



Efek Kafein Dosis Bertingkat terhadap Epitelisasi dan Densitas Mikrovaskuler pada Penyembuhan Luka *Full Thickness Skin Graft* Autologus Tikus Sprague Dawley

Aditya Purnama^{1*}, Neni Susilaningih², Awal Prasetyo³

¹Residen Bedah Umum Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi, Semarang, Indonesia

²Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

³Staf Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

*Corresponding author: adityapurnama0511@gmail.com

Info Artikel : Diterima 28 Desember 2018 ; Disetujui 20 Februari 2020 ; Publikasi 1 April 2020

ABSTRAK

Latar belakang : Skin graft saat ini menjadi salah satu terapi pilihan pada proses penyembuhan luka yang selalu berkembang. Proses epitelisasi dan pembentukan pembuluh darah baru memiliki peran penting dalam penyembuhan luka skin graft. Kandungan kafein (1,3,7 trimethylxanthine) sebagai antioksidan memiliki peran yang penting dalam penyembuhan luka. Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan efek kafein dalam berbagai dosis dalam meningkatkan densitas mikrovaskuler dan epitelisasi pada luka skin graft.

Metode : Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan “*Blinded randomized post test only controlled group design*” terhadap 24 ekor tikus Sprague Dawley dilakukan skin graft autologous pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 4 grup (K = tanpa pemberian kafein), (P1 = Kafein 3 mg), (P2 = Kafein 6 mg), (P3 = Kafein 9 mg). Penilaian prosentase epitelisasi dan jumlah densitas mikrovaskuler jaringan dilakukan dengan pengecatan *hematoxylin & eosin* setelah hari ke 7 pasca skin graft.

Hasil : Analisis statistik perbandingan prosentase epitelisasi jaringan didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K vs P1 ($p = 0,003$), K vs P2 ($p = 0,001$), K vs P3 ($p = 0,001$), P1 vs P2 ($p = 0,001$), P1 vs P3 ($p = 0,001$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok P2 vs P3 ($p = 0,669$) dan pada jumlah densitas mikrovaskuler, didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K vs P2 ($p = 0,010$), K vs P3 ($p = 0,008$), P1 vs P2 ($p = 0,009$), P1 vs P3 ($p = 0,007$), P2 vs P3 ($p = 0,008$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok K vs P1 ($p = 0,343$).

Kesimpulan : Kafein dapat meningkatkan prosentase epitelisasi dan jumlah densitas mikrovaskuler jaringan pada proses penyembuhan luka *skin graft autologus* tikus Sprague Dawley.

Kata Kunci : Kafein, *skin graft autologus*, epitelisasi, densitas mikrovaskuler

ABSTRACT

Title: *Effects of Increased Dose Caffeine on Epithelialization and Microvascular Density in the Healing of Full Thickness Skin Graft Autologous Sprague Dawley Mouse*

Background: *Skin graft is currently one of the therapies of choice in the healing process of wounds that always develops. The process of epithelialization and formation of new blood vessels has an important role in healing skin graft wounds. Caffeine content (1,3,7 trimethylxanthine) as an antioxidant has an important role in wound healing.*

The aim of this study is to prove the effects of caffeine in various doses in increasing microvascular density and epithelialization in skin graft injuries.

Method: This research is an experimental study with a "Blinded randomized post test only controlled group design" of 24 Sprague Dawley rats by autologous skin graft at the same time. Samples were randomly divided into 4 groups (K = no caffeine), (P1 = Caffeine 3 mg), (P2 = Caffeine 6 mg), (P3 = Caffeine 9 mg). The assessment of the percentage of epithelialization and the amount of tissue microvascular density was done by painting hematoxylin & eosin after 7 days after skin graft.

Results: Statistical analysis of the comparison of tissue epithelialization percentage found significant differences between groups K vs P1 ($p = 0.003$), K vs P2 ($p = 0.001$), K vs P3 ($p = 0.001$), P1 vs P2 ($p = 0.001$), P1 vs P3 ($p = 0.001$). No significant difference was found between the P2 vs P3 group ($p = 0.669$) and in the total microvascular density, a significant difference was found between the K vs P2 group ($p = 0.010$), K vs P3 ($p = 0.008$), P1 vs P2 ($p = 0.009$), P1 vs P3 ($p = 0.007$), P2 vs P3 ($p = 0.008$). No significant difference was found between the K vs P1 groups ($p = 0.343$).

Conclusion: Caffeine can increase the percentage of epithelialization and the amount of tissue microvascular density in the healing process of autologous skin grafts of Sprague Dawley rats.

Keywords: Caffeine, autologous skin graft, epithelialization, microvascular density

PENDAHULUAN

Dalam berbagai macam modal terapi dalam penyembuhan luka, *skin graft* saat ini menjadi salah satu terapi pilihan pada proses penyembuhan luka yang sering digunakan dewasa ini di bidang bedah plastik khususnya. Data yang dihimpun oleh RSUD Dr. Soetomo dalam evaluasi tahun 2007 hingga 2011 sekitar 26.2%. Data tahun 2012 tercatat sebanyak 25 kasus luka bakar derajat dalam (23.8%) dilakukan tindakan *skin graft* dan di rawat di burn unit RSUD Dr. Soetomo dari total 105 penderita luka bakar yang dirawat.¹ Penyebab terbanyak oleh karena api, penyebab lainnya karena listrik, air panas, minyak dan zat kimia.²

Pada proses penyembuhan luka, pembentukan dan perkembangan pembuluh darah atau angiogenesis merupakan hal yang sangat penting. Proses penyembuhan luka juga dapat dilihat dari parameter lain yaitu proses epitelisasi, dimana sel-sel epitel mulai berproliferasi di pinggir luka lapis demi lapis dan berlanjut sampai sel epitel telah kembali ke fenotip normalnya dan telah berkontak kembali dengan membran basal. Proses ini terjadi pada fase proliferasi yaitu dimulai dari hari ke-4 hingga hari ke-21 setelah perlukaan terjadi.³

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sebelumnya telah ada. Selama proses ini, sel endotel di pembuluh darah yang inaktif menjadi teraktivasi, menimbulkan munculnya 'tunas' pembuluh darah baru. Dua tunas yang saling berdekatan akan bergabung agar

terbentuk perfusi dan akhirnya pembuluh darah yang fungsional dan matur akan terbentuk.⁴

Proses di atas diduga diatur oleh perubahan kadar molekul proangiogenik dan antiangiogenik di lingkungan sekitar pembuluh darah. Mediator proangiogenik dan antiangiogenik yang telah teridentifikasi yaitu *Basic fibroblasts growth factor*, *placental growth factor (PIGF)*, *transforming growth factor- β* , *interleukin-8*, *platelet derived growth factor*, dan VEGF adalah protein-protein yang menstimulasi angiogenesis. Pemeliharaan pembuluh darah saat fase inaktif diduga terjadi ketika kadar sinyal antiangiogenik melebihi sinyal proangiogenik. Periode angiogenesis aktif terjadi ketika sel endotel mengenali atau merasakan pergeseran keseimbangan mediator-mediator ini, dimana sinyal proangiogenik melebihi sinyal antiangiogenik yang dikenal sebagai *angiogenic switch*.⁵

Aspek nutrisi mempunyai peran yang sangat penting dalam penyembuhan luka pada kasus *skin graft*. Saat ini nutrisi yang terkenal yaitu kafein (*1,3,7-trimethylxanthine*) sebagai antioksidan disebut punya fungsi yang penting dalam penyembuhan luka. Efek antioksidatif dari konsumsi kafein kronis dapat menekan risiko diabetes dan memperbaiki penyembuhan luka dengan meningkatkan jumlah reseptor adenosine.⁶ Diungkapkan juga pada penelitian lain ditemukan bahwa kafein mempunyai efek sebagai antagonis *adenosine-receptor A2* yang mencegah

proliferasi dan migrasi keratinosit serta dapat memiliki efek inhibitorik pada penyembuhan luka.⁷

Tujuan umum penelitian ini adalah membuktikan efek kafein dosis bertingkat terhadap proses penyembuhan luka *skin graft* autologus tikus *Sprague Dawley*. Tujuan khususnya adalah membuktikan adanya pengaruh terhadap prosentase epitelisasi dan jumlah densitas mikrovaskuler jaringan pada tikus *Sprague Dawley* yang diberi kafein dosis rendah, dosis sedang, dosis tinggi dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan kafein. Hipotesis penelitian ini adalah pemberian diet kafein dapat meningkatkan prosentase epitelisasi dan jumlah densitas mikrovaskuler jaringan pada penyembuhan luka jaringan *skin graft* autologus tikus *Sprague Dawley*.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan “*Blinded randomized post test only controlled group design*”. Penelitian dilakukan di laboratorium hewan coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, laboratorium Patologi Anatomi, Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi dan RS Nasional Diponegoro Semarang dengan waktu penelitian April – Juni 2018. Penelitian ini juga telah mendapatkan *Ethical Clearance* dari Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Seluruh sampel (Tikus *Sprague Dawley*) dilakukan *Skin Graft* Autologus pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 4 grup (K= Tanpa intake kafein), (P1= kafein 3 mg), (P2 = kafein 6 mg), (P3 = kafein 9 mg). Semua sampel berasal dari LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakarta telah memenuhi kriteria inklusi yaitu berat badan 150 gram setelah aklimatisasi selama 7 hari, tanpa kelainan anatomis, berjenis kelamin jantan, tidak ada penampakan sakit. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah makrofag jaringan, jumlah neutrofil darah tepi dan jumlah monosit darah tepi. Kriteria *drop out* adalah bila tikus ada penampakan sakit, *skin graft* gagal dan tikus mati selama percobaan.

Perhitungan epitelisasi dan densitas mikrovaskuler jaringan dilakukan pada hari ke 7 pasca *Skin Graft*. Data hasil penelitian meliputi: prosentase epitelisasi jaringan dan jumlah densitas mikrovaskuler. Untuk penilaian prosentase epitelisasi jaringan pada setiap kelompok perlakuan dilakukan pemeriksaan dengan *Software Image J*

sedangkan jumlah densitas mikrovaskuler dibaca dengan 5 lapangan pandang, keduanya melalui pemeriksaan *Hematoxylin & Eosin*. Sebelum dilakukan analisis dilakukan uji normalitas dengan Saphiro Wilk karena jumlah data kurang dari 50. Data dianalisis dengan metode ANOVA, *Post Hoc Benferonni Test*, *Kruskall-Wallis* dan uji *post hoc Mann-Whitney Test*. Perbedaan dinyatakan bermakna bila didapatkan nilai $P \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%. Analisis data dilakukan dengan program yang terkomputerisasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Epitelisasi

Untuk uji epitelisasi didapatkan data normal dan homogen, sehingga dilanjutkan uji beda *One Way ANOVA*. Uji statistik ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jumlah sel makrofag jaringan antar kelompok penelitian. Hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai $p = 0,001$ (signifikan $p < 0,05$), terdapat perbedaan bermakna prosentase epitelisasi jaringan pada keempat kelompok, dapat dilihat pada tabel 1. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Tabel 1. Analisis Perbedaan Epitelisasi

Kelompok	Mean \pm SD	P value
K	57,9 \pm 3,5	0,001
P1	65,4 \pm 1,3	
P2	75,3 \pm 2,8	
P3	78,2 \pm 2,8	

* Diuji dengan *One Way ANOVA* ($p < 0,05$)

Prosentase epitelisasi jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,001$ ($p \leq 0,05$). Prosentase epitelisasi jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis sedang, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,001$ ($p \leq 0,05$). Prosentase epitelisasi jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis rendah, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,003$ ($p \leq 0,05$). Prosentase epitelisasi jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis sedang, dibandingkan kelompok rendah $p = 0,001$ ($p \leq 0,005$). Prosentase epitelisasi jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok rendah $p = 0,001$ ($p \leq 0,05$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok P3 dengan P2 ($p = 0,669$)

Tabel 2. Analisis *Post Hoc Bonferroni* epitelisasi antar kelompok

Kelompok	P1	P2	P3
K	0,003*	0,001*	0,001*
P1	–	0,001*	0,001*
P2	–	–	0,669

*Diuji dengan *Post Hoc Bonferroni* ($p < 0,05$)

Densitas Mikrovaskuler

Setelah dilakukan uji *Shapiro-Wilk*, didapatkan data tidak normal dan homogen, sehingga dilanjutkan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* (tabel 3) didapatkan nilai $p = 0,001$ (signifikan $p < 0,05$) maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna jumlah densitas mikrovaskuler pada keempat kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang disajikan dalam tabel 4.

Jumlah densitas mikrovaskuler jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,008$ ($p \leq 0,05$). Jumlah densitas mikrovaskuler jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis sedang, dibandingkan kelompok kontrol $p = 0,010$ ($p \leq 0,05$). Jumlah densitas mikrovaskuler jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis sedang, dibandingkan kelompok rendah $p = 0,009$ ($p \leq 0,005$). Jumlah densitas mikrovaskuler jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok rendah $p = 0,007$ ($p \leq 0,05$). Jumlah densitas mikrovaskuler jaringan lebih tinggi secara signifikan pada kelompok dosis tinggi, dibandingkan kelompok sedang $p = 0,008$ ($p \leq 0,05$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok K dengan P1 ($p = 0,343$).

Tabel 3. Analisis Perbedaan Densitas Mikrovaskuler

Kelompok	Median (min – max)	p
K	4 (3 – 5)	0,001
P1	4 (4 – 5)	
P2	6 (5 – 7)	
P3	13 (12 – 14)	

* Diuji dengan *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$)

Tabel 4. Analisis *Mann Whitney* Densitas Mikrovaskuler antar kelompok

Kelompok	P1	P2	P3
K	0,343	0,010*	0,008*
P1	–	0,009*	0,007*
P2	–	–	0,008*

*Diuji dengan *Mann Whitney* ($p < 0,05$)

Epitelisasi Jaringan

Hasil penelitian menunjukkan, persentase epitelisasi jaringan ditemukan rerata lebih tinggi pada kelompok pemberian kafein dosis sedang dibandingkan kelompok pemberian kafein dosis rendah, dan rerata lebih tinggi pada kelompok pemberian kafein dosis tinggi dibandingkan kelompok pemberian kafein dosis sedang maupun dosis rendah di bandingkan dengan grup kontrol yang tidak diberikan asupan kafein. Analisis perbedaan presentase epitelisasi dilakukan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Hasil analisis perbedaan antar kelompok persentase epitelisasi dilakukan menggunakan uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan bermakna.

Sesuai dengan penelitian terdahulu yang mengungkapkan bahwa kafein meningkatkan proliferasi sel yang menunjukkan efek spesifik tipe sel. Fibroblas kulit manusia yang pra-perawatan dengan kafein dilindungi terhadap nekrosis yang diinduksi hidrogen peroksida, yang menyebabkan peningkatan jumlah sel dan peningkatan morfologi sel, mekanisme perlindungan yang tampaknya dimediasi oleh mekanisme selain fungsi antioksidan.^{8,9}

Kafein dan produk katabolik theobromine dan xanthine telah terbukti memiliki sifat antioksidan.¹⁰, ini menguatkan laporan bahwa efek penghambatan kafein pada kerusakan DNA oksidatif oleh radikal hidroksil dan efek quenching pada produksi radikal hidroksil dimana antioksidan juga telah terbukti meningkatkan penyembuhan luka.¹¹

Selama proses penyembuhan luka *skin graft*, Faktor pertumbuhan yang berperan besar dalam proses proliferasi selama epitelisasi meliputi HB-EGF, EGF, TGF α , dan KGF yang disebutkan sebelumnya. Faktor pertumbuhan lain yang ada pada luka, *insulin growth growth factor* (IGF)-1, terbukti berperan sinergis dengan HB-EGF dalam merangsang proliferasi keratinosit. MMP, komponen ECM, dan integrin, dapat bekerja sama untuk membantu faktor pertumbuhan dalam mendorong proliferasi keratinosit. MMP bekerja melalui aktivitas proteolitiknya untuk melepaskan faktor pertumbuhan dari matriks luka dan MMP juga dapat memproses bentuk laten dari faktor pertumbuhan, seperti IGF-1, mengubahnya menjadi bentuk aktif. ECM juga dapat melibatkan integrin untuk memodulasi jalur reseptor faktor pertumbuhan, yang menyebabkan peningkatan aktivitas faktor pertumbuhan. Singkatnya, sinergi antara faktor pertumbuhan, ECM, dan integrin adalah hal-hal yang memainkan peran penting dalam regulasi proliferasi keratinosit selama re-epitelisasi.¹²

Proses fisiologi manusia dalam hal ini khususnya penyembuhan luka merupakan salah satu yang paling kompleks. Mekanisme ini melibatkan serangkaian reaksi serta interaksi antara sel dengan mediator dimana dibagi dalam beberapa fase. Setidaknya terdapat 3 prasyarat kondisi lokal agar proses penyembuhan luka dapat berlangsung dengan normal, yaitu: 1) semua jaringan area luka dan sekitarnya harus vital, 2) tidak terdapat benda asing, 3) tidak disertai kontaminasi eksojen atau infeksi.² Menunjukkan bahwa kafein dapat berperan sebagai antioksidan di dalam tubuh. Saat terjadi cedera jaringan, sel – sel yang rusak akan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) pada fase awal penyembuhan luka dimana antioksidan dibutuhkan untuk menghalau radikal bebas dan mempercepat penutupan luka.¹³ Pada penelitian secara *in vitro* yaitu pada sel keratinosit dan sel epidermal manusia, bahwa kafein dapat menghambat proliferasi sel serta migrasi sel pada dosis tertentu.^{2,14} Hal ini memperlihatkan dua fungsi kafein pada proses penyembuhan luka.

Jumlah Densitas Mikrovaskuler

Didapatkan rerata densitas mikrovaskuler lebih tinggi pada kelompok pemberian kafein dosis tinggi dibandingkan dosis sedang maupun dosis rendah terutama dengan grup kontrol dimana tidak diberikan asupan kafein. Analisis perbedaan densitas mikrovaskuler dilakukan menggunakan uji *Kruskal Wallis* didapatkan hasil terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Dikarenakan terdapat perbedaan bermakna kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis *Post Hoc* menggunakan *Mann Whitney* dengan hasil terdapat perbedaan signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa kafein memiliki mekanisme sebagai antagonis *adenosine-receptor* dimana dapat menginduksi penyembuhan luka melalui peningkatan angiogenesis.¹⁵ Penelitian lain juga mengungkapkan, kafein memiliki mekanisme sebagai antagonis *adenosine-receptor* (A2) dimana dapat menginduksi penyembuhan luka melalui peningkatan regulasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) secara sinergis.¹⁶

Seperti telah dijelaskan sebelumnya bahwa Penelitian sebelumnya menggambarkan bahwa adenosin dan analognya, melalui reseptor adenosin A_{2A} yang mengikat, meningkatkan proliferasi dan migrasi sel endotel serta pelepasan VEGF, menunjukkan bahwa reseptor adenosin meningkatkan penyembuhan luka melalui peningkatan sekresi faktor pertumbuhan ke area target.^{17,18} Penelitian terdahulu juga mengungkapkan, bahwa kafein

memiliki mekanisme sebagai antagonis *adenosine-receptor* A2 dimana dapat menginduksi penyembuhan luka melalui peningkatan angiogenesis. Diungkapkan juga pada penelitian lain ditemukan bahwa kafein dapat menghambat penyembuhan luka dengan mekanisme penghambatan epitelialisasi dan menekan proliferasi sel melalui efek anti inflamasinya dimana saat penyembuhan luka dibutuhkan mediator – mediator inflamasi untuk menstimulasi berbagai *vascular endothelial growth factor*.^{1,6,19} Selama angiogenesis, pembuluh darah baru terbentuk dari pembuluh darah inaktif yang telah ada sebelumnya yang bermigrasi dan berproliferasi untuk memanjangkan pembuluh darah. Saat fase resolusi angiogenesis, dua pembuluh darah yang berdekatan akan bergabung untuk membentuk aliran darah dan pembuluh darah yang non-perfusi akan mengalami regresi. Pada akhirnya, membran basal akan dibuat kembali, pericyte akan kembali melingkupi pembuluh darah, dan pembuluh darah akan kembali ke keadaan inaktif.⁴

SIMPULAN

Berbagai pembahasan diatas dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada presentase epitelisasi dan jumlah densitas mikrovaskuler jaringan pada penggunaan kafein dosis bertingkat pada proses penyembuhan luka *skin graft autologus* tikus *Sprague Dawley*. Peneliti juga menyadari masih banyak keterbatasan penelitian yang harus diperbaiki untuk melengkapi dan menyempurnakan penelitian ini. Salah satu keterbatasan penelitian ini karena diuji hanya dengan pengecatan sederhana *Hematoxylin & Eosin*. Akan lebih baik penelitian mendatang dapat dilakukan pada beberapa mediator pertumbuhan jaringan lain, serta pengecatan yang lebih kompleks dengan imunohistokimia seperti VEGF, IGF.

Penelitian ini hanya melakukan analisa dan pemeriksaan pada hari ke 7 pasca *skin graft*, akan lebih baik bila pemeriksaan jumlah sel inflamasi dievaluasi pada 14 hari atau lebih pasca *skin graft* dan sehingga dapat memonitor proses penyembuhan luka epitelisasi dan jumlah densitas mikrovaskuler yang lebih menyeluruh sesuai dengan tahapan penyembuhan luka.

Selain itu penelitian ini dilakukan pada media hewan coba tikus, tidak menutup kemungkinan mungkin media penelitian dapat ditingkatkan dapat ditingkatkan lebih lanjut pada hewan coba lain yang mempunyai tekstur kulit menyerupai manusia seperti babibila memungkinkan, agar mendapatkan hasil yang lebih mendekati untuk penggunaan pada manusia di masa datang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hidayat T, Noer M, Saputro I. Five years retrospective study of burns in Dr. Soetomo General Hospital Surabaya. PIT PERAPI; Medan: Department of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery; 2012; 2-10.
2. Sjamsuhidajat, Jong D. Buku Ajar Ilmu Bedah. 4 ed. Jakarta: EGC; 2017;237
3. Geoffrey C, Victor W. Wound Healing: Normal and Abnormal. In: Thome CH, editor. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014; 20-35.
4. Johnson K, Wilgus T. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care*. 2014;3(10);77-86.
5. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(353);43-9.
6. Bonyanian Z, Rose Meyer RB. Caffeine and its Potential Role in Attenuating Impaired Wound Healing in Diabetes. *J Caff Research*. 2015;5(4);1-8.
7. Ojeh N, Stojadinovic O, Pastar I, Sawaya A, Yin N, Tomic-Canic M. The effects of caffeine on wound healing. *Int Wound J*. 2016;13(5):605-13.
8. Liu P, Tong W, Liu K, Han S, Wang X, Badiavas E, et al. Liposome-mediated transfer of vascular endothelial growth factor cDNA augments survival of random-pattern skin flaps in the rat. *Wound Repair Regen*. 2004;12(80);45-51.
9. Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Cucinotta D, Arsic N, Marini H, et al. Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetologia*. 2003;46(546);12-9.
10. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999; 5(4);434-8.
11. Tepper O, Capla J, Galiano R, Ceradini D, Callaghan M, Kleinman M, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005; 105(3);1068-7.
12. Pastar I, Stojadinovic O, Yin N, Ramirez H, Nusbaum A, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv In Wound Care*. 2014;3(7);30-9.
13. Barcelos R, Souza M, Amaral G, Stefanello S, Bresciani G, Figuera M, et al. Caffeine intake may modulate inflammation markers in trained rats. *Nutrients*. 2014;6(4):1678-90.
14. Feoktistov I, Biaggioni I, Cronstein BN. Adenosine receptors in wound healing, fibrosis and angiogenesis. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(193);383-97.
15. Cronstein B. Adenosine receptors and fibrosis: a translational review. *F1000 Biol Rep*. 2011;3(21); 77-85.
16. Leibovich S, Chen J, Pinhal-Enfield G, Belem P, Elson G, Rosania A, et al. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin. *An H Pathol*. 2002;160(6):2231-44.
17. Merighi S, Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1Alpha, vascular endothelial growth factor, and interleukin 8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 2007;72:395-406.
18. Da Rocha LF, Junior S, Cerutti M, Santos A. Pharmacology of adenosine receptors and their signalling role in immunity and inflammation. *Pharmacology and Therapeutics Journal*. 2014;3:442-5.
19. Carmeliet P, Jain R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347);298-307.