalah $5052,698 \pm 0,31$ pg/mL dan $0,233 \pm 0,08$ pg/mL. ADSC-CM didapat dari kultur ADSC pasase tiga dengan medium kultur : α -MEM dan 10% PRP dalam kondisi normoksia selama tiga hari. Beberapa penelitian lain memperlihatkan variasi konsentrasi VEGF dan EGF di dalam *stem cell-conditioned medium*. Variasi konsentrasi VEGF dan EGF dalam *conditioned medium* pada berbagai penelitian dapat disebabkan oleh perbedaan jenis asal sel dan metode kultur. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa kultur sel *spheroid*, penambahan suplemen baik serum maupun insulin dalam medium basal dan kondisi hipoksia dapat menstimulasi sel untuk mensekresi *growth factor*.^{60,61,62} Durasi dan medium kultur ADSC-CM dapat mempengaruhi besar konsentrasi yang terkandung dalam ADSC-CM.¹¹

Konsentrasi VEGF dan EGF pada *human cord-blood derived stem cell conditioned medium* didapat sebesar 2463 ± 151 pg/mL dan 3286 ± 419 pg/mL. Konsentrasi VEGF dalam ADSC-CM didapat lebih tinggi dibanding *human cord-blood derived stem cell conditioned medium* dan konsentrasi EGF ADSC-CM lebih rendah dari konsentrasi EGF *human cord-blood derived stem cell conditioned medium*. *Conditioned medium* didapat dari sel punca yang dikultur dalam medium kultur (EGM 2-MV) dengan penambahan VEGF, *recombinant human FGF-B* (rhFGF-B), R3-IFG-1, rhEGF, *ascorbic acid*, and GA-1000 pada kondisi inkubasi 5% CO₂ 37°C selama 2-5 hari. Medium EGM-2MV adalah medium kultur endotel yang telah diberi 5% *fetal bovine serum* (FBS) dan VEGF. Variasi konsentrasi VEGF dan EGF disebabkan karena perbedaan asal sel punca, medium kultur yang digunakan, dan suplemen yang ditambahkan.⁶⁰

Kadar VEGF pada ADSC-CM *spheroid* dianalisis oleh Bhang dkk dan Kwon dkk. Bhang dkk melaporkan kadar VEGF dalam ADSC-CM *spheroid* sebesar $14,4 \pm 0,4$ ng/mL. ADSC-CM diambil dari kultur spheroid ADSC-CM pada pasase lima dalam medium kultur α -MEM dan 10% FBS yang diinkubasi dalam inkubator 37°C, 1% O₂ dan 5% CO₂ selama satu hari.⁶³ Pada kultur ADSC-CM *spheroid* Kwon dkk didapat konsentrasi VEGF sebesar $12,3 \pm 2,4$ ng/mL. Medium kultur yang digunakan adalah

α MEM + 10% FBS. Setelah lima pasase ADSC ditempatkan dalam *siliconized spinner flask* dan diputar selama tiga jam pada 70 rpm hingga terbentuk formasi *spheroid*. Selanjutnya ADSC diinkubasi dalam medium tanpa FBS selama dua hari.⁵² Terdapat peningkatan kadar VEGF ADSC-CM *spheroid* dibanding kadar VEGF dalam ADSC-CM *monolayer* penelitian kami. Hal ini membuktikan kultur *spheroid* menstimulasi sel punca untuk mensekresi *growth factor* antara lain VEGF.

Didapat variasi konsentrasi VEGF pada ADSC-CM *monolayer* pada berbagai penelitian. Konsentrasi VEGF dalam ADSC-CM *monolayer* dianalisis oleh Kwon dkk, Zhou dkk dan She dkk. Zhou dkk mengkultur ADSC dalam medium DMEM dengan penambahan 10% FBS. ADSC kemudian diinkubasi dalam keadaan hipoksia dengan medium DMEM tanpa serum selama tiga hari.¹³ Kwon dkk menggunakan medium basal dan kondisi inkubasi yang sama dengan penelitian kami namun serum yang ditambahkan 10% FBS.⁵² Konsentrasi VEGF dalam ADSC-CM Zhou dkk dan Kwon dkk sebesar $136,04 \pm 29,23$ pg/mL dan 560 ± 220 pg/mL.^{13,52} Penambahan suplemen pada medium kultur dalam menstimulasi sekretom sel punca tidak hanya terbatas pada pemberian *growth factor* namun juga substansi lain seperti insulin. She dkk menganalisis konsentrasi VEGF pada ADSC-CM yang diberi tambahan insulin pada medium kultur ADSC. Terdapat peningkatan konsentrasi VEGF pada ADSC-CM dengan insulin bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Konsentrasi VEGF pada kultur dengan dan tanpa insulin sebesar $643,28 \pm 63,57$ pg/mL dan $286,52 \pm 46,68$ pg/mL.⁶¹ Didapat jumlah konsentrasi VEGF yang lebih besar pada penelitian kami dibanding Zhou dkk, Kwon dkk dan She dkk. Perbedaan metode kultur antar penelitian adalah medium basal, jenis serum yang ditambahkan dan kondisi inkubasi.

Inukai T pada *conditioned medium* MSC yang didapat dari Lonza diperoleh konsentrasi VEGF sebesar $468,8 \pm 108$ pg/mL. MSC dikultur dalam medium DMEM dan diinkubasi dalam inkubator 37°C, 5% CO₂ dan 95% udara. *Conditioned medium* diambil pada pasase ke-3 sampai 9 MSC.⁶⁴ Konsentrasi VEGF penelitian kami yang lebih tinggi dibanding konsentrasi Inukai T.

Efek parakrin ADSC tergantung pada jenis dan konsentrasi sekretom yang dihasilkan. Analisis histologi pada penelitian kami adalah densitas pembuluh darah,

densitas kolagen, WCI, rasio epitelisasi, jarak epitelisasi, jumlah lapisan epitel dan luas area luka. Uji statistik terhadap analisis histologi menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka yang dibalur ADSC-CM dengan tiga kelompok kontrol lain, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol medium kultur dan kelompok kontrol pelarut.

Hasil analisis densitas pembuluh darah pada penelitian kami bervariasi. Pada hari perlukaan ke-7 dan 14 pembuluh darah baru masih berupa tunas dan pembuluh darah kecil yang bercabang ke segala arah (*sprouting*). Gambaran histologi kedua sediaan tersebut adalah pembuluh darah yang dibatasi sel endotel dengan/tanpa otot polos. Lumen pembuluh darah tampak bulat dan padat. Luka pembaluran medium kultur merupakan luka dengan densitas pembuluh darah terbanyak pada perlukaan hari ke-7 dan luka tanpa pembaluran adalah luka dengan densitas pembuluh darah terbanyak pada perlukaan hari ke-14. Pematangan proses angiogenesis ditandai oleh perekrutan perisit, otot polos dan regresi percabangan pembuluh darah baru. Pada sediaan hari perlukaan ke-21 dan 28 dapat ditemukan regresi pembuluh darah yang terlihat pada penurunan densitas pembuluh darah. Pembuluh darah telah dilapisi sel otot polos dan dapat ditemukan perisit pada pembuluh darah yang terpotong memanjang. Luka pembaluran medium basal dan luka pembaluran ADSC-CM merupakan luka dengan densitas pembuluh darah terendah pada hari 21 dan 28.

Densitas kolagen dinilai untuk melihat pembentukan serat kolagen pada area luka. Peningkatan densitas kolagen menunjukkan peningkatan sintesis kolagen oleh fibroblas pada area luka. Analisis statistik menunjukkan perbedaan tidak bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dan luka kontrol. Pada hari ke-14 densitas kolagen tertinggi terlihat pada luka pembaluran ADSC-CM yang menandakan secara kualitatif pada hari ke-14 sintesis kolagen terbanyak ditemukan pada luka baluran ADSC-CM. Kepadatan serat kolagen tertinggi pada hari ke-28 tampak pada luka baluran medium basal. Pada tahap *remodeling* terjadi sintesis dan reabsorpsi kolagen yang terjadi secara terus menerus. Proses tersebut memperoleh keseimbangannya pada hari ke-21.⁴ Tingginya densitas kolagen luka baluran ADSC-CM pada hari ke-14 namun tidak pada hari ke-28 dapat memperlihatkan bahwa luka baluran ADSC-CM telah memperoleh

keseimbangan antara sintesis dan reabsorpsi kolagen lebih cepat bila dibanding luka baluran medium basal. Ketidakseimbangan sintesis dan reabsorpsi kolagen pada tahap *remodeling* dapat menyebabkan terjadinya jaringan parut patologik.⁴ Luka baluran ADSC-CM pada pengamatan densitas kolagen hari ke-14 menunjukkan potensi sintesis kolagen yang tinggi bila dibanding luka tanpa pembaluran. Sedangkan pada hari ke-28 peluang luka pembaluran ADSC-CM dalam mensintesis kolagen lebih besar dari luka tanpa pembaluran maupun luka pembaluran medium basal.

Kontraksi luka dipengaruhi oleh myofibroblas yang merupakan differensiasi fibroblas. Migrasi fibroblas melalui matriks ekstrasel pada fase awal penyembuhan luka merupakan komponen penting bagi kontraksi luka.⁶⁵ Indikator tersebut (WCI) menilai kontraksi luka pada penyembuhan luka kulit. Penilaian indeks kontraksi luka (WCI) mencerminkan proses kontraksi kulit secara menyeluruh pada celah luka.²⁸ Analisis WCI menampilkan hasil yang beragam antar hari perlukaan. Luka tanpa pembaluran adalah luka dengan WCI terbaik pada hari perlukaan ke-3 dan ke-7, sedangkan luka pembaluran medium basal adalah luka dengan WCI terbaik pada hari perlukaan ke-14.

Penilaian epitelisasi pada penelitian kami dilakukan pada hari ke-3 dan 7 perlukaan dengan jumlah sampel 11 tikus. Hal ini dikarenakan jaringan pada satu sampel tikus hari ke-3 rusak sehingga tidak dapat dianalisis. Seluruh luka telah mengalami epitelisasi sempurna pada hari ke-14 kecuali satu luka pada satu tikus dimana luka tersebut adalah luka tanpa pembaluran. Luka yang memperlihatkan epitelisasi terbaik pada tiap hari perlukaan sangat beragam. Hasil rasio epitelisasi yang tertinggi dan jarak epitelisasi yang terendah mengindikasikan migrasi epitel yang terjauh. Parameter rasio epitelisasi mengungkapkan luka pembaluran medium kultur memberikan rasio terbaik pada hari perlukaan ke-3 dan luka pembaluran medium basal memberikan rasio terbaik pada hari perlukaan ke-7. Hasil analisis jarak epitelisasi menunjukkan pada hari ke-3 luka tanpa pembaluran memiliki jarak epitelisasi terendah dan pada hari perlukaan ke-7 luka pembaluran ADSC-CM memberikan jarak epitelisasi terendah. Walaupun tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik namun terdapat kecenderungan ADSC-CM dapat menstimulasi proses epitelisasi. Pada analisis rasio epitelisasi terlihat luka

dengan baluran ADSC-CM memiliki peningkatan rasio epitelisasi terbesar antar hari tiga dan tujuh bila dibanding luka lainnya. Hal tersebut juga terlihat pada perbandingan jarak epitelisasi antara hari tiga dan tujuh. Luka pembaluran ADSC-CM memiliki penurunan jarak antar luka terbesar dibanding luka lainnya.

Analisis jumlah lapisan epitel memberikan hasil yang bervariasi antar luka dan tidak ditemukan perbedaan bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dan luka kontrol. Migrasi epitel telah tampak pada hari perlukaan ke-3. Seiring berjalannya waktu penyembuhan epitelisasi terlihat meningkat pada hari tujuh dan mulai menurun pada hari 14. Secara kualitatif ditemukan perbedaan jumlah lapisan epitel antara luka baluran ADSC-CM dan luka kontrol. Luka pembaluran ADSC-CM memiliki jumlah lapisan epitel terbanyak pada perlukaan hari ke-7 dan 14 bila dibandingkan luka lainnya. Selain itu luka baluran ADSC-CM lebih berpotensi meningkatkan proliferasi epitel bila dibanding luka tanpa pembaluran pada perlukaan hari ke-14.

Luas area luka menilai luas area perlukaan pada hari ke-14, 21 dan 28. Seiring maturasi jaringan perlukaan diharapkan terjadi penurunan luas area luka bila dibandingkan hari sebelumnya. Analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antar luka namun secara kualitatif ditemukan penurunan luas area luka antar hari perlukaan hanya terjadi pada luka pembaluran ADSC-CM. Hal tersebut menunjukkan bahwa luka baluran ADSC-CM lebih berpotensi dalam menurunkan luas area luka bila dibanding luka lainnya.

Penelitian yang menginvestigasi efek ADSC-CM terhadap penyembuhan luka *in vivo* masih minim dilakukan. Penelitian terdahulu mengenai efek ADSC-CM lebih banyak dilakukan secara *in vitro*. Angiogenesis luka kulit tikus dengan pemberian tunggal ADSC-CM sferoid telah diinvestigasi oleh Kwon dkk. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan bermakna pada luka yang diinjeksi ADSC-CM sferoid. Angiogenesis dianalisis menggunakan pewarnaan mikroskop fluoresen von Willebrand (vWF) dan *smooth muscle alpha actin* (SM- α aktin). Konsentrasi VEGF yang terkandung dalam ADSC-CM sferoid adalah $12,3 \pm 2,4$ ng/mL.⁵²

Efek berbagai konsentrasi ADSC-CM terhadap migrasi sel endotel, fibroblas dan keratinosit secara *in vitro* telah dianalisis oleh Hu dkk. Penelitian tersebut menemukan

bahwa secara *in vitro* konsentrasi ADSC-CM yang meningkatkan migrasi sel endotel, fibroblas dan keratinosit secara maksimum adalah ADSC-CM dengan konsentrasi 50%. Peningkatan konsentrasi ADSC-CM menimbulkan hambatan pada migrasi sel endotel, fibroblas dan keratinosit.¹⁸ Belum diketahui pasti penyebab hambatan tersebut, mungkin disebabkan karena perbedaan konsentrasi optimal antara *growth factor* yang menginduksi dan menghambat migrasi sel-sel tersebut.¹⁸ Pada penelitian ini ADSC-CM yang diambil pada pasase sel ke-3 sampai 7 dengan medium DMEM-F12 dan 10% FBS.¹⁶ Tidak dilakukan pemeriksaan konsentrasi *growth factor* pada penelitian Hu dkk sehingga tidak dapat ditentukan berapa konsentrasi yang diaplikasikan.

Aplikasi ADSC-CM pada luka *post fractional CO₂ laser* oleh Zhou dkk memperlihatkan tidak ada peningkatan bermakna pada gambaran histopatologis angiogenesis hari ke-21.¹³ Hal ini mungkin disebabkan karena konsentrasi VEGF terlalu rendah untuk menginduksi angiogenesis *in vivo*. Konsentrasi minimum efektif VEGF untuk menginduksi angiogenesis *in vivo* adalah 5000 pg/mL.^{52,63} Dalam penelitian Zhou dkk epitelisasi luka menunjukkan perbedaan bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dan luka tanpa pembaluran.¹³ Tidak dilakukan analisis konsentrasi EGF dalam ADSC-CM penelitian Zhou dkk sehingga tidak dapat ditentukan berapa konsentrasi EGF yang diaplikasikan.

Kontraktilitas fibroblas secara *in vitro* telah dilaporkan oleh Lee dkk. Penelitian ini menilai kemampuan fibroblas mengerutkan celah antar kolagen. ADSC-CM didapatkan pada pasase sel ke-4 dan dikultur pada kondisi normoxia dalam medium kultur DMEM dan 10% FBS. Pada akhir penelitian didapatkan peningkatan kontraktilitas pada fibroblas yang diberikan ADSC-CM 50%. Secara *in vitro* migrasi dan kontraktilitas fibroblas meningkat bermakna pada aplikasi ADSC-CM 50%.¹⁵ Hal ini mengindikasikan kemampuan ADSC-CM menstimulasi kemampuan kontraksi luka.

Peran AAPE terhadap migrasi dan proliferasi keratinosit secara *in vitro* telah diteliti oleh Moon dkk. Efek AAPE pada keratinosit secara *in vitro* dianalisis menggunakan *migration assay* dan *chemotaxis assay*. Pada akhir penelitian didapat peningkatan bermakna pada proliferasi dan migrasi keratinosit dengan AAPE

(konsentrasi 1,22 $\mu\text{g/mL}$). Namun peningkatan proliferasi keratinosit hanya terjadi pada konsentrasi AAPE 0-1,25 $\mu\text{g/mL}$. AAPE didapat dari kultur ADSC menggunakan medium kultur DMEM-F12 dan penambahan 10% FBS. ADSC-CM diambil pada pasase empat. ADSC-CM yang berisi 1×10^6 sel dikultur dalam medium hingga mencapai jumlah sel 5×10^8 . Selanjutnya ADSC diinkubasi dalam medium tanpa FBS pada keadaan hipoksia selama 2 minggu untuk kemudian diambil mediumnya. AAPE adalah *conditioned medium* yang berasal dari produksi masif ADSC.⁵⁰ Walau hasil penelitian *in vitro* menunjukkan peningkatan bermakna, namun masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menilai efeknya terhadap epitelisasi *in vivo*.

Ketidakterbacaan dalam perhitungan densitas pembuluh darah dapat dikarenakan konsentrasi VEGF tidak optimal, perlunya pemberian ADSC-CM berulang dan adanya keterbatasan penelitian dalam menghitung densitas pembuluh darah. Konsentrasi minimum efektif VEGF untuk menginduksi angiogenesis *in vivo* adalah 5000 pg/mL.^{52,63} Penelitian kami mengaplikasikan konsentrasi VEGF sebesar $5052,698 \pm 0,31 \text{ pg/mL}$ sedangkan perbedaan bermakna didapatkan pada aplikasi konsentrasi VEGF sebesar $12,3 \pm 2,4 \text{ ng/mL}$ oleh Kwon dkk.⁵² Penyembuhan luka dengan aplikasi VEGF memerlukan pemberian berulang untuk mencapai hasil optimal.⁶⁷ ADSC-CM mengandung sitokin dan *growth factor* yang memiliki waktu paruh pendek, maka disarankan aplikasi ADSC-CM diberikan secara berulang.¹¹ Pemberian tunggal ADSC-CM pada penelitian ini dilakukan karena jumlah ADSC-CM yang dimiliki terbatas. Penelitian ini memiliki keterbatasan berupa teknik perhitungan densitas pembuluh darah berdasarkan morfologi pada sediaan dengan pewarnaan rutin HE. Pada teknik ini cukup sulit menentukan apakah struktur yang dilihat pembuluh darah atau bukan, terutama untuk menentukan pembuluh darah yang kecil. Pada proses angiogenesis morfologi pembuluh darah yang paling banyak dijumpai berupa pembuluh darah yang berukuran kecil atau tunas. Untuk meningkatkan keakuratan penilaian angiogenesis, dapat dilakukan pengamatan pada sediaan yang diberi pewarnaan khusus seperti pewarnaan imunohistokimia (IHK) CD 31, IHK CD 34, pewarnaan mikroskop fluoresen vWF dan SM- α aktin.^{30,52} Pada penelitian ini tidak dilakukan pewarnaan khusus karena kendala dana penelitian.

Hasil penelitian kami menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dan luka tanpa pembaluran dalam parameter rasio epitelisasi, jarak epitelisasi dan jumlah lapisan epitel. Ketidakbermaknaan tersebut kemungkinan dikarenakan konsentrasi EGF dalam ADSC-CM pada penelitian ini tidak optimal untuk menginduksi epitelisasi *in vivo* dan frekuensi pemberian ADSC-CM yang terbatas. Peningkatan epitelisasi yang bermakna dengan pemberian tunggal ADSC-CM *monolayer* telah dibuktikan oleh Zhou dkk.¹³ Perbedaan metode kultur antara penelitian Zhou dan penelitian kami dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi EGF yang disekresi oleh ADSC. Penelitian terdahulu menemukan bahwa frekuensi pemberian EGF perlu diulang untuk menstimulasi epitelisasi. Efek topikal *recombinant human* EGF (rhEGF) pada luka *full-thickness* kulit tikus Sprague Dawley memberikan hasil penutupan luka yang lebih cepat pada luka tikus dengan pemberian rhEGF berulang.⁶⁷ Penelitian kami menemukan satu luka dengan epitelisasi yang terlambat dan pelebaran celah luka dibanding hari sebelumnya. Hal tersebut dapat disebabkan karena faktor stres pada tikus coba. Faktor stres dapat menurunkan proses penyembuhan luka secara signifikan.⁶⁸ Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis peran faktor tersebut.

Efek ADSC-CM pada densitas kolagen dan kontraksi luka secara *in vivo* belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini membalurkan ADSC-CM 100% ke luka kulit tikus. Pada penelitian ini penilaian kontraksi luka dilakukan pada hari ke-3, 7 dan 14 perlukaan dengan jumlah sampel 17 tikus. Analisis densitas kolagen dinilai pada perlukaan hari ke-14 dan 28 dengan jumlah sampel 12 tikus. Penelitian kami membuktikan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara luka dengan atau tanpa pembaluran ADSC-CM. Hal ini dapat disebabkan karena diperlukan konsentrasi optimal *growth factor* yang dapat menstimulasi migrasi, proliferasi dan kemampuan kontraktilitas fibroblas. ADSC-CM adalah kombinasi berbagai *growth factor* dan sitokin dengan konsentrasi yang bervariasi. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan metode pemberian yang optimal baik dari konsentrasi maupun frekuensi pemberian.

Secara kualitatif penurunan luas area luka antar hari perlukaan pada luka baluran ADSC-CM lebih baik dibanding luka lainnya. Hal ini menunjukkan ADSC-CM dapat menstimulasi *remodeling* penyembuhan luka. Namun masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menginvestigasi efek tersebut.

Proses penyembuhan luka pada tingkat *in vivo* dan *in vitro* berbeda karena pada penyembuhan luka *in vivo* terjadi sangat komplek.¹⁶ Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis peran ADSC-CM secara *in vivo* karena ADSC-CM merupakan *cocktail* berbagai sitokin dan *growth factor* yang dapat mempengaruhi berbagai aktivitas seluler dan molekuler proses penyembuhan luka.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara luka pembaluran tunggal ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoxia selama tiga hari dan luka kontrol dalam meningkatkan kualitas dan kuantitas tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley dengan parameter densitas pembuluh darah, kontraksi luka, rasio epitelisasi, jarak epitelisasi, jumlah lapisan epitel, densitas kolagen dan luas area luka. Namun secara kualitatif ditemukan peningkatan tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley.

Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan dilakukan penelitian lanjutan :

1. Metode kultur yang tepat sehingga didapat jumlah konsentrasi *growth factor* yang optimal untuk menginduksi berbagai proses penyembuhan luka.
2. Metode pemberian ADSC-CM dari segi frekuensi maupun cara pemberian yang dapat menstimulasi proses penyembuhan luka.
3. Metode analisis yang lebih baik untuk menilai angiogenesis penyembuhan luka seperti pewarnaan khusus IHK dan mikroskop fluoresen.

Daftar Pustaka

1. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery*. 2007;26(2):31-7
2. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg*. 2008;16:585-601
3. Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM. Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing. *Adv Wound Care*. 2012;1(1):17-21
4. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanism. *J Int Med Res*. 2009;37:1528-42
5. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25:9-18
6. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*. 2010;203:93-8
7. Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-doko A, Marra KG. Adipose-derived Stem Cells for Wound Healing Applications. *Ann Plas Surg*. 2011;66(2):210-5
8. Nie C, Yang D, Morris SF. Local delivery of adipose-derived stem cells via acellular dermal matrix as a scaffold: a new promising strategy to accelerate wound healing. *Med Hypotheses*. 2009;72:679-82
9. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28
10. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D, Huang JI, Mizuni H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-95
11. Pawitan JA, Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Research International*. 2014;2014

12. Kim J, Song SH, Kim KL, Ko JJ, Im JE, Yie SW, et al. Human cord blood-derived endothelial progenitor cells and their conditioned medium exhibit therapeutic equivalence for diabetic wound healing. *Cell Transplant*. 2010;19:1635-44
13. Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, et al. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *Biomed Res Int*. 2013;2013:519126
14. Kim WS, Park Bs Sung JH. The wound healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(7):879-87
15. Lee SH, Jin SY, Song JS, et al. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann Dermatol*. 2012;24(2):136-43
16. Hu L, Zhao J, Liu J, Gong N, Chen L. Effects of adipose stem cell-conditioned medium on the migration of vascular endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. *Exp Ther Med*. 2013;5:701-6
17. Gartner L, Hiatt J. *Color textbook of histology*. Edisi 3. Singapura: Elsevire; 2007
18. Hoath SB, Leahy DG. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *J Invest Dermatol*. 2003;121:1440-6
19. Menon GK. New insight into skin structure: stratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:3-17
20. Koch S, Kohl K, Klein E, Bubnoff DV, Bieber T. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis and migration. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:163-8
21. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002;12(4):390-401
22. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49:35-43

23. Diegelmann RF, Evans MC. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-9
24. Cazander G, Jukema GN, Nibbering PH. Complement Activation and Inhibition in Wound Healing. *Clin Dev Immunol.* 2012;1-14
25. Pakyari M, Farrokhi A, Malarlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2012;2:215-24 DOI: 10.1089/wound.2012.0406
26. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127:514-55
27. Greaves NS, Ashcorft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci.* 2013;72(3):206-17
28. Lemo N, Marignac G, Lilin T, Reyes-Gomez E, Crosaz O, Ehrenfest DMD. Cutaneous reepithelialization and wound contraction after skin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and remodelling index. *Vet Arhiv.* 2010;80(5):637-59
29. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):274-86
30. Gupta A, Pramod K. Assesment of the histological state of the healing wound. *Plast Aesthet Res.* 2015;2:239-42
31. Triyono B. Perbedaan tampilan kolagen di sekitar luka insisi pada tikus wistar yang diberi infiltrasi penghilang nyeri levobupivakain dan yang tidak diberi levobupivakain [tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2005
32. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factors in wound healing. *J Surg Res.* 2009;153(2):347-58
33. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70

34. Hardswicke J, Schmaljohann D, Boyce D, Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing- past, present and future perspectives. *Surgeon*. 2008;6(3):172-7
35. Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IbeGF-1 and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci*. 2003;116:3227-38
36. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:169-83
37. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009;217:144-60
38. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res*. 2014;163(4):399-408
39. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009;76:56-66
40. Bassi G, Pacelli L, Carusone R, Zanoncello J, Krampera M. Adipose-derived stromal cells (ASCs). *Transfus Apher Sci*. 2012;47(2):193-8
41. Cheng KH, Kuo TL, Kuo KK, Hsiao CC. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Medicine, Biomarkers and Health Sciences*. 2011;3:53-62
42. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010;21(11):1783-7
43. Ong WK, Sugii S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(6):1083-6
44. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*. 2010;316:2213-19

45. Yang D, Xu J, Zhang J, Nie C, Si Z, Jin X. Locally Administered Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Wound Healing Through Differentiation and Vasculogenesis. *Cell Transplant* 2011;20:205-16
46. Ebrahiman TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, Cousin B, Gourmelon P, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:503-10
47. Huang SP, Huang CH, Shyu JF, Lee HS, Chen SG, Chan JYH, et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J Biomed Sci.* 2013;20:51
48. Collawn SS, Patel S. Adipose-derived stem cell, their secretome and wound healing. *J Cell Ther.* 2014;Vol.5 Issue 3
49. Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie.* 2013;95(2013):2222-28
50. Moon KM, Park YH, Lee JS, Chae YB, Kim MM, Kim DS, et al. The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 1239-1257
51. Amos PJ, Kapur SK, Stapor PC, Shang H, Bekiranov S, Khurgel M, et al. Human adipose-derived stromal cells accelerates diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:1595-1606
52. Kwon SH, Bhang SH, Jang HK, Rhim T, Kim BS. Conditioned medium of adipose-derived stromal cell culture in three-dimensional bioreactors for enhanced wound healing. *J Surg Res.* 2015;194:8-17
53. Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Guidelines. Iowa: IACUC: Anesthesia. c2014 [cited 2015 Jan 13]. Available from <http://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>
54. Juniarti. Pengaruh pemberian ekstrak daun jarak tintir (*Jatropha Multifida* L) secara topikal pada proses inflamasi dan fibroplasia luka sayat kulit [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2014

55. Moenadjat Y, Merlina M, Surjadi CF, Sardjono CT, Kusnadi Y, Sandra F. The application of human umbilical cord blood mononuclear cells in the management of deep partial thickness burn. *Med J Indones*. 2013;22:92-9
56. Walter MNM, Wright KT, Fuller HS, MacNeil S, Johnson WEB, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*. 2010;316:1271-81
57. Chen L, Terdget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *Plos One*. 2008;3(4):e1886
58. Belavia G, Fasanaro P, Melchionna R, Capogrossi MC, Napolitano M. Transcriptional control of skin reepithelialization. *J Dermatol Sci*. 2014;73(1):3-9
59. Christian L, Baum MD, Christopher J. Normal cutaneous wound healing: clinical corelation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 2005;31(6):674-86
60. Kim J, Lee JH, Yeo SM, Chung HM, Chae JI. Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cell that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing. *In Vitro Cell Dev Biol*. 2014;50:146-54
61. She T, Hu D, Zhang J, Liu J, Chen G, Cai W, et al. Cytobiological effect of adipose-derived stem cells treated with insulin on HaCat cells. *Zhonqquo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2009;23(6):727-31
62. Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, et al. Hair growth stimulation by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res*. 2010;31(1):27-34
63. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014;22(4):862

64. Inukai T, Katagiri W, Yoshimi R, Osugi M, Kawai T, et al., Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochem and Biophys Res commun.* 2013;430(2):763–8
65. Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction: basic and clinical features. *Hand Clin.* 2000;16(2):289-302
66. Kryger Z, Zhang F, Dogan T. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *J Plast Surg.* 2000;53(3):234-9
67. Kwon YB, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Baek RM, Kim JY, et al. Topical application of epidermal growth factors accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *J Vet Sci.* 2006;7(2):105-9
68. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29

Lampiran 1 : Keterangan lolos kaji etik



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

Nomor : *142* /UN2.F1/ETIK/2015

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Efek Aplikasi Topikal Conditioned Medium Sel Punca Adiposa terhadap Angiogenesis, Kualitas Kolagen dan Reepitelisasi Luka Kulit Tikus Sprague Dawley".

Peneliti Utama
Principal Investigator

: Twidy Tarcisia

Nama Institusi
Name of the Institution

: Program S2 Biomedik Kekhususan Histologi FKUI

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.



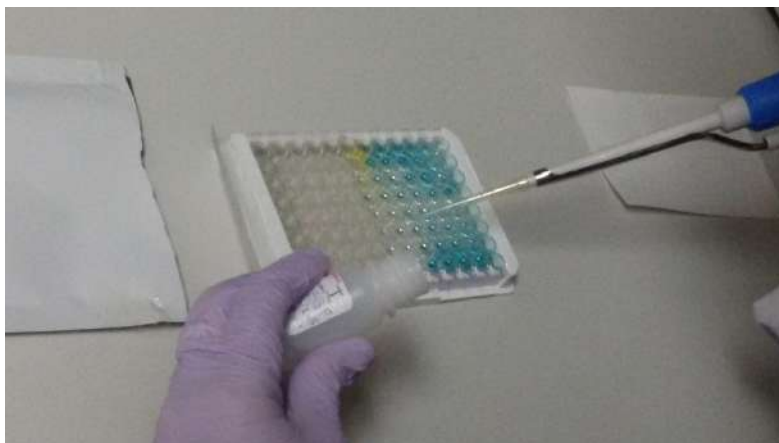
Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

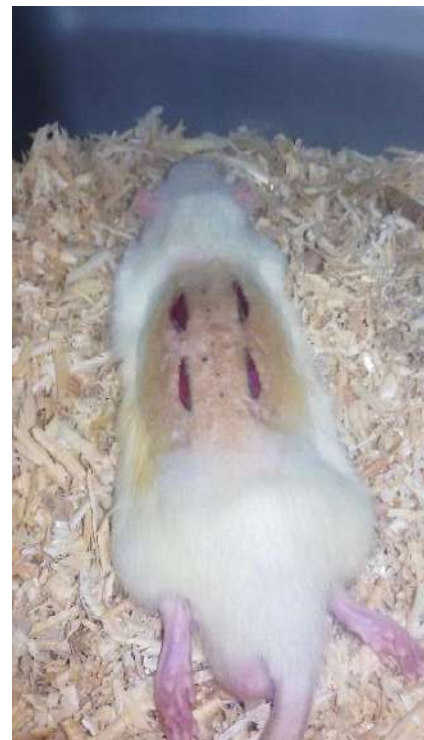
* Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.

** Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Lampiran 2 : Pemeriksaan ELISA



Lampiran 3 : Perlukaan tikus hari ke-1

Lampiran 4 : Perlukaan tikus hari ke-3

Lampiran 5 : Perlukaan tikus hari ke-7

Lampiran 6 : Perlukaan tikus hari ke-14

Lampiran 7 : Perlukaan tikus hari ke-21

Lampiran 8 : Perlukaan tikus hari ke-28

Lampiran 9 : Data angiogenesis

Hari 7

Tikus	L1	L2	L3	L4
T22	86	79	100	68
T26	89	119	95	97
T27	109	105	111	121
T28	108	128	115	173
T30	106	95	112	129
T31	133	109	148	175

Hari 14

Tikus	L1	L2	L3	L4
T8	111	119	126	90
T17	143	77	117	112
T18	209	276	157	176
T29	178	165	210	151
T32	144	141	145	120
T34	127	139	161	141

Hari 21

Tikus	L1	L2	L3	L4
T1	139	153	109	128
T2	133	66	143	91
T3	103	116	139	105
T4	127	189	152	148
T5	134	189	89	142
T7	189	182	166	200

Hari 28

Tikus	L1	L2	L3	L4
T9	13	13	11	11
T10	16	18	14	21
T11	27	22	29	17
T12	22	32	27	30
T13	30	27	35	45
T14	26	25	30	48

Lampiran 10 : Data WCI hari ke-3

Tikus	Luka	L (μM)	D (μM)	N (μM)	S (μM)
T19	L1	8182.1	1260.4	1352.7	4707.3
	L2	4335.6	265.4	821.9	4077.8
	L3	7634.9	1490.7	1543.4	5859.7
	L4	4747.5	741.1	883.4	4220.7
T20	L1	6916.1	936.6	1453.3	4740.6
	L2	7785.3	1083	1244	5229.5
	L3	6221.8	625.1	1051.7	5562.5
	L4	2164.1	423.3	1535.1	1560.4
T21	L1	3867.7	617	1079.3	3344.4
	L2	5901.5	826.4	1299.8	4343
	L3	6754.5	662.6	1537.2	5979.5
	L4	5660.5	424.8	1075.1	5263.3
T24	L1	7914.5	969	1241.8	4449.7
	L2	5325.1	413.1	1478.5	4812.9
	L3	4205.9	378.4	1307.7	3338
	L4	5401.9	917.3	942.2	3037.7
T25	L1	8214.5	1088.6	1381.1	5298.8
	L2	4223.6	852.2	1221.4	2882.5
	L3	4343.5	794	1193.8	3812.2
	L4	5734.4	582.5	1277.1	5119.1

Tikus	Luka	SCI	DCI	WCI
T19	L1	0.42	0.07	0.49
	L2	0.06	0.68	0.74
	L3	0.23	0.03	0.26
	L4	0.11	0.16	0.27
T20	L1	0.31	0.36	0.67
	L2	0.33	0.13	0.46
	L3	0.11	0.4	0.51
	L4	0.28	0.72	1
T21	L1	0.14	0.43	0.57
	L2	0.26	0.36	0.62
	L3	0.11	0.57	0.68
	L4	0.07	0.60	0.67
T24	L1	0.44	0.22	0.66
	L2	0.1	0.72	0.82
	L3	0.21	0.71	0.92
	L4	0.44	0.03	0.47
T25	L1	0.35	0.21	0.56
	L2	0.32	0.30	0.62
	L3	0.12	0.33	0.45
	L4	0.09	0.54	0.63

Lampiran 11 : Data WCI hari ke-7

Tikus	Luka	L (μM)	D (μM)	N (μM)	S (μM)
T22	L1	2083.3	355.1	1063.6	2011.9
	L2	4408.2	130.4	1605.8	3539.9
	L3	3980.6	916.9	1724.5	3920.1
	L4	4451.8	650.9	1365.9	3709.2
T26	L1	6155.5	1054.4	1498.3	5541.5
	L2	5804.9	756.9	1658.3	5346.1
	L3	4042.2	134.4	1263.8	3554
	L4	4246.9	260.1	1033	4166.3
T27	L1	1459.7	114.8	1365.7	1283.8
	L2	2567.6	323	1347.2	2259.5
	L3	4213.1	553.6	1522.4	3266.6
	L4	1837.8	208.8	1253.1	1708.1
T28	L1	3762.5	332.7	1232.2	3149.1
	L2	3449.8	367.8	1542.3	3229.5
	L3	3872.9	713.9	1492.5	3164.4
	L4	4657.4	527.2	1239.4	3989.8
T30	L1	3635.7	424.1	1138.8	3468.1
	L2	4694.3	432.3	1347.7	3987.2
	L3	3903.8	610	1048	3474.6
	L4	4086.4	236.7	1330.8	3715.7
T31	L1	3874.3	208.2	1002.9	3750.1
	L2	3592.4	498.7	1157.9	3270.4
	L3	menutup	menutup	1089.9	menutup
	L4	4303.4	385.8	1070.8	3705.1

Tikus	Luka	SCI	DCI	WCI
T22	L1	0.03	0.67	0.70
	L2	0.1	0.9	1
	L3	0.02	0.47	0.49
	L4	0.17	0.52	0.69
T26	L1	0.1	0.3	0.4
	L2	0.08	0.54	0.62
	L3	0.12	0.89	1
	L4	0.02	0.75	0.77
T27	L1	0.1	0.9	1
	L2	0.12	0.76	0.88
	L3	0.22	0.64	0.86
	L4	0.07	0.83	0.90
T28	L1	0.16	0.73	0.89
	L2	0.06	0.76	0.82
	L3	0.18	0.52	0.70
	L4	0.14	0.57	0.71
T30	L1	0.05	0.63	0.68
	L2	0.15	0.68	0.83
	L3	0.11	0.42	0.53
	L4	0.09	0.82	0.91
T31	L1	0.03	0.79	0.82
	L2	0.09	0.57	0.66
	L3	menutup	menutup	1
	L4	0.14	0.64	0.78

Lampiran 12 : Data WCI hari ke-14

Tikus	Luka	L (μM)	D (μM)	N (μM)	S (μM)
T8	L1	1957.3	185.7	834.6	1793.6
	L2	1941.4	221.2	1046.4	1623.1
	L3	menutup	menutup	menutup	menutup
	L4	menutup	menutup	menutup	menutup
T17	L1	menutup	menutup	menutup	menutup
	L2	menutup	menutup	menutup	menutup
	L3	1597.1	390.7	1197.6	1145
	L4	menutup	menutup	menutup	menutup
T18	L1	3641.4	533.8	985.5	2398.8
	L2	6873.5	987.3	1059.2	3560.9
	L3	menutup	menutup	menutup	menutup
	L4	1706.7	158.8	793.9	1489.5
T29	L1	1251.1	240.4	1220.1	1001.1
	L2	3241.9	491.9	1163.9	2285.9
	L3	1803	131.9	885.5	1419.9
	L4	1367.2	131.9	1122.2	1187.6
T32	L1	2494.5	96.9	1200.3	1855.7
	L2	1646.9	154.1	918	1285.4
	L3	menutup	menutup	menutup	menutup
	L4	1433	165.8	1008.4	1317.9
T34	L1	menutup	menutup	menutup	menutup
	L2	3015.2	748.7	1116	1319.3
	L3	2367.9	329.8	1114.5	1772.6
	L4	1316.9	222.5	1089.3	915.3

Tikus	Luka	SCI	DCI	WCI
T8	L1	0.08	0.78	0.86
	L2	0.16	0.79	0.95
	L3	menutup	menutup	1
	L4	menutup	menutup	1
T17	L1	menutup	menutup	1
	L2	menutup	menutup	1
	L3	0.28	0.67	0.95
	L4	menutup	menutup	1
T18	L1	0.34	0.46	0.80
	L2	0.48	0.07	0.55
	L3	menutup	menutup	1
	L4	0.13	0.80	0.93
T29	L1	0.20	0.80	1
	L2	0.29	0.58	0.87
	L3	0.21	0.85	1
	L4	0.13	0.88	1
T32	L1	0.26	0.92	1
	L2	0.22	0.83	1
	L3	menutup	menutup	1
	L4	0.08	0.83	0.91
T34	L1	menutup	menutup	1
	L2	0.56	0.33	0.89
	L3	0.25	0.70	0.95
	L4	0.30	0.79	1

Lampiran 13 : Data epitelisasi hari ke-3

Tikus	Luka	Area regenerasi epitel (μM)	Area epitelisasi (μM)	Rasio epitelisasi	Jarak epitelisasi (μM)	Jumlah lapisan epitel
T19	L1	841.4	8182.1	0.10	4217.9	0
	L2	615.7	4335.6	0.20	2553.2	2
	L3	623.1	7634.9	0.08	5441.9	0
	L4	1709.1	4747.5	0.36	3070	0
T20	L1	1811.9	6916.1	0.26	4124.3	0
	L2	1080.4	7785.3	0.14	1698.5	0
	L3	3356.6	6221.8	0.54	2609.6	1
	L4	1617.3	2164.1	0.75	171.14	0
T21	L1	316.9	3867.7	0.08	2920.4	0
	L2	993.1	5901.5	0.17	3738.8	0
	L3	1797.9	6754.5	0.27	5240.5	0
	L4	2059.8	5660.5	0.36	4502.7	3
T24	L1	1430.8	7914.5	0.18	3157.9	3
	L2	1352.7	5325.1	0.25	3571.3	2
	L3	1767.3	4205.9	0.42	2589.8	0
	L4	1280.3	5401.9	0.24	2427.2	1
T25	L1	1048.2	8214.5	0.13	4676.9	0
	L2	1008.5	4223.6	0.24	2470.2	4
	L3	787.1	4343.5	0.18	3228.3	4
	L4	1344.3	5734.4	0.23	3994.3	0

Lampiran 14 : Data epitelisasi hari ke-7 dan 14

Tikus	Luka	Area regenerasi epitel (μM)	Area epitelisasi (μM)	Rasio epitelisasi	Jarak epitelisasi (μM)	Jumlah lapisan epitel
T22	L1	2083.3	2083.3	1	0	8
	L2	2700.9	4408.2	0.61	1408.1	15
	L3	1272.6	3980.6	0.32	3246.5	12
	L4	1291	4451.8	0.29	3189.6	13
T26	L1	4608.3	6155.5	0.75	1527.7	15
	L2	4277.8	5804.9	0.74	1542.2	8
	L3	4042.2	4042.2	1	0	12
	L4	2649.3	4246.9	0.62	1121.6	9
T27	L1	781.2	1459.7	0.54	570.3	12
	L2	1379.5	2567.6	0.54	1185.6	8
	L3	1951	4213.1	0.46	1672.5	11
	L4	1492.1	1837.8	0.54	1070.5	8
T28	L1	2835.7	3762.5	0.75	804.4	12
	L2	1838.4	3449.8	0.53	1565.4	14
	L3	3872.9	3872.9	1	0	12
	L4	3409.8	4657.4	0.73	1013.8	11
T30	L1	2425.3	3635.7	0.67	1832.4	9
	L2	3606.4	4694.3	0.77	1112.5	7
	L3	3389.6	3903.8	0.86	1020.1	12
	L4	2635.7	4086.4	0.65	1476.1	10
T31	L1	3048.3	3874.3	0.79	571.3	19
	L2	2910.4	3592.4	0.81	582.3	12
	L3	Menutup	menutup	1	0	17
	L4	4303.4	4303.4	1	0	12

Jumlah lapisan epitel hari 14

Tikus	L1	L2	L3	L4
T8	10	8	10	9
T17	12	8	7	8
T18	10	7	8	9
T29	9	10	8	8
T32	12	8	9	7
T34	7	6	7	7

Lampiran 15 : Data densitas kolagen hari ke-14

Tikus	Luka	Mikrofoto 1 (pixel)	Mikrofoto 2 (pixel)	Mikrofoto 3 (pixel)	Mikrofoto 4 (pixel)	Mikrofoto 5 (pixel)
T8	L1	3930332	5644552	3530972	2945188	4512988
	L2	2942723	2721594	2421588	3262764	2824286
	L3	5702824	5058284	4049266	4942706	5422763
	L4	5004172	4931177	4750435	5724862	4318235
T17	L1	4136669	3401930	4085320	4717361	3769299
	L2	6218604	7734235	6058760	6670533	6896497
	L3	4792304	2870265	4613371	4091980	3741818
	L4	6960004	5876768	6578975	6418386	6471915
T18	L1	8829773	5778404	8561985	7304088	7723387
	L2	5551651	4470833	4525979	4849487	4498406
	L3	7350107	8021518	6973354	7448326	7497436
	L4	8511473	7501075	6490677	6637840	7213330
T29	L1	4979861	9882202	7967928	7609997	8925065
	L2	7523405	7490787	7177192	7397128	7333989
	L3	5361224	6572008	8847860	7709934	6927030
	L4	8203058	6081925	7915426	6998676	7400136
T32	L1	6470778	5769553	7777826	6120165	6672719
	L2	7358943	7175884	7365296	7236903	6986472
	L3	7738194	7789772	7279108	7534440	7602358
	L4	6290210	6185139	7169623	6677381	6548324
T34	L1	8838756	4764595	7406523	6085559	7003291
	L2	6876749	5905545	5890735	6391147	6224343
	L3	8441099	9203981	7279572	8308217	8241776
	L4	7951834	4639349	8150052	6394700	6913745

Lampiran 16 : Data densitas kolagen hari ke-28

Tikus	Luka	Mikrofoto 1 (<i>pixel</i>)	Mikrofoto 2 (<i>pixel</i>)	Mikrofoto 3 (<i>pixel</i>)	Mikrofoto 4 (<i>pixel</i>)	Mikrofoto 5 (<i>pixel</i>)
T9	L1	6765191	9202933	9270790	7984062	8412970
	L2	6862121	6363024	5643233	6612572	6289459
	L3	10617083	8283644	7367614	7825629	8756113
	L4	7070422	10366173	10297549	9244714	8718297
T10	L1	8221167	9635278	7779229	8928222	8545224
	L2	9641215	10198324	8433556	9424365	9315940
	L3	7222432	7645996	8657188	8151592	7841872
	L4	8284523	5758066	7021294	6111023	6717870
T11	L1	8301875	5228102	7766199	7098725	6764988
	L2	9594627	8688147	10107679	9397913	9463484
	L3	10614663	6130711	11047102	9264158	8588906
	L4	9807805	8906496	10697693	9803998	9357150
T12	L1	7765988	8359616	8679092	8268232	8062802
	L2	8220352	7259697	6062757	7740024	7180935
	L3	7155160	8759206	8533095	7957183	8149153
	L4	8205509	4856773	8172853	6531141	707837
T13	L1	8772650	8110592	7212517	7661554	8031919
	L2	6780879	7925932	7588620	7353405	8059049
	L3	5613139	4911472	7008395	5959933	5844335
	L4	5124113	9468379	10177187	8020290	8759571
T14	L1	8107415	6661522	7384468	10310693	8359876
	L2	8148081	7030946	6075225	6869533	7111653
	L3	8491070	9630898	8232995	9060984	8784987
	L4	5305264	7674856	9463237	8569046	7481119

Lampiran 17 : Data luas area luka hari ke-14 dan 21

Tikus hari 14	Luka	Luas area (μM^2)	Tikus hari 21	Luka	Luas area (μM^2)
T8	L1	1226892	T1	L1	728683,9
	L2	977860		L2	834538,9
	L3	1226440		L3	990701
	L4	1524638		L4	798025
T17	L1	896853	T2	L1	445996,1
	L2	398319		L2	652026
	L3	394291		L3	771053,2
	L4	581641		L4	670654,1
T18	L1	1101420	T3	L1	933075
	L2	3093608		L2	1052391,53
	L3	780106		L3	598367
	L4	884434		L4	400636
T29	L1	623547	T4	L1	389863,31
	L2	476112		L2	629069,28
	L3	347923		L3	546593,24
	L4	779111		L4	468143,39
T32	L1	955220	T5	L1	734804
	L2	600096		L2	7550998,8
	L3	818172		L3	267456,4
	L4	561093		L4	625703
T34	L1	452559	T7	L1	1176073
	L2	463180		L2	1086078
	L3	1142230		L3	351887,11
	L4	750485		L4	430275

Lampiran 18 : Data luas area luka hari ke-28

Tikus hari 28	Luka	Luas area (μM^2)
T9	L1	538007
	L2	350868
	L3	441533
	L4	366284
T10	L1	244455,05
	L2	382213,05
	L3	775493,32
	L4	489273,3
T11	L1	700991,81
	L2	689780,11
	L3	728923,55
	L4	939474,19
T12	L1	710081,26
	L2	779798,05
	L3	635439,28
	L4	1050721,97
T13	L1	1055409,57
	L2	831520,91
	L3	1060803,52
	L4	953547,42
T14	L1	867251
	L2	1054724
	L3	463886
	L4	588784

Lampiran 19 : Data absorban ELISA

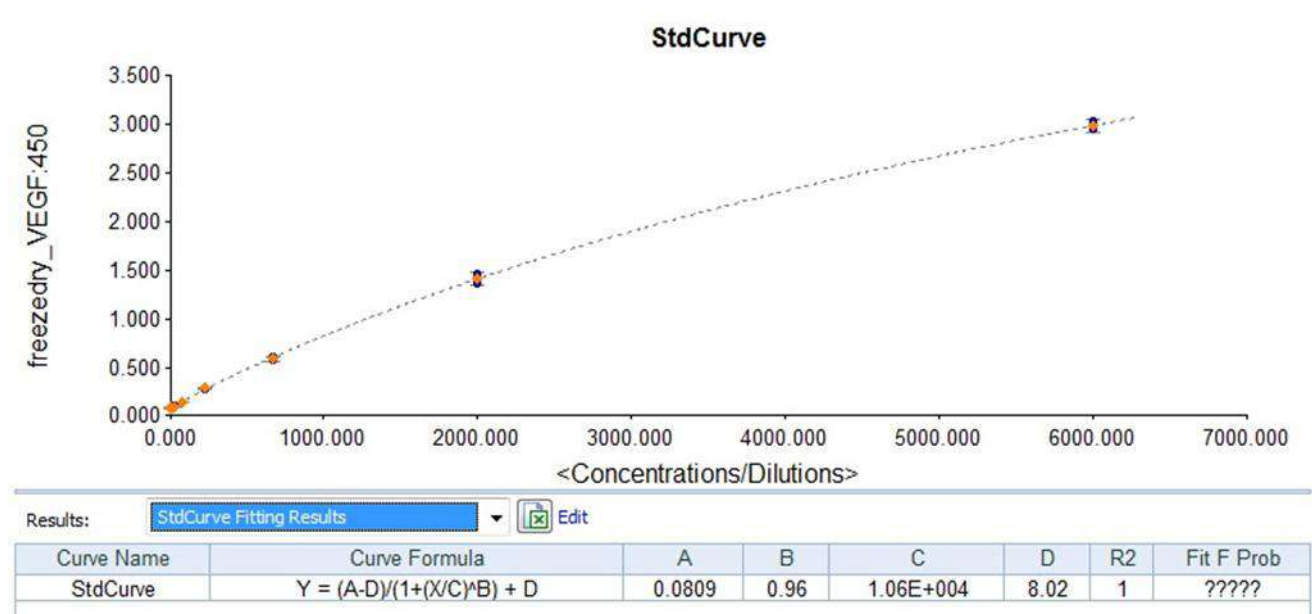
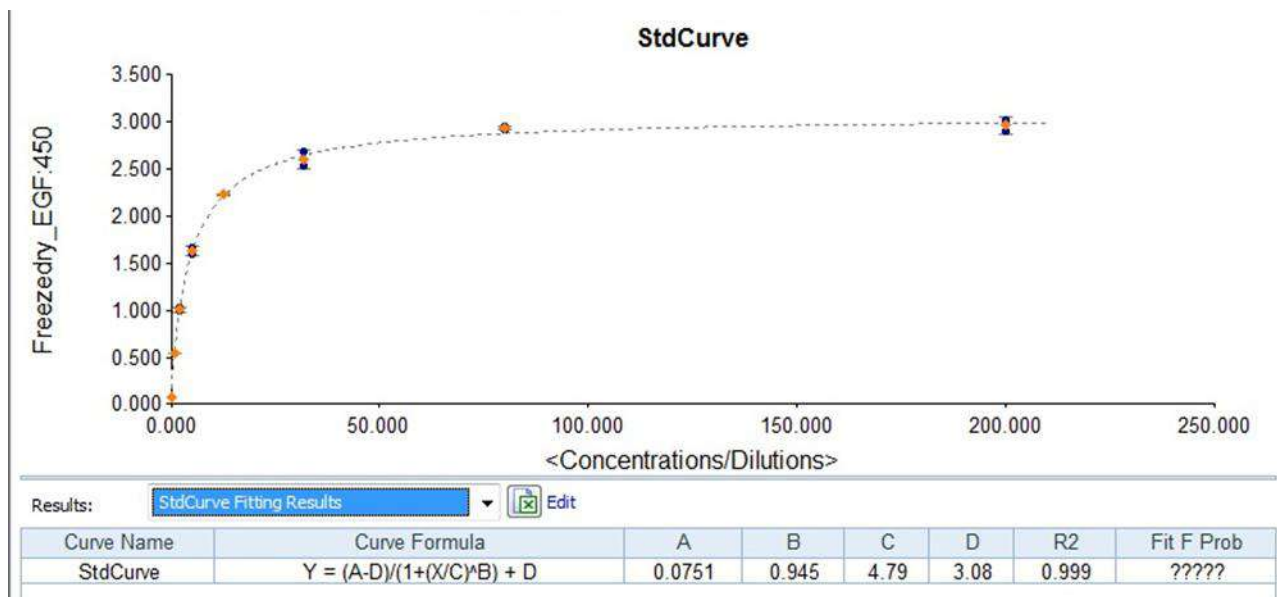
ELISA VEGF

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,059	2,941	1,505	0,073	0,089	0,095	1,295	1,328	1,297	1,337	0,091	0,076
B	1,386	1,52	2,343	2,556	2,597	1,656	2,835	2,805	2,832	2,903	0,094	0,096
C	0,611	0,577	0,923	1,51	1,587	1,563	2,826	2,805	1,734	2,941	0,093	0,104
D	0,301	0,279	2,673	2,479	1,059	1,96	0,095	0,089	0,097	0,09	0,092	0,092
E	0,146	0,148	1,536	1,51	1,438	1,328	0,095	0,09	0,091	0,087	0,091	0,095
F	0,102	0,099	3,423	3,094	2,856	2,925	3,207	2,462	2,816	2,794	0,095	0,098
G	0,087	0,09	0,085	0,075	0,085	0,079	2,525	2,488	2,56	2,664	0,117	0,104
H	0,086	0,083	1,591	1,411	1,495	1,153	2,569	2,569	2,684	2,881	0,102	0,112

ELISA EGF

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,904	3,025	0,425	0,43	0,448	0,407	1,476	1,273	1,197	1,214	1,261	1,253
B	2,952	2,925	0,374	0,386	0,36	0,342	1,335	1,278	1,239	1,113	1,004	0,731
C	2,53	2,681	0,478	0,477	0,494	0,539	1,666	1,56	1,538	1,547	1,209	1,208
D	2,237	2,229	0,38	0,372	0,382	0,338	0,718	0,646	0,391	0,606	1,203	1,299
E	1,661	1,593	0,492	0,462	0,453	0,423	0,238	0,225	0,22	0,215	1,2	1,253
F	1,029	0,994	0,374	0,38	0,359	0,341	0,466	0,457	0,454	0,41	0,042	1,266
G	0,539	0,541	1,377	1,293	1,369	0,557	0,22	0,236	0,192	0,227	1,24	1,295
H	0,079	0,079	1,449	1,455	1,451	1,46	0,231	0,239	0,247	0,234	1,337	1,384

Lampiran 20 : Kurva ELISA



LAMPIRAN 4. BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI

1. Identitas Peneliti

a. Nama Lengkap : dr. Twidy Tarcisia
b. Jenis Kelamin : Perempuan
c. NIP : 10410004
d. Tempat/ tanggal lahir : Jakarta, 8 Maret 1983
e. Bidang keahlian : Histologi
f. Kantor/ Unit Kerja : Fakultas Kedokteran
Universitas Tarumanagara
h. Alamat kantor : Jl. Letjen. S. Parman no. 1
Kota : Jakarta Barat
Telepon : (021) 5671781
Fax. : (021) 5663126
Alamat rumah : Jl. Raya Bogor No 4 Rt 11 Rw 01
Kota : Jakarta Timur
Telepon : (021) 8400961
Fax : --
Email : twidyTarcisia@gmail.com
Telepon genggam : 081585266115



1. Pendidikan

No	Tempat Pendidikan	Kota & Negara	Tahun lulus	Bidang studi
1.	S1-Universitas Tarumanagara	Jakarta / Indonesia	2008	Kedokteran Umum
2.	S2- Universitas Indonesia	Jakarta/ Indonesia	Sedang mengambil	Magister Biomedik

2. Pengalaman kerja dalam penelitian :

No	Kegiatan	Sifat/Peranan	Keterangan
1	Correlation between Ki-67 proliferation marker with the degree of malignant behavior of ductal invasive type of mammary carcinoma	Peneliti ke-3	Penelitian dr. Irma Hasan Sp.PA
2	Growth factors in mesenchymal stem cell culture waste	Peneliti ke-6	Prof. dr. Jeanne Adiwinata P., M.S., Ph.D

3. Publikasi ilmiah : -

Efek medium terkondisi (*conditioned medium*) sel punca adiposa pada fase proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley

Pendahuluan

Kulit merupakan organ terbesar tubuh dengan fungsi utama memberi perlindungan tubuh terhadap lingkungan. Hilangnya integritas kulit akibat perlukaan atau penyakit dapat menimbulkan kecacatan atau kematian.¹ Prevalensi cedera secara nasional menurut Riskesdas 2013 adalah 8,2% dengan penyebab cedera terbanyak jatuh dan kecelakaan sepeda motor. Terdapat peningkatan prevalensi cedera sebesar 0,7% bila dibandingkan dengan Riskesdas 2007. Luka robek menempati urutan ketiga terbanyak jenis luka yang dialami penduduk.²

Penyembuhan luka adalah rangkaian peristiwa kompleks yang meliputi kemotaksis, pembelahan sel, angiogenesis, sintesis matriks ekstraseluler, pembentukan dan remodeling jaringan parut.³ Rangkaian peristiwa ini melibatkan koordinasi berbagai sel seperti keratinosit, fibroblas, sel endotel, makrofag dan trombosit yang diregulasi oleh berbagai growth factors, sitokin dan chemokines.⁴ Gangguan atau disregulasi pada sitokin, *growth factors*, selular dan matriks ekstraseluler dapat menghambat keberhasilan penyembuhan luka.³

Vaskularisasi yang baik dapat memenuhi suplai nutrisi dan oksigen pada sel dan jaringan area luka sehingga proses penyembuhan luka berjalan optimal. Angiogenesis terinisiasi pada tahap hemostasis oleh berbagai *growth factors* seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *platelet derived growth factor* (PDGF).⁵ VEGF adalah mediator utama angiogenesis karena peranannya dalam menstimulasi migrasi dan proliferasi sel endotel.⁶

Epitelisasi adalah proses regenerasi epidermis pada area luka yang distimulasi oleh berbagai *growth factors* seperti *epidermal growth factor* (EGF), PDGF, FGF-2 dan *transforming growth factor β* (TGF- β). Setelah luka tertutup oleh migrasi sel, sel epitel akan mengalami proliferasi dan diferensiasi membentuk lapisan epidermis.¹

Kolagen adalah komponen penting dalam proses penyembuhan luka. Kolagen disintesis oleh fibroblas dan berperan dalam memberi kekuatan dan integritas pada jaringan luka.⁵ Peranan kolagen ini dapat dinilai dalam kemampuan luka berkontraksi. Kontraksi luka terjadi akibat

tarikan antara myofibroblas dan serat kolagen. Maka dari itu kekuatan kontraksi luka berbanding lurus dengan jumlah myofibroblas dan serat kolagen.⁶

Penggunaan *conditioned medium* sel punca sebagai terapi telah banyak diteliti baik secara in vitro maupun in vivo dengan hasil yang memuaskan. Penggunaan *conditioned medium* sel punca lebih menjanjikan daripada sel punca sendiri karena kemudahan produksi, pengemasan dan distribusi.⁷ Penelitian terdahulu membuktikan pemberian *adiposa derived stem cell conditioned medium* (ADSC-CM) dapat meningkatkan migrasi sel keratinosit, fibroblast dan endotel secara in vitro. Peningkatan migrasi sel tersebut diharapkan dapat meningkatkan angiogenesis, epitelisasi dan fibroplasia penyembuhan luka melalui peran parakrin sekretom *adipose derived stem cell* (ADSC).^{8,9}

Masih sedikit hal yang diketahui tentang kandungan dan peranan ADSC-CM dalam proses angiogenesis, kualitas kolagen dan epitelisasi. Karena itu peneliti ingin menganalisis kadar growth factors (VEGF dan EGF) dalam ADSC-CM dan gambaran histologi ketiga proses tersebut (angiogenesis, kontraksi luka dan epitelisasi) pasca luka insisi kulit hewan coba tikus Sprague Dawley.

Tinjauan teoritis

Penyembuhan luka terjadi melalui 4 tahap yang saling tumpang tindih, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling*.⁵ Tahap pertama pada penyembuhan luka adalah hemostasis yang terjadi saat perlukaan dan selesai dalam beberapa jam. Tujuan utama tahap ini adalah menghentikan perdarahan dan menyediakan matriks sebagai kerangka migrasi sel pada tahap penyembuhan luka berikutnya.^{10,11} Tahap inflamasi diaktivasi saat tahap hemostasis masih berlangsung. Mekanisme selular dan humoral yang terjadi pada tahap ini berfungsi sebagai pertahanan tubuh terhadap serangan mikroorganisme.⁵ Tahap proliferasi dimulai setelah terjadi respon inflamasi pada luka. Tahap ini bertujuan mengembalikan fungsi normal kulit. Tahap ini dicirikan dengan migrasi fibroblas dan sintesis matriks ekstraseluler sebagai pengganti matriks luka sementara yang terbentuk dari fibrin dan fibronectin.¹² Fibroplasia adalah proses proliferasi dan migrasi fibroblas ke dalam bekuan fibrin dan memproduksi kolagen baru serta protein matriks lain yang berperan dalam pembentukan jaringan granulasi.⁶ Pada akhir minggu pertama matriks ekstraseluler terakumulasi untuk menunjang migrasi sel dan proses regenerasi. Pada saat ini fibroblas bertransformasi menjadi myofibroblas.⁵ Kontraksi luka dimulai setelah perlukaan

dan memuncak pada 2 minggu pasca trauma. Myofibroblas adalah sel yang berperan dalam kontraksi luka karena kemampuan mereka untuk kontraksi. Jaringan penyambung akan menyusut dan membawa tepi luka saling mendekat.⁶ Angiogenesis berlangsung dalam seluruh tahap penyembuhan luka. Faktor yang menginisiasi angiogenesis adalah VEGF, PDGF, bFGF dan serine protease trombin. VEGF adalah mediator kunci dalam pembentukan vaskular embriologi dan angiogenesis baik fisiologi maupun patologi sehingga VEGF merupakan *growth factor* vital dalam proses angiogenesis penyembuhan luka.^{13,14} Epitelisasi adalah proses regenerasi jaringan epidermis setelah terjadi luka pada jaringan kulit. Proses ini meliputi migrasi keratinosit, proliferasi keratinosit, diferensiasi neoepitelium menjadi lapisan epidermis dan restorasi *basement membrane zone* (BMZ) yang akan menghubungkan epidermis dan dermis.⁶ Setelah bermigrasi, keratinosit akan berproliferasi untuk menutup luka yang terbuka. Proses ini terjadi oleh regulasi *growth factors*, integrin dan *metalloprotease* (MMP). *Growth factors* yang menstimulasi migrasi dan proliferasi sel epitel adalah EGF, TGF- α dan FGF.¹ Tahap remodeling adalah tahap akhir penyembuhan luka yang berlangsung selama 1-2 tahun atau lebih. Tahap ini bertujuan untuk menyeimbangkan proses sintesis yang terjadi sehingga penyembuhan dapat berjalan normal.⁵ Pada tahap ini terjadi regresi pembuluh darah dan remodeling jaringan granulasi.¹² Hasil akhir yang didapat adalah jaringan parut yang matang dengan penurunan jumlah sel dan darah dan kekuatan tegangan jaringan yang tinggi.⁵

ADSC adalah sel punca multipoten yang terdapat di jaringan lemak.^{15,16} Peranan sel punca dalam penyembuhan luka adalah melalui mekanisme diferensiasi dan parakrin sel punca.¹⁷ *Conditioned medium* ADSC (ADSC-CM) memiliki kemampuan meregulasi penyembuhan luka secara parakrin. ADSC-CM mensekresi sejumlah sekretom seperti sitokin dan *growth factors* seperti EGF, FGF 4, *Insulin-like growth factor-binding protein 1* (IGFBP 1), IGFBP 2, IGFBP 3, IGFBP 4, IGFBP 5, *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *Insulin like growth factor III* (IGF-III), *Macrophage colony stimulating factor* (MCSF), PDGF, TGF- β dan VEGF.¹⁸ Peran ADSC pada penyembuhan luka telah dipelajari dengan hasil yang menjanjikan. Zhou dkk dan Kwon dkk telah menginvestigasi efek media ADSC pada penyembuhan luka *in vivo* dengan hasil yang baik.^{19,20} Hal ini menunjukkan bahwa ADSC dan ADSC-CM dapat meningkatkan proses penyembuhan luka.

Bahan dan Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *randomized controlled parallel* menggunakan hewan coba tikus Sprague Dawley.

Persiapan ADSC-CM

ADSC-CM didapat dari Laboratorium UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca RSCM-FKUI. ADSC-CM disimpan dalam mesin pendingin dengan suhu -20°C . ADSC-CM didapat dari kultur ADSC pasase tiga dengan medium kultur : α -MEM dan 10% *platelet rich plasma* (PRP) dalam kondisi normoksia selama tiga hari. ADSC-CM didapat dari sel yang telah memberikan karakteristik ADSC yaitu positif terhadap CD 34, CD 73 dan CD 90, serta dapat berdiferensiasi menjadi tiga galur sel: osteogenik, kondrogenik dan adipogenik.

Pemeriksaan ELISA

Konsentrasi EGF dan VEGF ADSC-CM dihitung dengan pemeriksaan ELISA menggunakan Elisa kit EGF (RAB0149) dan VEGF (RAB0507) @sigma-aldrich. Seluruh pemeriksaan dilakukan secara *quadruple*.

Perlukaan kulit tikus

Hewan coba tikus diadaptasikan dalam laboratorium selama satu minggu (hari penelitian ke-1 sampai ke-7) dengan dikandangkan secara tersendiri. Makan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Tikus dianestesi menggunakan kombinasi ketamine (40mg/kg BB) dan xylazine (5 mg/kg BB) secara intraperitoneal.²¹ Rambut pada bagian punggung tikus dicukur sampai bersih dengan ukuran 5x5 cm. Masing-masing tikus akan mendapat empat luka sayatan pada daerah punggungnya. Luka dibuat sejajar garis vertebra tikus dengan jarak 1 cm sisi kanan dan kiri tulang vertebra; 0.5 cm di bawah tulang skapula dan jarak antar luka yang berurutan secara vertikal 1 cm. Dilakukan tindakan aseptis dan antisepsis pada daerah kulit yang akan dilukai dengan menggunakan larutan *povidone iodine*. Kulit tikus dilukai dengan panjang 2 cm dan tebal 5 mm (*full thickness wound*). Kulit dilukai dengan mengangkat kedua ujung kulit yang akan dilukai dengan pinset (jarak antar pinset 1cm) kemudian dilakukan sayatan menggunakan pisau bedah. Setelah perdarahan berhenti, luka diberikan perlakuan sesuai dengan lokasi luka. Luka kulit tikus diberi perlakuan berupa pembaluran ADSC-CM, medium kultur, medium basal dan

tanpa pembaluran. Pembaluran hanya dilakukan satu kali yaitu setelah kulit tikus dilukai. Tikus dibagi kedalam empat kelompok berdasarkan waktu dikorbankannya (hari ke-3, 7, 14, 21 dan 28). Setelah tikus dikorbankan, dilakukan pemeriksaan mikroskopik pada jaringan luka kulit. Jaringan kulit yang telah diambil dimasukan dalam pot berisi formalin sebelum memproses jaringan.

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin dan Masson's Trichome

Jaringan yang telah diproses kemudian diberi pewarnaan HE dan Masson's Trichome untuk selanjutnya diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40 dan 400 kali. Sediaan kemudian didokumentasi dengan kamera Optilab advance plus.

Analisis densitas pembuluh darah

Penilaian dilakukan pada sediaan dengan pewarnaan HE menggunakan *software imaging Image Raster 3* (pembesaran lensa objektif 400 kali) dengan menentukan jumlah kapiler pada lima lapangan pandang. Hasil penilaian diambil dari nilai rata-rata jumlah pembuluh darah. Hasil penilaian angiogenesis dilakukan oleh dua penilai sehingga dinilai kesesuaiannya dengan teknik Bland-Altman untuk menentukan kesesuaian hasil pengukuran.²²

Analisis densitas kolagen

Analisis dilakukan pada perlakuan hari ke-14 dan 28. Penilaian dilakukan pada sediaan pewarnaan Masson's Trichome (pembesaran lensa objektif 400 kali) menggunakan ImageJ dengan menentukan densitas kolagen pada 5 lapangan pandang. Hasil penilaian diambil dari nilai rata-rata densitas kolagen. Densitas kolagen dinilai dengan menghitung jumlah *pixel* area berwarna biru. Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan *pixel*. Data kuantitatif yang didapatkan diubah menjadi data kualitatif dengan membuat range dari data terendah ke data tertinggi kemudian dibagi menjadi dua kategori: positif lemah dan positif kuat.^{23,2} Hasil pengukuran diperoleh dalam bentuk data numerik dan kategorik.

Analisis wound contraction index

Penilaian dilakukan pada sediaan pewarnaan HE menggunakan *software imaging Image Raster 3* (pembesaran lensa objektif 40 kali). *Wound contraction index* (WCI) didapat dari penjumlahan

SCI (*superficial contraction index*) dan DCI (*deep contraction index*). SCI didapat dari $(L-S)/L$ sedangkan DCI didapat dari $(N-D)/N$ dengan hasil bervariasi dari 0 dan 1. L adalah panjang area epitelisasi; S adalah jarak antara kedua tepi luka; N adalah ketebalan dermis normal di kedua tepi luka dan D adalah kedalaman luka dari lapisan epidermis.²⁵

Analisis epitelisasi

Epitelisasi diamati pada hari ke-3, 7 dan 14. Penilaian dilakukan pada sediaan pewarnaan HE menggunakan *software imaging Image Raster 3* (pembesaran lensa objektif 40 kali). Parameter yang dinilai adalah rasio epitelisasi, jarak epitelisasi dan jumlah lapisan epitel. Rasio epitelisasi adalah panjang area regenerasi epitel dibagi dengan panjang area epitelisasi. Jarak epitelisasi adalah jarak antara dua tepi luka pada area epitelisasi yang telah mengalami regenerasi epitel. Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan μm dan dianalisis pada perlakuan hari ke-3 dan 7. Analisis kualitas epitelisasi dilakukan dengan menghitung jumlah lapisan epitel pada epidermis pada perlakuan hari ke-3, 7 dan 14. Data kuantitatif yang didapatkan diubah menjadi data kualitatif dengan membuat range dari data terendah ke data tertinggi kemudian dibagi menjadi dua kategori: epitelisasi kurang dan baik. Hasil pengukuran diperoleh dalam bentuk data numerik dan kategorik.

Analisis luas area luka

Analisis dilakukan pada perlakuan hari ke-21 dan 28. Penilaian dilakukan menggunakan *software image raster* dengan menentukan luas area luka (pembesaran lensa objektif 40 kali). Hasil pengukuran berupa angka dalam satuan μm^2 . Data kuantitatif yang didapatkan diubah menjadi data kualitatif dengan membuat range dari data terendah ke data tertinggi kemudian dibagi menjadi dua kategori: penurunan lemah dan penurunan baik. Hasil pengukuran diperoleh dalam bentuk data numerik dan kategorik.

Analisis statistik

Data yang diperoleh berbentuk data numerik dan kategorik. Data akan disajikan dalam bentuk tabel, gambar dan grafik. Data penelitian dianalisis menggunakan program SPSS versi 22 dengan uji parametrik ANOVA dan Chi Square. Bila hasil data tidak memenuhi syarat uji parametrik

dan Chi Square maka data numerik akan dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan data kategorik akan dianalisis dengan uji Fisher.

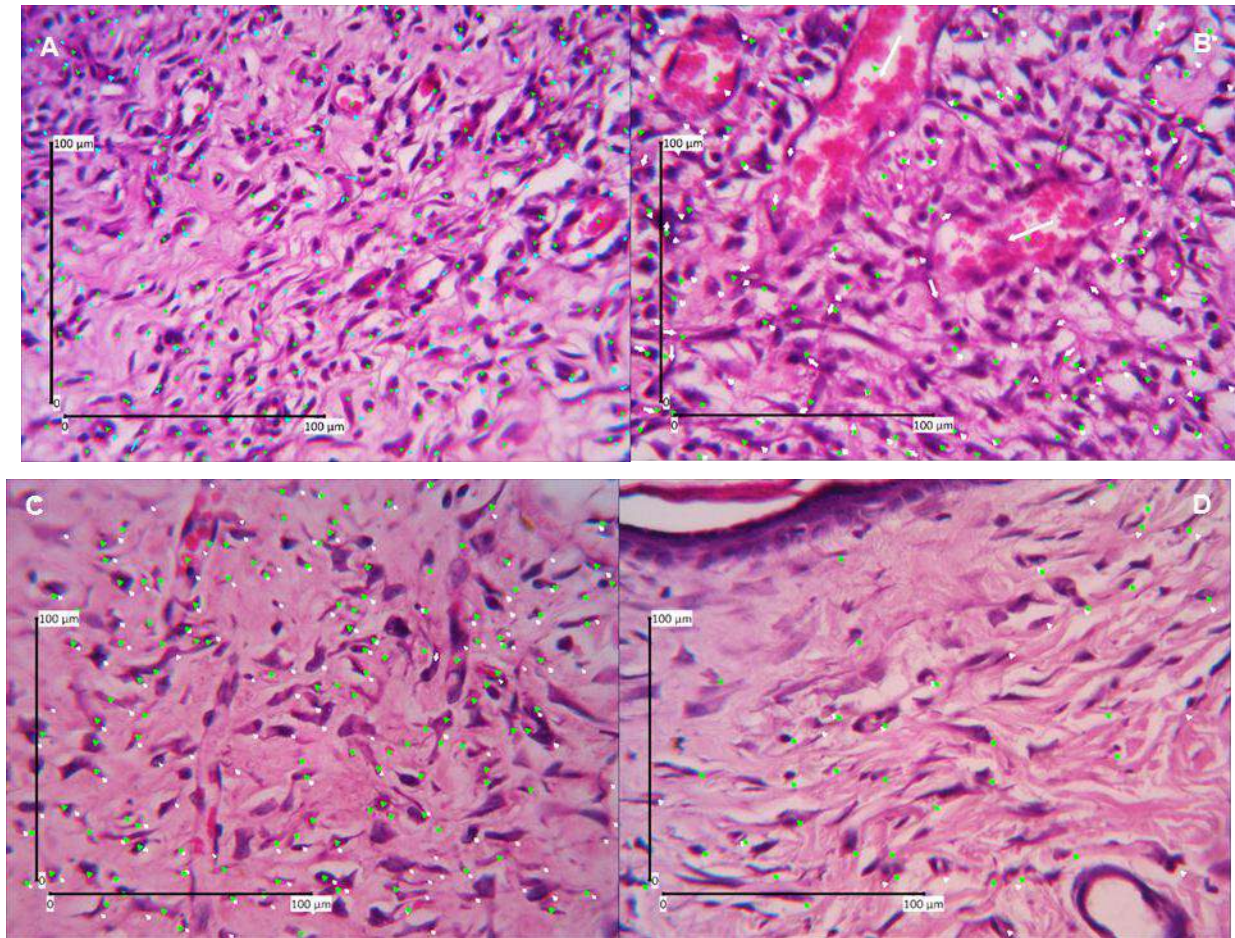
Hasil Penelitian

Efek ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari terhadap tahap proliferasi penyembuhan luka kulit tikus Sprague Dawley telah diteliti dalam studi kami dengan hasil uji statistik tidak ada perbedaan bermakna antara luka baluran ADSC-CM dan luka kontrol. Namun secara kualitatif ditemukan peningkatan tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley. Secara rinci hasil penelitian kami laporkan sebagai berikut.

Pemeriksaan ELISA

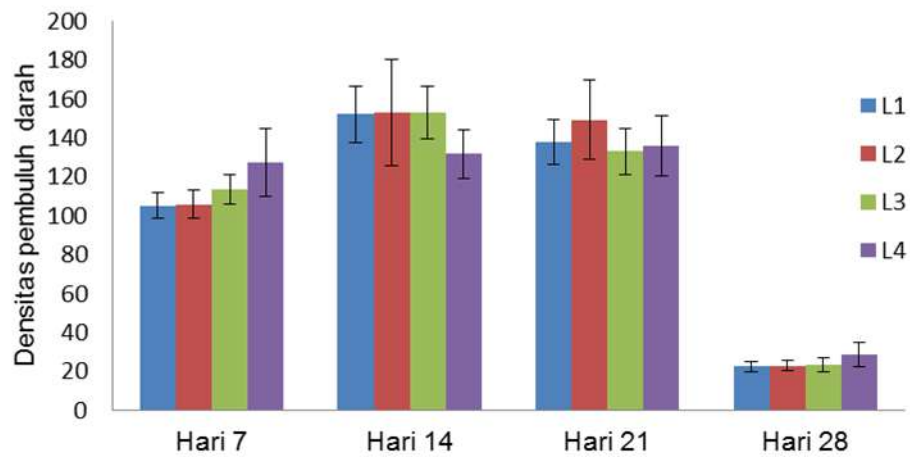
Keberadaan *growth factor* dalam ADSC-CM dinilai melalui pemeriksaan ELISA. VEGF dan EGF terdeteksi dalam ADSC-CM dengan rerata konsentrasi $5052,7 \pm 0,3$ pg/mL dan $0,2 \pm 0,1$ pg/mL.

Angiogenesis



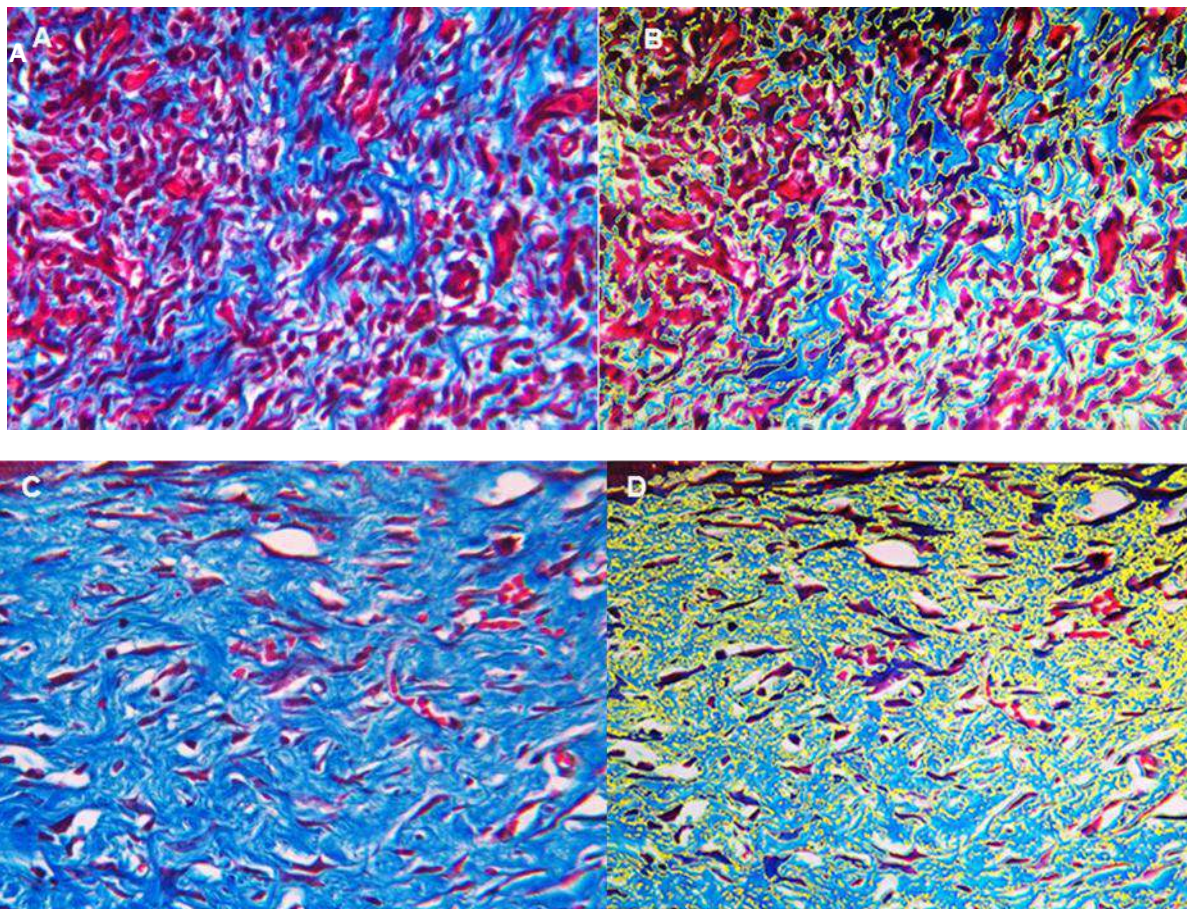
Gambar 1. Sediaan luka dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 400 kali) (A) Hari ke-7 (B) Hari ke-14 (C) Hari ke-21 (D) Hari ke-28. Keterangan gambar: titik hijau menunjukkan hasil perhitungan penilai satu, titik biru dan titik putih menunjukkan hasil perhitungan penilai dua.

Pembuluh darah ditandai dengan lumen yang dibatasi endotel dan membran basal dengan /tanpa sel otot polos. Gambaran pembuluh darah yang tampak ditandai dan dihitung menggunakan *image raster 3* (gambar 1). Pembuluh darah dihitung pada sediaan luka hari ke-7, 14, 21 dan 28. Tidak ditemukan perbedaan bermakna antara luka yang dibalurkan ADSC-CM dan luka yang tidak dibalurkan ADSC-CM (grafik 1). Data yang digunakan dalam analisis statistik adalah data penilai satu.



Grafik 1 Grafik angiogenesis sediaan luka kulit tikus. Perbandingan densitas pembuluh darah pada sediaan luka kulit tikus dengan pewarnaan HE menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Keterangan gambar: L1 menunjukkan luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2 menunjukkan luka tanpa pembaluran; L3 menunjukkan luka pembaluran medium kultur; L4 menunjukkan luka pembaluran medium basal.

Analisis densitas kolagen



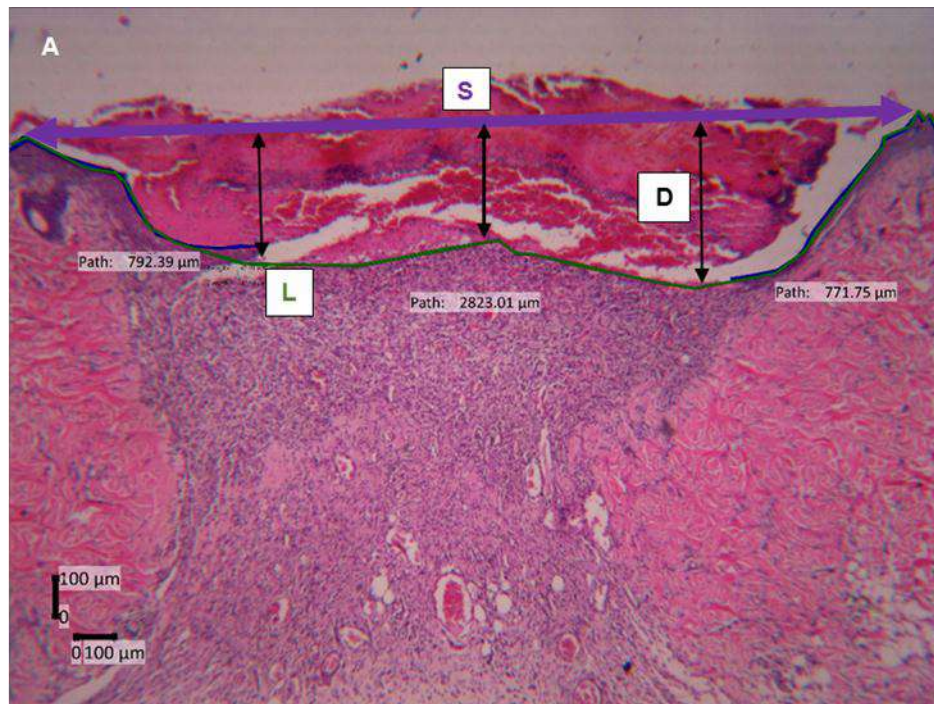
Gambar 2 Sediaan luka dengan pewarnaan Masson's Trichome (pembesaran lensa objektif 400 kali) (A dan B) Hari ke-14 (C dan D) Hari ke-28. Keterangan gambar: area yang dibatasi garis kuning adalah area yang dianalisis dengan ImageJ.

Densitas kolagen dianalisis pada perlukaan hari ke-14 dan 28. Penilaian statistik uji Kruskal Wallis dan uji Fisher menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dengan luka lainnya ($p > 0,05$). Densitas kolagen ditampilkan pada gambar 2 dan tabel 2.

Tabel 1 Tabel *range* densitas kolagen sediaan luka kulit tikus

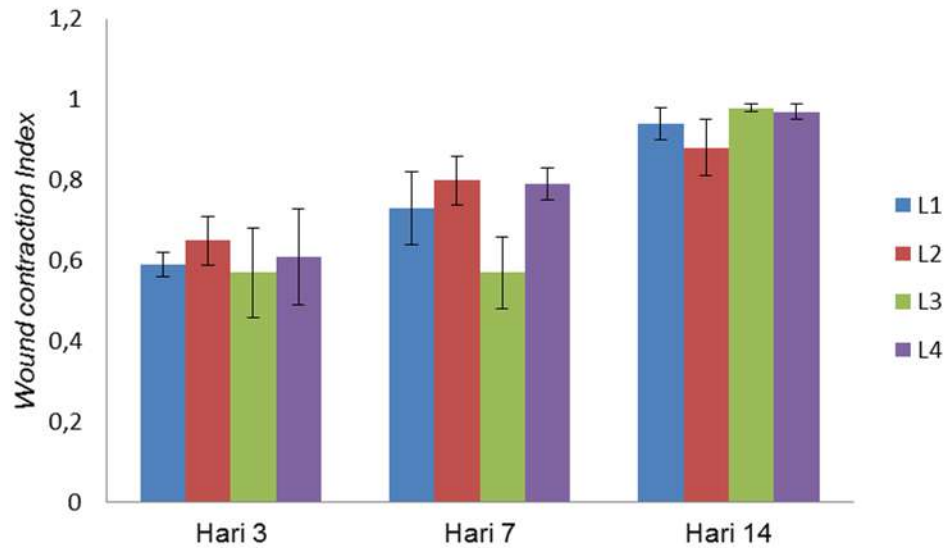
	L1	L2	L3	L4
Perlukaan hari ke-14	2945188- 9882202 <i>pixel</i>	2421588- 7734235 <i>pixel</i>	2870265- 9203981 <i>pixel</i>	4318235- 8511473 <i>pixel</i>
Perlukaan hari ke-28	5228102- 10310693 <i>pixel</i>	5643233- 10198324 <i>pixel</i>	4911472- 11047102 <i>pixel</i>	4856773- 10697693 <i>pixel</i>

Analisis kontraksi luka



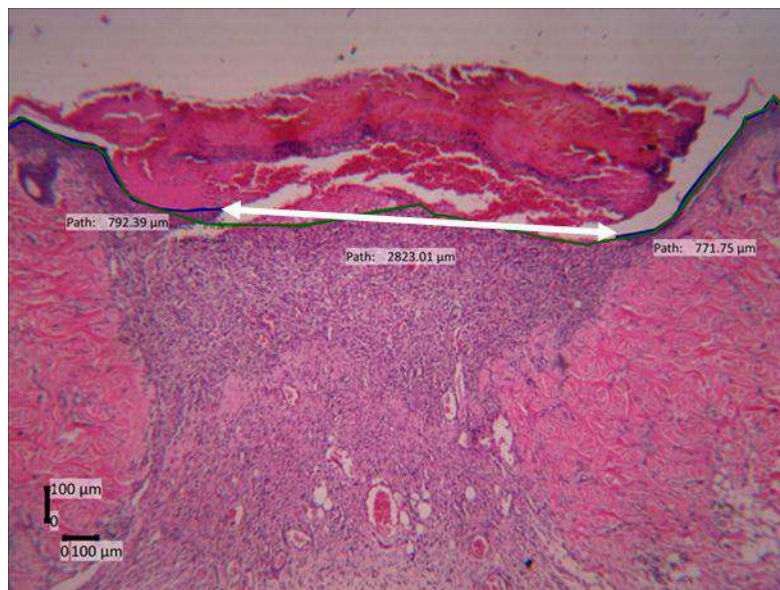
Gambar 3. Kontraksi luka hari ke-7 dengan mikroskop cahaya pembesaran 4x10 menggunakan *Image raster 3*. Keterangan gambar: panah ungu menunjukkan jarak antara kedua tepi luka (S), panah hitam menunjukkan kedalaman luka (D), panah kuning menunjukkan ketebalan dermis normal (N), garis hijau menunjukkan panjang area epitelisasi (L).

Kontraksi luka dengan perhitungan matematika terbagi menjadi kontraksi luka dalam (DCI) dan permukaan (SCI). WCI adalah akumulasi DCI dan SCI sehingga penyembuhan luka dikatakan berjalan dengan baik bila WCI mendekati nilai 1. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan tidak bermakna antara luka yang dibalurkan ADSC-CM dan luka yang tidak dibalurkan ADSC-CM (grafik 4).

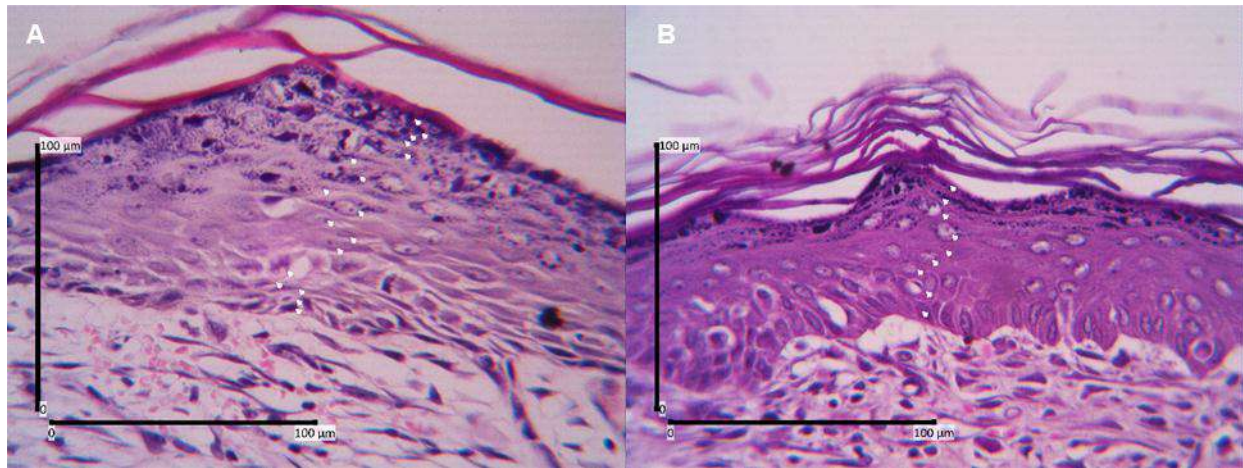


Grafik 2. Grafik kontraksi luka pada sediaan luka kulit tikus. Tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) antara luka yang dibalurkan dan luka yang tidak dibalurkan. Keterangan gambar: L1 menunjukkan luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2 menunjukkan luka tanpa pembaluran; L3 menunjukkan luka pembaluran medium kultur; L4 menunjukkan luka pembaluran medium basal.

Analisis epitelisasi



Gambar 4 Rasio epitelisasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 40x menggunakan *Image raster 3* (A) Hari ke-3 (B) Hari ke-7. Keterangan gambar: garis hijau menunjukkan panjang area luka, garis biru menunjukkan panjang area regenerasi epitel, panah putih menunjukkan panjang area regenerasi epitel.

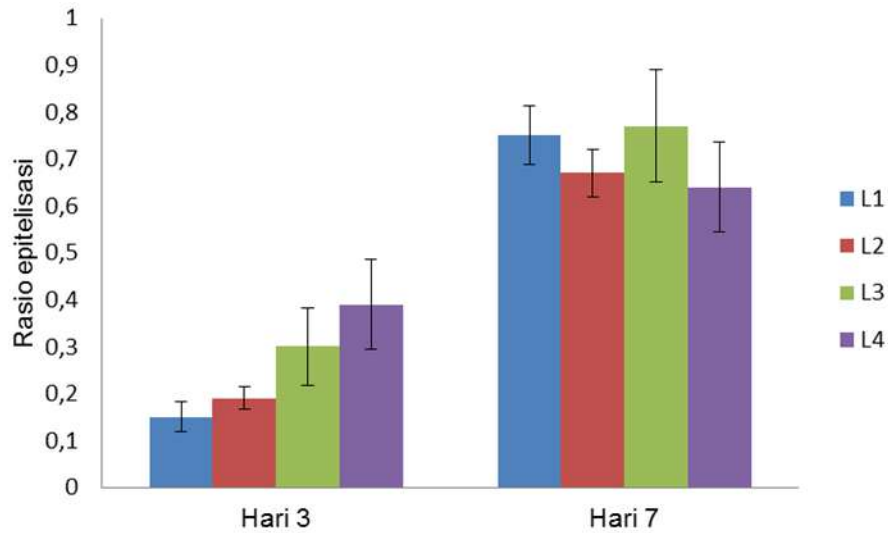


Gambar 5. Sediaan luka dengan pewarnaan HE (pembesaran lensa objektif 400 kali) (A) Hari ke-7; (B) Hari ke-14. Keterangan gambar: titik putih menunjukkan lapisan epitel pada epidermis.

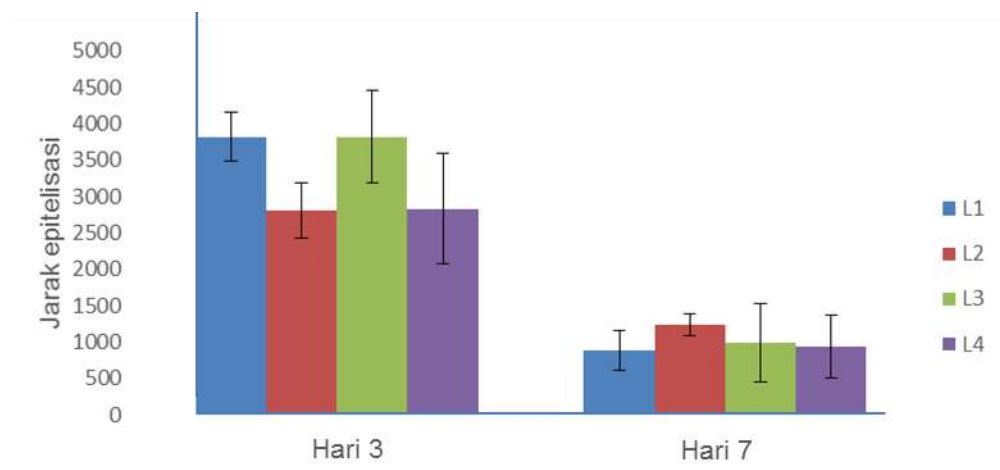
Peningkatan epitelisasi dinilai dengan menghitung rasio epitelisasi, jarak epitelisasi dan jumlah lapisan epitel. Epitelisasi diukur dengan *software Image Raster 3* (gambar 3). Hasil uji statistik epitelisasi menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0.05$) antara luka yang dibalurkan ADSC-CM dan tidak dibalurkan (grafik 2 dan 3 serta tabel 2).

Tabel 2. Tabel *range* jumlah lapisan epitel pada epidermis sediaan luka kulit tikus.

	L1	L2	L3	L4
Perlukaan hari ke-3	0-3	0-4	0-4	0-3
Perlukaan hari ke-7	8-19	7-15	11-17	8-13
Perlukaan hari ke-14	7-12	7-11	7-10	7-11

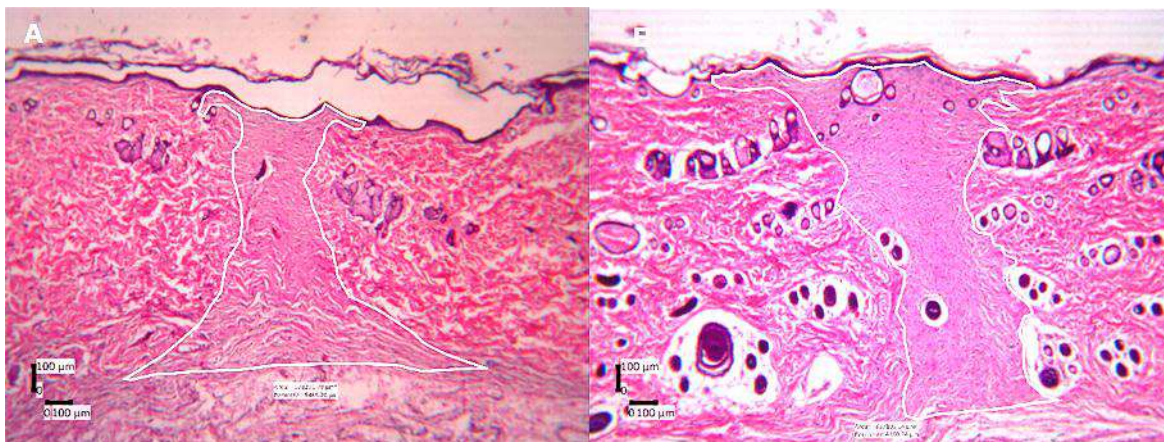


Grafik 3. Grafik rasio epitelisasi sediaan luka kulit tikus. Perbandingan ratio epitelisasi pada sediaan luka kulit tikus dengan pewarnaan HE menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Keterangan gambar: L1 menunjukkan luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2 menunjukkan luka tanpa pembaluran; L3 menunjukkan luka pembaluran medium kultur; L4 menunjukkan luka pembaluran medium basal.



Grafik 4. Grafik jarak epitelisasi sediaan luka kulit tikus. Perbandingan jarak epitelisasi pada sediaan luka kulit tikus dengan pewarnaan HE menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Keterangan gambar: L1 menunjukkan luka pembaluran ADSC-CM dengan konsentrasi 100%; L2 menunjukkan luka tanpa pembaluran; L3 menunjukkan luka pembaluran medium kultur; L4 menunjukkan luka pembaluran medium basal.

Analisis luas area luka



Gambar 6. Sediaan luka dengan pewarnaan HE (pembesaran 4x10) (A) Hari ke-21 (B) Hari ke-28. Keterangan gambar: area yang dibatasi garis putih menunjukkan area yang dianalisis dengan *Image Raster 3*.

Luas area dianalisis pada perlukaan hari ke-14, 21 dan 28. Tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) pada parameter luas area luka baik uji Kruskal Wallis maupun uji Fisher. Luas area luka ditampilkan pada gambar 6 dan tabel 3.

Tabel 3. Tabel luas area luka sediaan luka kulit tikus.

	L1	L2	L3	L4
Perlukaan hari ke-14	876081,8 ± 118814,8 μM^2	1001529,7 ± 426847,8 μM^2	784860,3 ± 149110,55 μM^2	846900,33 ± 144501 μM^2
Perlukaan hari ke-21	734749,2 ± 120592,9 μM^2	1967517,1 ± 1119220 μM^2	587676,2 ± 108910,9 μM^2	565572,7 ± 64198,2 μM^2
Perlukaan hari ke-28	686032,7 ± 113552,2 μM^2	681484 ± 111095,9 μM^2	684346,5 ± 93427,1 μM^2	731347,3 ± 116435,4 μM^2

Pembahasan

Efek ADSC-CM *monolayer* dalam inkubasi normoksia selama tiga hari terhadap tahap proliferasi penyembuhan luka kulit telah diteliti dalam studi kami baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Studi kami menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara luka pembaluran tunggal ADSC-CM dengan luka kontrol. Namun secara kualitatif didapatkan peningkatan proses penyembuhan luka tahap proliferasi seperti rasio epitelisasi dan jarak

epitelisasi yang mengindikasikan migrasi epitel terjauh ditemukan pada luka baluran ADSC-CM; jumlah lapisan epitel dalam epidermis terbanyak ditemukan pada luka baluran ADSC-CM serta luka baluran ADSC-CM lebih berpotensi untuk meningkatkan proliferasi epitel dan sintesis kolagen. Luka baluran ADSC-CM juga menurunkan luas area luka antar hari perlukaan lebih baik dari luka lainnya.

Penelitian terdahulu telah membuktikan peranan ADSC dalam meningkatkan proses penyembuhan luka baik pemberian intralesi maupun topikal. Peningkatan proses penyembuhan luka tersebut didominasi oleh efek parakrin *mesenchymal stem cell* (MSC) dibanding dengan proliferasi dan diferensiasi MSC di jaringan.²⁶ Berdasarkan hal tersebut penelitian terkini juga mengungkapkan bahwa *conditioned medium* dari kultur sel punca adiposa mengandung sejumlah *growth factor* dan sitokin seperti VEGF, EGF, PDGF dan TGF β .^{7,27} VEGF adalah mitogen spesifik untuk sel endotel vaskular. VEGF adalah komponen kunci proses angiogenesis dalam berbagai proses antara lain penyembuhan luka.^{28,29} Pembaluran ADSC-CM pada luka diharapkan dapat meningkatkan proses angiogenesis pada luka kulit tikus. Epitelisasi merupakan salah satu proses penting penyembuhan luka. Luka kulit tidak akan menutup jika proses epitelisasi tidak berlangsung. Proses ini didominasi oleh migrasi, proliferasi dan diferensiasi keratinosit.^{30,31} Molekul-molekul yang berperan dalam proses ini meliputi EGF, FGF dan TGF- β dengan EGF sebagai regulator kunci epitelisasi.³²

Konsentrasi VEGF dan EGF dalam penelitian kami diukur dengan pemeriksaan ELISA. Rerata konsentrasi VEGF dan EGF dalam ADSC-CM adalah $5052,698 \pm 0,31$ pg/mL dan $0,233 \pm 0,08$ pg/mL. ADSC-CM didapat dari kultur ADSC pasase tiga dengan medium kultur : α -MEM dan 10% PRP dalam kondisi normoksia selama tiga hari. Beberapa penelitian lain memperlihatkan variasi konsentrasi VEGF dan EGF di dalam *stem cell-conditioned medium*. Variasi konsentrasi VEGF dan EGF dalam *conditioned medium* pada berbagai penelitian dapat disebabkan oleh perbedaan jenis asal sel dan metode kultur. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa kultur sel *spheroid*, penambahan suplemen baik serum maupun insulin dalam medium basal dan kondisi hipoksia dapat menstimulasi sel untuk mensekresi *growth factor*.^{27,33,34} Durasi dan medium kultur ADSC-CM dapat mempengaruhi besar konsentrasi yang terkandung dalam ADSC-CM.⁷

Didapat variasi konsentrasi VEGF pada ADSC-CM monolayer pada berbagai penelitian. Konsentrasi VEGF dalam ADSC-CM monolayer dianalisis oleh Kwon dkk, Zhou dkk dan She

dkk. Zhou dkk mengkultur ADSC dalam medium DMEM dengan penambahan 10% FBS. ADSC kemudian diinkubasi dalam keadaan hipoksia dengan medium DMEM tanpa serum selama tiga hari.¹⁹ Kwon dkk menggunakan medium basal dan kondisi inkubasi yang sama dengan penelitian kami namun serum yang ditambahkan 10% FBS.²⁰ Konsentrasi VEGF dalam ADSC-CM Zhou dkk dan Kwon dkk sebesar $136,04 \pm 29,23$ pg/mL dan 560 ± 220 pg/mL.^{19,22} Penambahan suplemen pada medium kultur dalam menstimulasi sekretom sel punca tidak hanya terbatas pada pemberian *growth factor* namun juga substansi lain seperti insulin. She dkk menganalisis konsentrasi VEGF pada ADSC-CM yang diberi tambahan insulin pada medium kultur ADSC. Terdapat peningkatan konsentrasi VEGF pada ADSC-CM dengan insulin bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Konsentrasi VEGF pada kultur dengan dan tanpa insulin sebesar $643,28 \pm 63,57$ pg/mL dan $286,52 \pm 46,68$ pg/mL.³³ Didapat jumlah konsentrasi VEGF yang lebih besar pada penelitian kami dibanding Zhou dkk, Kwon dkk dan She dkk. Perbedaan metode kultur antar penelitian adalah medium basal, jenis serum yang ditambahkan dan kondisi inkubasi.

Efek parakrin ADSC tergantung pada jenis dan konsentrasi sekretom yang dihasilkan. Analisis histologi pada penelitian kami adalah densitas pembuluh darah, densitas kolagen, WCI, rasio epitelisasi, jarak epitelisasi, jumlah lapisan epitel dan luas area luka. Uji statistik terhadap analisis histologi menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka yang dibalur ADSC-CM dengan tiga kelompok kontrol lain, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol medium kultur dan kelompok kontrol pelarut.

Ketidakbermaknaan dalam perhitungan densitas pembuluh darah dapat dikarenakan konsentrasi VEGF tidak optimal, perlunya pemberian ADSC-CM berulang dan adanya keterbatasan penelitian dalam menghitung densitas pembuluh darah. Konsentrasi minimum efektif VEGF untuk menginduksi angiogenesis *in vivo* adalah 5000 pg/mL.^{20,35} Penelitian kami mengaplikasikan konsentrasi VEGF sebesar $5052,698 \pm 0,31$ pg/mL sedangkan perbedaan bermakna didapatkan pada aplikasi konsentrasi VEGF sebesar $12,3 \pm 2,4$ ng/mL oleh Kwon dkk.²⁰ Penyembuhan luka dengan aplikasi VEGF memerlukan pemberian berulang untuk mencapai hasil optimal.³⁶ ADSC-CM mengandung sitokin dan *growth factor* yang memiliki waktu paruh pendek, maka disarankan aplikasi ADSC-CM diberikan secara berulang.⁷ Pemberian tunggal ADSC-CM pada penelitian ini dilakukan karena jumlah ADSC-CM yang dimiliki terbatas. Penelitian ini memiliki keterbatasan berupa teknik perhitungan densitas

pembuluh darah berdasarkan morfologi pada sediaan dengan pewarnaan rutin HE. Pada teknik ini cukup sulit menentukan apakah struktur yang dilihat pembuluh darah atau bukan, terutama untuk menentukan pembuluh darah yang kecil. Pada proses angiogenesis morfologi pembuluh darah yang paling banyak dijumpai berupa pembuluh darah yang berukuran kecil atau tunas. Untuk meningkatkan keakuratan penilaian angiogenesis, dapat dilakukan pengamatan pada sediaan yang diberi pewarnaan khusus seperti pewarnaan imunohistokimia (IHK) CD 31, IHK CD 34, pewarnaan mikroskop fluoresen vWF dan SM- α aktin.^{20,23} Pada penelitian ini tidak dilakukan pewarnaan khusus karena kendala dana penelitian.

Efek ADSC-CM pada densitas kolagen dan kontraksi luka secara *in vivo* belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini membalurkan ADSC-CM 100% ke luka kulit tikus. Pada penelitian ini penilaian kontraksi luka dilakukan pada hari ke-3, 7 dan 14 perlukaan dengan jumlah sampel 17 tikus. Analisis densitas kolagen dinilai pada perlukaan hari ke-14 dan 28 dengan jumlah sampel 12 tikus. Penelitian kami membuktikan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara luka dengan atau tanpa pembaluran ADSC-CM. Hal ini dapat disebabkan karena diperlukan konsentrasi optimal *growth factor* yang dapat menstimulasi migrasi, proliferasi dan kemampuan kontraktilitas fibroblas. ADSC-CM adalah kombinasi berbagai *growth factor* dan sitokin dengan konsentrasi yang bervariasi. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan metode pemberian yang optimal baik dari konsentrasi maupun frekuensi pemberian. Pada hari ke-14 densitas kolagen tertinggi terlihat pada luka pembaluran ADSC-CM yang menandakan secara kualitatif pada hari ke-14 sintesis kolagen terbanyak ditemukan pada luka baluran ADSC-CM. Kepadatan serat kolagen tertinggi pada hari ke-28 tampak pada luka baluran medium basal. Pada tahap *remodeling* terjadi sintesis dan reabsorpsi kolagen yang terjadi secara terus menerus. Proses tersebut memperoleh keseimbangannya pada hari ke-21.⁵ Tingginya densitas kolagen luka baluran ADSC-CM pada hari ke-14 namun tidak pada hari ke-28 dapat memperlihatkan bahwa luka baluran ADSC-CM telah memperoleh keseimbangan antara sintesis dan reabsorpsi kolagen lebih cepat bila dibanding luka baluran medium basal. Ketidakseimbangan sintesis dan reabsorpsi kolagen pada tahap *remodeling* dapat menyebabkan terjadinya jaringan parut patologik.⁵

Hasil penelitian kami menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara luka pembaluran ADSC-CM dan luka tanpa pembaluran dalam parameter rasio epitelisasi, jarak epitelisasi dan jumlah lapisan epitel. Ketidakbermaknaan tersebut kemungkinan dikarenakan konsentrasi EGF

dalam ADSC-CM pada penelitian ini tidak optimal untuk menginduksi epitelisasi *in vivo* dan frekuensi pemberian ADSC-CM yang terbatas. Peningkatan epitelisasi yang bermakna dengan pemberian tunggal ADSC-CM monolayer telah dibuktikan oleh Zhou dkk.¹⁹ Perbedaan metode kultur antara penelitian Zhou dan penelitian kami dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi EGF yang disekresi oleh ADSC. Walaupun tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik namun terdapat kecenderungan ADSC-CM dapat menstimulasi proses epitelisasi. Pada analisis rasio epitelisasi terlihat luka dengan baluran ADSC-CM memiliki peningkatan rasio epitelisasi terbesar antar hari tiga dan tujuh bila dibanding luka lainnya. Hal tersebut juga terlihat pada perbandingan jarak epitelisasi antara hari tiga dan tujuh. Luka pembaluran ADSC-CM memiliki penurunan jarak antar luka terbesar dibanding luka lainnya. Secara kualitatif ditemukan perbedaan jumlah lapisan epitel antara luka baluran ADSC-CM dan luka kontrol. Luka pembaluran ADSC-CM memiliki jumlah lapisan epitel terbanyak pada perlukaan hari ke-7 dan 14 bila dibandingkan luka lainnya. Penelitian kami menemukan satu luka dengan epitelisasi yang terlambat dan pelebaran celah luka dibanding hari sebelumnya. Hal tersebut dapat disebabkan karena faktor stres pada tikus coba. Faktor stres dapat menurunkan proses penyembuhan luka secara signifikan.³⁷ Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis peran faktor tersebut.

Luas area luka menilai luas area perlukaan pada hari ke-14, 21 dan 28. Seiring maturasi jaringan perlukaan diharapkan terjadi penurunan luas area luka bila dibandingkan hari sebelumnya. Analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antar luka namun secara kualitatif ditemukan penurunan luas area luka antar hari perlukaan hanya terjadi pada luka pembaluran ADSC-CM. Hal tersebut menunjukkan bahwa luka baluran ADSC-CM lebih berpotensi dalam menurunkan luas area luka bila dibanding luka lainnya.

Proses penyembuhan luka pada tingkat *in vivo* dan *in vitro* berbeda karena pada penyembuhan luka *in vivo* terjadi sangat kompleks.³⁸ Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis peran ADSC-CM secara *in vivo* karena ADSC-CM merupakan *cocktail* berbagai sitokin dan *growth factor* yang dapat mempengaruhi berbagai aktivitas seluler dan molekuler proses penyembuhan luka.

Kesimpulan

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara luka pembaluran tunggal ADSC-CM monolayer dalam inkubasi normoxia selama tiga hari dan luka kontrol dalam meningkatkan kualitas dan kuantitas tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley dengan parameter densitas pembuluh darah, kontraksi luka, rasio epitelisasi, jarak epitelisasi, jumlah lapisan epitel, densitas kolagen dan luas area luka. Namun secara kualitatif ditemukan peningkatan tahap proliferasi penyembuhan luka insisi kulit tikus Sprague Dawley.

Daftar pustaka

1. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*. 2010;203:93-8
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Riset kesehatan dasar. 2013:101
3. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg* 2008;16:585-601
4. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery*. 2007;26(2):31-37
5. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanism. *J Int Med Res*. 2009;37:1528-42
6. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25:9-18
7. Pawitan JA, Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Research International*. 2014; 2014
8. Lee SH, Jin SY, Song JS, et al. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann Dermatol*. 2012;24(2):136-143
9. Hu L, Zhao J, Liu J, et al. Effects of adipose stem cell-conditioned medium on the migration of vascular endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. *Exp Ther Med*. 2013;5:701-6
10. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49: 35-43
DOI: 10.1159/000339613
11. Diegelmann RF, Evans MC. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Front Biosci*. 2004;9:283-9.
12. Pakyari M, Farrokhi A, Malarlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2012;2 Number 5:215-24 DOI: 10.1089/wound.2012.0406
13. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Inves Dermatol*. 2007;127:514-25
14. Greaves NS, Ashcorft KJ, Baguneid M, et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci*. 2013;72(3):206-17

15. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res.* 2014;163(4):399-408
16. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009;76:56-66
17. Hocking MA, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010;316:2213-9
18. Kim WS, Park Bs Sung JH. The wound healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(7):879-87
19. Zhou BR, Xu Y, Guo SL, et al. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *Biomed Res Int.* 2013;2013:519126
20. Kwon SH, Bhang SH, Jang HK, Rhim T, Kim BS. Conditioned medium of adipose-derived stromal cell culture in three-dimensional bioreactors for enhanced wound healing. *J Surg Res.* 2015;194:8-17
21. Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Guidelines. Iowa: IACUC: Anesthesia. c2014 [cited 2015 Jan 13]. Available from <http://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>
22. Juniarti. Pengaruh pemberian ekstrak daun jarak tintir (*Jatropha Multifida* L) secara topikal pada proses inflamasi dan fibroplasia luka sayat kulit [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2014
23. Gupta A, Pramod K. Assesment of the histological state of the healing wound. *Plast Aesthet Res.* 2015;2:239-42
24. Triyono B. Perbedaan tampilan kolagen di sekitar luka insisi pada tikus wistar yang diberi infiltrasi penghilang nyeri levobupivakain dan yang tidak diberi levobupivakain [tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2005
25. Lemo N, Marignac G, Lilin T, Reyes-Gomez E, Crosaz O, Ehrenfest DMD. Cutaneous reepithelialization and wound contraction after skin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and remodelling index. *Vet Arhiv.* 2010;80(5):637-59
26. Walter MNM, Wright KT, Fuller HS, MacNeil S, Johnson WEB, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 2010;316:1271-81

27. Kim J, Lee JH, Yeo SM, Chung HM, Chae JI. Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cell that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing. *In Vitro Cell Dev Biol.* 2014;50:146-54
28. Greaves NS, Ashcorft KJ, Baguneid M, et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci.* 2013;72(3):206-17
29. Chen D, Hao H, Fu X, et al. Insight into reepithelialization: how do mesenchymal stem cells perform. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:1-9. Article ID 6120173
Belavia G, Fasanaro P, Melchionna R, et al. Transcriptional control of skin reepithelialization. *J Dermatol Sci.* 2014; 73(1):3-9
30. Belavia G, Fasanaro P, Melchionna R, et al. Transcriptional control of skin reepithelialization. *J Dermatol Sci.* 2014;73(1):3-9
31. Christian L, Baum MD, Christopher J. Normal cutaneous wound healing: clinical corelation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 2005;31(6):674-86
32. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):274-86
33. She T, Hu D, Zhang J, Liu J, Chen G, Cai W, et al. Cytobiological effect of adipose-derived stem cells treated with insulin on HaCat cells. *Zhongqquo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2009;23(6):727-31
34. Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, et al. Hair growth stimulation by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res.* 2010;31(1):27-34
35. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther.* 2014;22(4):862
36. Kryger Z, Zhang F, Dogan T. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of adminitration. *J Plast Surg.* 2000;53(3):234-9
37. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29
38. Hu L, Zhao J, Liu J, Gong N, Chen L. Effects of adipose stem cell-conditioned medium on the migration of vascular endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. *Exp Ther Med.* 2013;5:701-6