

**PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME*
MESENCHYMAL STEM CELL HYPOXIA (SH-MSC)
TERHADAP EKSPRESI GEN P38 DAN VEGF
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur *Wistar*
Model Luka Diabetik Like yang diInduksi Streptozotocine)**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister S-2



Magister Ilmu Biomedik

Tarrayuana Rhamadia

MBK. 22.19.010299

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2023**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME MESENCHYMAL STEM*
CELL HYPOXIA (SH-MSC) TERHADAP EKSPRESI
 GEN P38 DAN VEGF
 PADA TIKUS MODEL LUKA DIABETIK

Disusun oleh
TARRAYUANA RHAMADIA
 (MBK 221.9010.299)

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II


 Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med


 dr. Mas Rizky A.A. Syamsunarno, M.Kes, Ph.D

NIK. 210199050

NIK. 198212012009121006

Menyetujui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas
 Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med

NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.



RIWAYAT HIDUP

A. IDENTITAS

Nama	: Tarrayuana Rhamadia
Tempat / tanggal lahir	: Bandar lampung, 12 Juni 1985
Agama	: Islam
Jenis kelamin	: Perempuan

B. RIWAYAT PENDIDIKAN

1. SDN 01 Palembang Kalianda : Lulus tahun 1997
2. SMPN 01 Kalianda, Lampung Selatan : Lulus tahun 2000
3. SMAN 02 Kalianda, Lampung Selatan : Lulus tahun 2003
4. S1 Fakultas Kedokteran UNILA Lampung : Lulus tahun 2008
5. Profesi Dokter UNILA Lampung : Lulus Tahun 2010
6. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2022 - sekarang)

C. RIWAYAT KELUARGA

1. Nama Suami : dr. Bobby Anggara, Sp.P
2. Nama Anak : Althaf Mahesarayyan Anggara
Mavendra Fayyad Anggara

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penulisan tesis ini untuk memenuhi dan melengkapi tugas akhir program magister pasca sarjana (S2). Salawat serta salam selalu tercurah kepada Baginda Nabi Besar Muhammad Sallahu alaihi wassalam yang selalu menginspirasi untuk senantiasa memberikan kebermanfaatan kepada sesama.

Pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis dengan judul “PENGARUH PEMBERIAN GEL *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSC) TERHADAP EKSPRESI GEN P38 DAN VEGF (Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Model Luka Diabetik Like yang diInduksi Streptozotocine)”

Selama penulisan tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pada yang terhormat :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik.

2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik.
3. Associate Prof. DR. dr. H. Agung Putra., M.Si., Med selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan sekaligus sebagai pembimbing I dalam penelitian yang telah berkenan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
4. dr. Mas Rizky A.A. Syamsunarno, M.Kes, Ph.D selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan masukan penyusun selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.F sebagai penguji I, Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp. KK (K) sebagai penguji II, Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes sebagai penguji III yang telah berkenan menguji dan selalu memberikan saran, kritik membangun dalam penyusunan tesis ini
6. Seluruh dosen program Magister Biomedik yang telah mencurahkan waktu dan memberikan banyak pengetahuan kepada penulis selama masa Pendidikan sehingga bisa mendukung penulis dalam melakukan penelitian.
7. Seluruh staf Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama melakukan penelitian di Laboratorium.
8. Seluruh staf *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR) yang telah meluangkan waktu untuk membantu penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium

9. Semua rekan sejawat dan teman sesama peserta didik Program Studi Magister Biomedik FK UNISSULA atas kebersamaan, dukungan, dan bantuan selama masa Pendidikan hingga penelitian.
10. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
11. Kepada suami tercinta dr.Bobby Anggara, Sp.P yang telah mendukung dan mendampingi dengan penuh kesabaran, dukungan dan bantuan selama masa Pendidikan hingga penelitian.
12. Kepada anak-anakku tersayang, Althaf Mahessarayyan Anggara dan Mavendra Fayyad Anggara, terima kasih atas doa dan dukungannya selama ini sehingga saya bisa menyelesaikan Pendidikan S2 ini. Semoga Allah SWT menjadikan kalian anak yang beriman dan menjadi penyejuk mata serta hati bagi kami selaku orang tua.
13. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan proposal tesis yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Manusia tidak luput dari kesalahan karena tidak ada manusia yang sempurna, untuk itu penulis mengucapkan permohonan maaf yang sebesar-besarnya apabila selama mengikuti Pendidikan pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan dalam penyusunan tesis ini terdapat kesalahan baik yang disengaja ataupun tidak disengaja. Penulis berharap dengan semua kekurangan dalam penulisan tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Program Pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa

melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua. Aaminn Ya Rabbal
Alamin.

Semarang, 20 Agustus 2023



(Tarrayuana Rhamadia)



ABSTRAK

Latar Belakang: Ulkus diabetikum merupakan komplikasi *microvascular* yang paling banyak terjadi pada DM yang disebabkan oleh hambatan penyembuhan luka akibat autoimun sehingga terjadi kerusakan absolut sel β pankreas. MSCs dalam kondisi hipoksia dapat mensekresikan *secretome* yang mengandung *growth factor* seperti VEGF mampu mempercepat proses *angiogenesis* pada penyembuhan luka. **Tujuan:** Membuktikan pengaruh pemberian gel *secretome* MSCs Hipoksia terhadap peningkatan ekspresi VEGF dan P38 pada tikus luka diabetik yang diinduksi Streptozotocine.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* dengan desain penelitian *Post test Only Control Group Design*. Jumlah sampel 24 ekor tikus jantan wistar, dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok K1 (tikus sehat), kelompok K2 (tikus kontrol negatif), kelompok K3 (tikus kontrol positif) dan kelompok K4 (tikus dengan luka diabetik diberikan *secretome* dosis 100 μ l), K5 (tikus dengan luka diabetik diberikan gel *secretome* dosis 200 μ l) serta diberikan perlakuan selama 10 hari. Ekspresi gen P38 dan ekspresi gen VEGF diuji menggunakan uji Kruskal Wallis dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Mann Whitney*.

Hasil: Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi VEGF terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol ($p = 0.000$). Hasil analisis ekspresi P38 terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dibandingkan kontrol ($p=0.000$)

Kesimpulan: Pemberian gel *secretome* MSCs hipoksia berpengaruh dalam peningkatan ekspresi VEGF, meningkatkan ekspresi P38 tikus luka diabetik yang diinduksi Streptozotocine

Kata Kunci: MSCs, Hipoksia, luka diabetik, ekspresi gen VEGF, ekspresi gen P38

ABSTRACT

Background: Diabetic ulcer is the most common microvascular complication in diabetes mellitus due to total damage of pancreatic β cells caused by autoimmun . MSCs in hypoxic conditions secrete a secretome containing growth factors such as VEGF which may accelerate the angiogenesis process in wound healing.

Aim: To study the effect of administration of hypoxic MSCs secretome gel on increased expression of VEGF and P38 in rats with diabetic wound induced by Streptozotocine.

Methods: This research used in vivo experimental study with a post test only control group design. The total sample was 24 male rats from *wistar* strain, divided into five groups, K1 (healthy mice), K2 (negative control), K3 (positive control) and K4 (rats with diabetic wounds given 100 μ l secretome gel), K5 (rats with diabetic wounds given 200 μ l secretome gel). The treatment was given for 10 days. The P38 and VEGF gene expression were tested using the Kruskal Wallis followed by the Post Hoc Mann Whitney test.

Results: This study showed that there was a significant difference in the expression of VEGF in the treatment group compared to the control group ($p=0.000$). In the analysis of P38 expression, treatment groups also showed significant differences compared to controls ($p=0.000$) after being given treatment.

Conclusion: The administration of gel secretome hypoxic Mesenchymal Stem Cell has an effect on increasing of level VEGF expression, increasing of level p38 expression in rats with diabetic ulcer induced by Streptozotocine.

Keywords: MSCs, hypoxia, diabetic ulcer, VEGF gene expression, P38 gene expression

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT_PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR BAGAN.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 LATAR BELAKANG.....	1
1.2 RUMUSAN MASALAH.....	4
1.3 TUJUAN PENELITIAN.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 MANFAAT PENELITIAN.....	5
1.4.1 Teoritis.....	5
1.4.2 Praktis.....	5
1.5 ORIGINALITAS PENELITIAN.....	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 EKSPRESI GEN P38.....	11
2.2 EKSPRESI GEN VEGF.....	16
2.3 SEL PUNCA MESENKIMAL (<i>MESENCHYMAL STEM CELL</i>).....	22
2.4 <i>SECRETOME MSC</i>	28
2.5 LUKA DIABETIK	30
2.6 PENGARUH PEMBERIAN GEL <i>SECRETOME HYPOXIC MESENCHYMAL STEM CELL</i> (SH-MSC) TERHADAP EKSPRESI GEN P38 DAN GEN VEGF PADA TIKUS JANTAN GALUR WISTAR MODEL LUKA DIABETIK	35
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS.....	39
3.1 KERANGKA TEORI	39
3.2 KERANGKA KONSEP	42
3.3 HIPOTESIS.....	42
BAB IV METODE PENELITIAN	43
4.1 JENIS PENELITIAN DAN RANCANGAN PENELITIAN.....	43
4.2 VARIABEL PENELITIAN DAN DEFINISI OPERASIONAL.....	45
4.3 SUBYEK PENELITIAN DAN SAMPEL PENELITIAN.....	47
4.4 TEKNIK PENGAMBILAN SAMPEL	48
4.5 BESAR SAMPEL.....	49
4.6 ALAT DAN BAHAN.....	49
4.7 CARA PENELITIAN.....	50
4.8 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	58
4.9 ANALISA DATA.....	58
4.10 ALUR PENELITIAN	60
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	61
5.1 HASIL PENELITIAN	62
5.2 PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN	68
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	75
6.1 KESIMPULAN.....	75

6.2 SARAN	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	84



DAFTAR SINGKATAN



ACE	: Angiotensin Converting Enzyme
AD-MSC	: Adiposed Derived Mesenchymal Stem Cell
ADSC-EVs	: Adiposed Derived Stem Cell- Extra Vesicle
AGEs	: <i>Advanced Glycation of End Products</i>
ASK-1	: <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
bFGF	: Basic <i>Fibroblast growth factor</i>
BM-MSC	: <i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell</i>
eNOS	: endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK ½	: Extracellular-signal-regulated kinase 1/2
FAK	: Focal Adhesion Kinase
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
fMLP	: <i>N-formyl-l-leucyl-phenilalanin</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
Grb2	: Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
H-ADMSC	: Human Adiposed Derived Mesenchymal Stem Cell
HGF	: <i>Hepatocyte growth factor</i>
HE	: <i>Hematoksin-Eosin</i>
Hf-MSC	: <i>Human Fetal Mesenchymal Stem Cell</i>
HFS-PLGA	: <i>Human Fetal Serum- Poly Lactic co-Glycolic Acid</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN-γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
KDR	: <i>Kinase insert Domain Receptor</i>
LIMK-1	: LIM domain Kinase-1
LPS	: Lipopolysaccharide

MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MAPKK2K/MEKK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases Kinase Kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MKK/MEK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases Kinase</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal stem cells</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
P38	: <i>Tumor Protein P38</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>
PIGF	: <i>Placenta Growth Factor</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PKB/AKT	: <i>Protein Kinase B</i>
PLGA	: <i>Poly Lactic co-Glycolic Acid</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
Raf	: <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Ras	: <i>Rat Sarcoma adalah protein small guanosine triphosphatases</i>
RTK	: <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SAPK	: <i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
SH-MSC	: <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
SH2	: <i>Src Homology 2 domain</i>
SH3	: <i>Src Homology 3 domain</i>
SOS	: <i>Son Of Sevenless</i>
TAB-1	: <i>TAK1-Binding protein 1</i>

TAK-1	: <i>Transforming growth factor β-Activated Kinase 1</i>
TAO	: <i>Thousand and one Amino Acid</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Pathway P38 MAPK	13
Gambar 2. pathway VEGF	21
Gambar 3. MSC potensi dan difrensiasi	25
Gambar 4 potensi <i>secretome</i>	29
Gambar 5. pathway ulkus diabetikum.....	33
Gambar 6. Stage ulkus diabetikum	35
Gambar 7. Potensi <i>secretome</i> MSC pada luka ulkus	37
Gambar 8. Isolasi MSC dengan sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.	62
Gambar 9. Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31	63
Gambar 10. (A) MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan <i>alizarin red</i> dan <i>oil red</i> pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).	63
Gambar 11. Pembuatan <i>secretome</i> MSC hipoksia	64
Gambar 12. Grafik ekspresi VEGF pada seluruh kelompok penelitian	66
Gambar 13. Grafik ekspresi p38 pada semua kelompok penelitian	68
Gambar 14. Foto penutupan luka pada hari 0,7 dan 10	72
Gambar 15. Grafik kecepatan penyembuhan luka pada hari 0, 7 dan 10.....	73

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Originalitas Penelitian	5
Tabel 2. Hasil Analisis Kandungan <i>Secretome</i>	64
Tabel 3 Data Hasil Penelitian ekspresi p38 dan VEGF.....	65
Tabel 4. Uji <i>Post Hoc Mann whitney</i> Ekspresi VEGF dan P38 Pada Masing- Masing Kelompok.....	66



DAFTAR BAGAN

bagan 3.1 Kerangka Teori	41
Bagan 3.2 Kerangka Konsep.....	42
Bagan 4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearence</i>	84
Lampiran 2. Analisis Statistik	85
Lampiran 3. Validasi DM1	88
Lampiran 4. Foto Dokumentasi Peneliti	89



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ulkus diabetikum merupakan komplikasi *microvascular* yang paling banyak terjadi pada diabetes mellitus, dimana peningkatan sel inflamasi, penurunan proses *angiogenesis*, dan produksi *growth factor* menyebabkan hambatan pada penyembuhan luka.^{1,2} *Growth factor* yang paling berperan adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Hambatan produksi VEGF mengakibatkan disregulasi aktivasi P38 MAPK sebagai respon signal terhadap stres, sehingga mengaktifkan berbagai *pathway* yang berujung ekspresi gen molekul inflamasi, disregulasi *apoptosis* dan hambatan migrasi sel pada proses *angiogenesis*.³ Terapi ulkus diabetikum saat ini masih konvensional yaitu pemberian antibiotika, debridement, maupun surgical sehingga seringkali terjadi rekurensi meningkatkan resiko amputasi.⁴ Oleh karena itu, pendekatan terapi yang aman dan efektif diperlukan untuk pengobatan ulkus diabetikum, salah satunya menggunakan *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSC) yang mempunyai potensi anti inflamasi dan mampu mendeteksi keberadaan molekul sinyal cedera, bermigrasi ke area cedera (fenomena *homing*), *remodelling matriks extra selluler*, *angiogenesis*, *anti-apoptosis*, *imunosupresi*, yang semuanya mendorong penyembuhan luka.⁵

Insiden ulkus diabetikum setiap tahunnya adalah 2% diantara semua pasien dengan diabetes dan 5 – 7,5% diantara pasien diabetes dengan *neuropati perifer*. Meningkatnya prevalensi diabetes di dunia menyebabkan peningkatan kasus amputasi kaki karena komplikasinya.⁶ Studi epidemiologi melaporkan lebih dari satu juta amputasi dilakukan pada penyandang diabetes setiap tahunnya, yang berarti setiap tiga puluh detik terdapat kasus amputasi kaki karena diabetik di seluruh dunia. Penelitian di RSUD Dr. Kariadi Semarang tahun 2012-2014 tentang faktor risiko amputasi terhadap ulkus diabetik dari 94 subjek yang memenuhi kriteria, berdasarkan distribusi jenis kelamin, perempuan sebanyak 59,6% sedangkan laki-laki sebanyak 40,4%, jumlah amputasi mencapai 41,4% terdiri atas amputasi mayor (21,3%) dan amputasi minor (78,7%).^{6,7} Berbagai penelitian tersebut menunjukkan dibutuhkan terapi alternatif untuk pengobatan ulkus diabetikum.

Studi preklinis menunjukkan SH-MSC mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti sitokin anti inflamasi (IL-10), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *tumor necrosis factor alfa* (TNF- α), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor* (TGF β 1), *angiopoietin*, IL-1, IL-6, dan IFN γ .^{8,9} Hipoksia *preconditioned* meningkatkan efek sitoprotektif, mampu menjaga multipotensinya, meningkatkan proliferasi, meningkatkan kemampuan

secretome MSC bertahan dalam lingkungan yang kasar dalam menemukan daerah *injury* selama transplantasi.¹⁰

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah protein sinyal yang berperan dalam *vasculogenesis* dan *angiogenesis*. *Growth factor* VEGF pada sel endothelial melalui reseptor VEGFR-2 mengaktifkan P38 MAPK melalui reseptor MAPKK2K-AP memfosforilasi LIMK1, LIMK1 merangsang actin remodeling dengan fosforilasi dan inaktivasi cofilin (*an actin-depolimerasi factor*). P38 meregulasi *angiogenesis* dan motilitas sel melalui regulasi *matrix metalloproteinase* (MMPs), P38 α MAPK-ASH mengekspresikan MMPs 9, menyampaikan signal kemotaksis pada neutropil migrasi dan *angiogenesis*.^{11,12}

Berbagai penelitian menunjukkan penggunaan terapi *secretome* MSC dianggap sebagai terapi yang aman dan efektif dalam uji praklinis dan klinis. *Secretome* MSC mensintesis dan mengeluarkan sitokin yang mendorong perekrutan sel, *imunomodulasi*, *remodeling matriks ekstraseluler*, *angiogenesis*, dan regenerasi saraf, yang semuanya mendorong penyembuhan luka. Terdapat beberapa publikasi ilmiah terkait penggunaan MSC untuk pengobatan ulkus diabetikum, meskipun demikian, tidak didapatkan penelitian eksperimental terkait pengaruh pemberian *secretome* MSC hipoksia pada ulkus diabetikum. Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti akan melakukan penelitian dengan tujuan mengetahui pengaruh pemberian gel *secretome* MSC hipoksia terhadap ekspresi gen P38

dan VEGF (studi eksperimental in vivo pada tikus jantan galur wistar model luka diabetikum)

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian gel *secretome* MSC hipoksia terhadap ekspresi gen P38 dan VEGF pada tikus jantan galur wistar model luka diabetik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian gel *secretome* MSC hipoksia terhadap ekspresi gen P38 dan VEGF pada tikus jantan galur wistar model luka diabetik.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian gel *secretome* hipoksia MSC pada dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel dan dosis 200 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel terhadap ekspresi gen P38 dibanding kontrol.
2. Membuktikan pengaruh pemberian gel *secretome* hipoksia MSC pada dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel dan dosis 200 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel terhadap ekspresi gen VEGF dibanding kontrol.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pemberian gel *secretome* hipoksia MSC terhadap ekspresi gen P38 dan VEGF pada perbaikan luka diabetik.

1.4.2 Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan gel SH-MSC dalam memperbaiki luka diabetik.

1.5 Originalitas Penelitian

Tabel 1 Originalitas Penelitian

Penulis	Judul	Metode	Hasil
Se Ra Park, Jae Wan Kim, Hee-Sook Jun, Young Roh, Hwa-Yong Lee, In-Sun Hong ¹³	<i>Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing</i>	Eksperimental in vivo dan in vitro	Pemberian <i>secretome</i> MSC mengandung <i>growth factor</i> EGF, bFGF, dan HGF mempercepat penyembuhan luka dengan melalui proliferasi dan migrasi melalui signal PI3K/Akt atau FAK-ERK1/2
Jianxin Yan , J Liang, Yingxuan C, Mariya M. El akkawi, Xuan	<i>Efficacy of topical and systemic transplantation of mesenchymal stem cells in a rat</i>	Eksperimental in vivo	Pemberian BM-MSC secara topikal dan sistemik mengurangi ukuran luka, meningkatkan ekspresi VEGF, merangsang <i>angiogenesis</i> pada tempat luka

Liao, Xiaojia C, Chengzhi Li, Kecheng Li, Guanghui Xie, Hongwei Liu ¹⁴	<i>model of diabetic ischemic wounds</i>		melalui downregulasi PTEN dan aktivasi AKT signal, secara sistemik mempunyai potensi dalam perbaikan hiperglikemia dan kerusakan jaringan
H Ahmadi, A Amini, F F Fathabady ,A Mostafavinia , Fatemeh Z, Roohollah E- M, M N Ghalibaf, M Abrisham, F Rezaei, R Albright, S Ghoreishi, S Chien, M Bayat ¹⁵	<i>Transplantation of photobiomodulati on preconditioned diabetic stem cells accelerates ischemic wound healing in diabetic rats</i>	Eksperimental In vivo dan in vitro	Pemberian <i>preconditioned</i> AD-MSC bersama dengan <i>photobiomodulation</i> meningkatkan makrofag, fibroblast, <i>vascularisasi</i> dan menurunkan inflamasi mempercepat penyembuhan luka ulkus dibandingkan dengan hanya pemberian <i>secretome</i> saja
M Pomatto, C Gai , F Negro, M Cedrino, C Grange, E Ceccotti, G Togliatto, F Collino, M Tapparo, F Figliolini, T Lopatina, M F Brizzi, G Camussi ¹⁶	<i>Differential Therapeutic Effect of Extracellular Vesicles Derived by Bone Marrow and Adipose Mesenchymal Stem Cells on Wound Healing of Diabetic Ulcers and Correlation</i>	Eksperimental In vivo dan in vitro	Pemberian ADSC-EVs memiliki aktifitas <i>proangiogenic</i> lebih potent migrasi fibroblas dan keratinosit dengan meningkatkan ketebalan epitel, reepitelisasi, dan jumlah pembuluh darah, menurunkan ukuran luka dan <i>scars</i> dibandingkan dengan BMSC-EVs dalam mempercepat penyembuhan ulkus diabetikum, <i>angiogenesis</i> ADSC-EVs lebih

	<i>to Their Cargoes</i>		tinggi dan efektif dalam merangsang migrasi sel endotel, sedangkan BMSC-EVs lebih banyak berhubungan dengan sel adhesi (integrin dan cadherin), proses metabolik, <i>proliferasi</i> dan <i>viability</i> sel dalam penyembuhan ulkus diabetikum.
Bin Wang, Mengru Pang, Y Song, H Wang, Pan Qi, Shanshan Bai, X Lei , S Wei, Z Zong, Sien Lin, X Zhang, X Cen, Xia Wang, Yongkang Yang, Yuan Li, Yan Wang, H Xu, Lin H, Micky T, Biao C, Y Lee, D Qin, Gang Li ¹⁷	<i>Human fetal mesenchymal stem cells secretome promotes scarless diabetic wound healing through heat-shock protein family</i>	Eksperimental In vivo	Pemberian <i>secretome lyophilized</i> HfS-MSC dapat mempercepat penyembuhan luka dengan cara merangsang proliferasi sel fibroblas, keratinosit, merangsang vaskularisasi dan menghambat inflamasi, menekan pembentukan <i>scars</i> dan meningkatkan rasio kolagen III/I, pada ulkus diabetikum, <i>exosome</i> dan <i>heat shock protein family</i> bisa digunakan sebagai biomarker fungsional pro-angiogenik dari HFS

Penelitian terdahulu menggunakan *secretome* MSC yang berasal dari *human adipose tissue* (H-ADMSC) secara topikal. Hasil penelitian menunjukkan *secretome* yang mengandung *growth factor*, EGF, bFGF, dan HGF mempercepat penyembuhan luka dengan melalui proliferasi dan

migrasi melalui signal PI3K/Akt atau FAK-ERK1/2.¹³ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSC akan diterapi pada tikus model luka diabetik yang diinduksi streptozotosin dan dianalisis ekspresi gen P38 dan gen VEGF. Penelitian terdahulu menggunakan *secretome* yang berasal dari sumsum tulang *bone marrow-derived mesenchymal stem cell* (BM-MSCs) secara intradermal injeksi (lokal) pada luka ulkus dan intravena (sistemik), hasil penelitian menunjukkan pemberian *secretome* baik secara lokal dan sistemik secara signifikan menurunkan area luka dengan cara meningkatkan *epithelial edges*, kolagen, densitas dan peningkatan ekspresi dari *vascular endothelial growth factor* (VEGF), merangsang *angiogenesis* pada tempat luka melalui downregulasi PTEN dan aktivasi sinyal AKT, meskipun pemberian secara sistemik mempunyai potensi dalam perbaikan hiperglikemia dan kerusakan jaringan.¹⁴ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSC akan diterapi pada tikus model luka diabetikum yang diinduksi streptozotosin dan dianalisis ekspresi gen P38 dan gen VEGF. Penelitian terdahulu menggunakan *secretome* yang berasal dari *preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cell* (AD-MSCs) dan *photobiomodulation* secara injeksi intradermal dan topikal pada luka ulkus, hasil penelitian menunjukkan pemberian *secretome* bersama dengan *photobiomodulation* memperbaiki penyembuhan luka luka diabetikum dibandingkan dengan hanya pemberian *secretome* saja.¹⁵ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSC akan diterapi pada tikus model luka diabetik yang diinduksi streptozotosin dan dianalisis ekspresi

gen P38 dan gen VEGF. Penelitian terdahulu membandingkan *extra vesicle* (EVs) yang berasal dari *bone marrow mesenchymal stem cell* (BMSCs) dan *adipose mesenchymal stem cell* (ADMSCs) secara topikal pada luka diabetik, hasil menunjukkan baik ADSC-EVs dan BMSC-EVs mempunyai peranan yang sama pada kemampuan migrasi fibroblas dan keratinosit, dengan meningkatkan ketebalan epitel dan jumlah pembuluh darah, menurunkan ukuran luka dan *scars* dalam mempercepat penyembuhan ulkus diabetikum. Protein ADSC-EVs lebih tinggi dalam *pathways* yang berhubungan dengan *angiogenesis*, efektif dalam merangsang migrasi sel endotel, sedangkan protein BMSC-EVs lebih banyak berhubungan dengan sel adhesi (integrin dan cadherin) dan proses metabolik (*glycolysis* dan fruktosa galaktosa metabolisme), merangsang proliferasi dan *viability* sel dalam penyembuhan luka diabetik.¹⁶ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSC akan diterapkan pada tikus model luka diabetik yang diinduksi streptozotosin dan dianalisis ekspresi gen P38 dan gen VEGF. Penelitian terdahulu menggunakan *secretome* yang berasal dari *human fetal mesenchymal stem cell* (hf-MSC) dalam bentuk *poly lactic co-glycolic acid* (PLGA) secara topikal, hasil penelitian menunjukkan bahwa HFS-PLGA secara signifikan mempercepat penyembuhan luka dengan merangsang proliferasi sel fibroblas, keratinosit, merangsang vaskularisasi dan menghambat inflamasi, menekan pembentukan *scars* dan meningkatkan rasio kolagen III/I pada ulkus diabetikum, *exosome* dan *heat shock protein family* bisa digunakan sebagai biomarker fungsional *proangiogenik* fungsi

dari HFS.¹⁷ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana gel SH-MSC akan diterapi pada tikus model luka diabetik yang diinduksi streptozotosin dan dianalisis ekspresi gen P38 dan gen VEGF.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ekspresi Gen P38

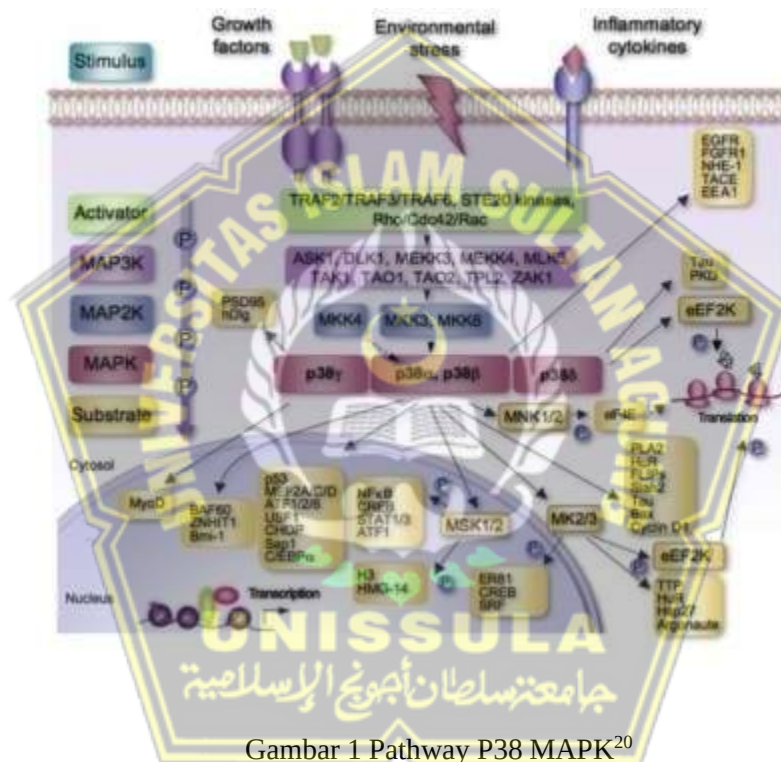
Respon sel terhadap perubahan fisik dan kimia dari lingkungan akan mengubah berbagai fungsi seluler termasuk *survival*, potensi proliferasi, kecepatan metabolisme, interaksi dengan sel lain, serta sejumlah proses seluler lainnya yang mempengaruhi homeostatis dan kesehatan suatu organisme. Perubahan lingkungan tersebut termasuk perubahan konsentrasi nutrisi, *growth factor*, sitokin, dan berbagai agen kerusakan sel lainnya. Sebagai respon dari perubahan tersebut sel akan mengaktifasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs). MAPKs adalah serine-threonin protein kinase yang mengatur berbagai aktifitas seluler termasuk *proliferasi*, *difrensiasi*, *apoptosis*, *survival*, *inflamasi* dan *innate immunity*. MAPK mempunyai 3 jalur dalam proses transduksi ERK, JNK dan P38. Proses aktivasi dan fosforilasi ini melalui *MAPK pathway signaling* pada protein kinase *family* lain yaitu MAPK kinase kinases (MKKKS), MAPK kinase (MKKs) dan MAPKs.¹⁸

Protein P38 adalah salah satu *subfamily mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), yang diaktivasi oleh sel mamalia oleh adanya proses patologis maupun fisiologis misalnya inflamasi, stres di lingkungan seluler sebagai repon dari sitokin inflamasi, apoptosis, siklus sel dan pertumbuhan sel. P38 dapat difosforilasi oleh berbagai rangsangan ekstraseluler melalui

jalur MAPK kinase kinase (MAGEK)-MAPK Kinase (MKK) yang akan mengaktifkan fosforilasi pada rantai asam amino Threonin-Glysin-tyrosin (TGY) pada subdomain VII dan VIII. Fosforilasi ini menyebabkan perubahan pada protein, ATP dan substrat untuk berikatan, tergantung dari rangsangan seluler dan tipe sel. MKK6 dan MKK3 memfosforilasi P38 beberapa menit setelah diaktivasi oleh sinyal, durasi sinyal diatur oleh enzim phosphatase, termasuk enzim phosphatase1/2 atau phosphatase MAPK. Berbagai enzim ini diaktifkan oleh P38 yang terfosforilasi menyebabkan umpan balik negatif pada siklus yang mengatur P38 MAPK. Interaksi berbagai jalur sinyal ini mempengaruhi kinetik sinyal P38 yang menentukan nasib sel. Fosforilasi yang panjang dihubungkan dengan apoptosis, sedangkan yang singkat berhubungan dengan faktor pertumbuhan yang menginduksi ketahanan sel.

Terdapat empat jenis P38 MAPKs pada mamalia: α , β , γ dan δ , semua bentuk P38 MAPK adalah *isoforms*, P38 α (MAPK14) memiliki karakteristik yang paling baik dan tereksresi dalam berbagai tipe sel, diidentifikasi sebagai 38 kDa polipeptida yang mengalami fosforilasi tirosin sebagai respon terhadap endotoksin dan hiperosmolaritas syok. Protein ini ditemukan sebagai homolog *Sacharomyces Cerevisiae* Hog1, regulator penting pada respon osmotik. P38 β (MAPK11) mempunyai 60% identik rantai asam amino, P38 γ *stress-activated protein kinase* (SAPK3), *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK6)/ MAPK12 dan P38 δ (SAPK4/MAPK13).¹⁹ (gambar 1). Keempat P38 MAPK dikode oleh gen

yang berbeda dan mempunyai pola ekspresi yang berbeda, P38 α diekspresikan diberbagai level signifikan pada kebanyakan tipe sel, dimana yang lain diekspresikan pada jaringan yang spesifik, P38 β di otak, P38 γ di otot rangka, P38 δ di kelenjar endokrin. P38 α dan P38 β sensitive terhadap inhibitor sedangkan P38 δ dan P38 γ tidak sensitif terhadap inhibitor.²⁰



Gambar 1 Pathway P38 MAPK²⁰

Terdapat beberapa cara aktivasi P38 MAPK yaitu *canonical pathway* membutuhkan fosforilasi pada lingkaran fleksibel yang disebut fosforilasi *lip* atau lingkaran aktivasi. Melalui *dual* fosforilasi dan aktivasi rantai loop thr-Gly-Tyr atau melalui tiga *dual-spesifisity* MKKs/MAKKs (MAPK kinase) tergantung pada respon stimulus yang sesuai. MKK6 bisa memfosforilasi keempat P38 MAPK *family*, dimana MKK3 mengaktivasi

ketiga P38 MAPK family kecuali P38 β . MAKs teraktifasi oleh fosforilasi oleh dua serine/threonine aktifasi *loop*. MAGEKs juga berperan dalam menstimulus aktifasi P38 MAPK, termasuk *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), *dual-leucine-zipper-beraing-kinase* (DLK1), *transforming growth factor β -activated kinase 1* (TAK1), *thousand and one amino acid* (TAO) 1 dan 2, *tumour progression loci 2* (TPL2), *mixed-lineage kinase 3* (MLK3), MAPK/ERK kinase kinase (MEKK3 dan MEKK4), *leucine zipper and sterile- α motif kinase 1* (ZAK1). Beberapa MAGEKs yang menstimulus P38 MAPK juga mengaktifasi JNK *pathway*. Pada mamalia sel, ASK1 mempunyai peranan penting dalam aktivasi P38 α oleh *stress oksidatif*.²⁰⁻²²

Aktifasi P38 MAPK melalui jalur noncanonical, pada P38 α dan P38 β , melalui reseptor antigen spesifik (TCR-T-cell receptor) yang distimulus oleh T limfosit. Fosforilasi P38 α pada tirosin oleh TCR-proximal tyrosine kinases ZAP70 (ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa) dan P26lck, membawa autofosforilasi P38 α pada loop aktifasi sehingga meningkatkan aktivasi kinase melalui substrat. Alternatif fosforilasi lainnya yaitu melalui TAK1-binding protein 1 (TAB1), mekanisme ini mengatur regulasi myocardial iskemik dan beberapa fungsi sel myeloid.^{20,23}

Scaffold P38 binding protein merupakan serangkaian interaksi melalui sambungan berpasangan yang membentuk kaskade protein kinase, misalnya protein *osmosensing scaffold* untuk MKK3 (OSM) dimana terbentuk dari kompleks rac, MEKK3 dan MKK mengaktifkan P38 α

sebagai respon dari stres osmotik. Contoh lain adalah TAB1 membentuk kompleks dengan TAK1 dan TAB2 atau TAB3 yang dapat memediasi negatif *feedback loop* yang dilanjutkan dengan fosforilasi oleh P38α dari TAB1 sebagai respon terhadap inflamasi. Inaktivasi *pathway* pada P38 MAPK melalui terminasi aktifitas katalitik kinase termasuk aktifitas beberapa fosfatase yang menargetkan aktivasi *loop* threonin dan tirosin residu termasuk *generic fosfatase* yang mengakibatkan defosforilasi serine/threonine residu, aktivitas *fosfatase* tersebut akan membentuk *monofosfatase* bentuk MAPK.^{24,25}

Peranan P38 MAPK dalam diferensiasi seluler yaitu mengubah mioblas melalui diferensiasi myotube selama perkembangan miogenik melalui aktivasi MKK, mengontrol perkembangan diferensiasi pada tingkat: aktifitas faktor transkripsi, remodeling kromatin, pergantian dari mRNAs yang mengkode regulator tertentu pada diferensiasi otot.²⁶ P38 MAPK juga berperan pada diferensiasi keratinosit melalui jalur ASH, SSH dan C/EBP.

Peran P38 MAPK pada migrasi sel sebagai sinyal transduksi dalam banyak sistem, misalnya migrasi neutropil, migrasi vascular otot polos, terhadap respon dari CXCL12/SDF-1α, EGF, HGF, PDGF dan TGFβ, IL-1β dan sel epitel. Pada sel endothelial, *Growth factor* VEGF melalui reseptor VEGFR-2, mengaktifkan P38 MAPK melalui MAPKK2K-AP memfosforilasi LIMK1, LIMK1 merangsang actin remodeling dengan fosforilasi dan inaktivasi cofilin (*an actin-depolimerasi factor*).

P38 meregulasi *angiogenesis* dan motilitas sel melalui regulasi *matrix metalloproteinase* (MMPs), P38 α MAPK-ASH mengekspresikan MMPs 9, P38 α menyampaikan signal kemotaksis pada neutrofil migrasi dan *angiogenesis*.^{27,28} P38 MAPK berperan dalam inflamasi dengan meregulasi biosintesis protein proinflamasi sitokin IL1 dan TNF α , P38 meregulasi produksi IL8 dalam respon terhadap IL1 dan syok osmotik, meregulasi IL6 dalam respon terhadap TNF α .²⁹

2.2 Ekspresi Gen VEGF

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah protein sinyal yang terdapat alami di dalam tubuh, berperan dalam *vasculogenesis* dan *angiogenesis*, agen kemotaktik, mitogen sel endotel. VEGF sebagai faktor poten *angiogenesis*, dapat menginduksi perkembangan dan progresi pada kondisi patologis tertentu pada post natal periode misalnya pertumbuhan tumor dan metastase, *degenerasi macular*, retinopati diabetik, proses inflamasi, proses iskemik, preeklampsia. Penelitian terbaru difokuskan pada pembentukan dan perkembangan pembuluh limfatik (*lymphangiogenesis*). VEGF gen pada manusia berlokasi pada 6K1.3 kromosom, sebagai bagian dari gen *family VEGF/platelet-derived growth factor* (PDGF), juga disebut *cystine-knot superfamily* dari *growth factor*. VEGF merupakan *heterodimeric glycoprotein* dengan ukuran 40-kDa. Memiliki *cystine-knot* motif yang dicirikan dengan adanya disposisi jembatan bisulfida tertentu pada struktur proteinnya. PDGF, *nerve growth factor* (NGF) dan

transforming growth factor-beta (TGF- β) termasuk juga *family* yang memiliki *cystine-knot* motif yang sama dengan VEGF.^{30,31}

VEGF terdiri dari tujuh anggota *family*: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (viral VEGF, pada *parapoxvirus* 1), VEGF-F (bisa ular VEGF) dan *placenta growth factor* (PlGF), saat ini terdapat anggota *family* baru yang ditambahkan, *endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor* (EG-VEGF). VEGF-A juga disebut VEGF, yang paling penting dan poten dalam menstimulasi *angiogenesis*.³² VEGF-A terdiri dari delapan exon yang dipisahkan oleh tujuh intron dan dengan alternatif splicing VEGF *messenger ribonucleic acid* (mRNA) membentuk panjang isoform yang berbeda-beda: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, mempunyai afinitas terhadap reseptor VEGFR-1 sepuluh kali lebih tinggi dibandingkan VEGFR-2, VEGF-A berperan dalam *vasculogenesis* dan *neoangiogenesis*, menyebabkan proliferasi sel, inhibisi apoptosis, peningkatan permeabilitas kapiler, vasodilatasi, rekrutmen sel sel inflamasi ke daerah luka/peradangan. VEGF tidak hanya disekresikan oleh sel endotel tetapi juga oleh sel yang lain, sebagai respon terhadap hilangnya oksigen: sel tumor, makrofag, platelet, keratinosit, sel mesangial, *activated* T sel, leukosit, sel dendritik, sel epitel pigmen retina, astrosit, osteoblast, bronkial dan sel epitel alveolar.^{32,33}

VEGF-B ditemukan pada tahun 1995, diekspresikan pada awal fase embrionik, saat dewasa ditemukan diberbagai jaringan terutama

miokardium, otot rangka dan pankreas. Alternatif gen *splicing* memberikan 2 jenis isoform yaitu: VEGF-B₁₆₇ dan VEGF-B₁₈₆, mempunyai afinitas terhadap reseptor VEGFR-1. VEGF-B mempunyai peranan dalam perkembangan sistem kardiovaskular, dan pembentukan miokardium pada fase embrionik, tidak terlalu berperan pada *vasculogenesis*.³⁴ VEGF-C banyak diekspresikan pada jaringan embrionik, dimana dimulainya perkembangan pembuluh limfe, saat dewasa diekspresikan di jantung, ovarium, plasenta, intestinal, tiroid yang mempunyai afinitas yang tinggi terhadap reseptor VEGFR-3, tetapi afinitas lemah dengan reseptor VEGFR-2 sehingga tidak terlalu berperan dalam *angiogenesis*. VEGF-D mempunyai kesamaan dengan VEGF-C, mempunyai afinitas terhadap VEGFR-3 dan NP-2, berperan dalam *limphangiogenesis* tetapi tidak terlalu berperan dalam *angiogenesis*. VEGF-E disebut juga dengan viral VEGF karena mengandung protein virus dari strain yang berbeda dari Orf virus (infeksi *parapoxvirus* pada kambing dan domba), mempunyai afinitas yang spesifik terhadap reseptor VEGFR-2 tetapi tidak pada VEGFR-1 dan VEGFR-3, berperan pada peningkatan permeabilitas pembuluh darah secara signifikan sama dengan VEGF-A.^{35,36}

Placenta growth factor (PlGF) adalah *growth factor family* yang pertama diidentifikasi pada jaringan plasenta manusia, berperan pada pertumbuhan dan diferensiasi trofoblas. PlGF ditemukan di mukosa uterus, glandula uterus luminal epitelium. Afinitas VEGF dengan reseptor VEGFR-1 secara tidak langsung mengaktifasi VEGFR-2 berikatan dengan VEGF-A

sehingga meningkatkan permeabilitas kapiler, migrasi dan proliferasi sel.^{35,37}

EG-VEGF disebut juga *prokinectin* (PK1), berlokasi di kelenjar endokrin yang memproduksi hormon steroid dan jaringan plasenta, dimana terlibat dalam proses fisiologis dan patologis *angiogenesis*. VEGF berikatan dengan tirosin-kinase reseptor dimana memiliki tiga domain: ekstraseluler domain untuk ikatan VEGF, trans membran domain dan intraseluler domain dengan aktifitas tirosin kinase. VEGF berikatan dengan reseptor ekstraseluler domain, merangsang aktifitas enzim tirosin kinase pada intraseluler domain, dimana fosforilasi residu tirosin kinase, mengaktifasi beberapa intraseluler *signaling pathway*. Terdapat tiga tipe reseptor VEGF: VEGFR-1 (flt-1/fms- tyrosine kinase-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1/fetal liver kinase-1), VEGFR-3 (Flt-4).^{35,38}

Anggota *family* VEGF juga bisa berinteraksi dengan protein yang lain yaitu: neuropilin, integrin, cadherins, *heparan sulphat proteoglycans*. Neuropilin-1 (NP-1) dan neuropilin-2 (NP-2) co-reseptor yang bukan tirosin kinase reseptor dan selektif berikatan dengan sub tipe VEGF tertentu misalnya VEGF-A₁₆₅. Neuropilin merangsang fungsi VEGFR-2 dan VEGFR-3, menuntun migrasi dan *angiogenesis* sel endotel. VEGFR-1 VEGFR-1 (flt-1/fms- tyrosine kinase-1) anggota *family* tirosin-kinase (RTKs) dengan berat molekul 180 kDa mempunyai penerimaan yang tinggi terhadap VEGF-A, VEGF-B, VEGF-F, berperan penting pada difrensiasi dan migrasi sel sel endotel, monosit, makrofag, *hematopoietic stem cell*,

menjadi penyebab utama *angiogenesis* patologis pada masa dewasa (tumor, inflamasi, iskemik, preeklampsia), berperan sebagai kemotaksis dan migrasi sel melalui aktivasi *signaling pathway* yang berbeda: *phosphoinositide-3-kinase* (PI3K)/protein kinase B (PKB/Akt), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinase* (ERK) *pathway* (P38-MAPK/ERK1/2). Pada kondisi patologis *angiogenesis* aktivasi tirosin kinase domain VEGFR-1 akan merangsang migrasi sel inflamasi dan melepaskan sitokin inflamasi seperti α (TNF- α), *interleukin-1beta* (IL-1 β), IL-6, IL-8, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *makrophage inflammatory protein-1beta* (MIP-1 β).^{39,40}

VEGFR-2 (KDR/Flk-1/*fetal liver kinase-1*), *kinase insert domain receptor* (KDR) pada manusia dan *fetal liver kinase-1* pada tikus. Mempunyai berat molekul 200-230 kDa, afinitas yang tinggi terhadap VEGF-A dan VEGF-E. VEGFR-2 diekspresikan khususnya di sel endotel pembuluh darah dan limfatik. Ikatan ekstraseluler domain VEGFR-2 dengan VEGF akan menyebabkan autofosforilasi residu tirosin dan aktivasi *signaling pathway* tertentu *phospholipase-C γ* (PLC γ)/protein kinase C (PKC) dan Ras/ Raf/ERK/MAPK *pathways*, *signaling pathways* ini terlibat dalam proliferasi sel endotel. Begitu juga oleh aktivasi PI3K/Akt *pathway*, VEGFR-2 berperan dalam survival sel endotel dan anti apoptosis, juga mengaktifkan integrin tertentu, dimana merusak sel kohesi dan memulai sel migrasi. VEGFR-3 (Flt-4) mempunyai berat molekul 195 kDa, berafinitas dengan VEGF-C, mempunyai peranan *morphogenesis lymphatic vessel*

selama perkembangan embrionik, juga berperan dalam pembentukan *lymphatic vessel* yang baru pada masa dewasa.⁴¹⁻⁴³



Gambar 2. Pathway VEGF³⁰

Regulasi ekspresi VEGF melalui hipoksia, sitokin/*growth factor* dan difrensiasi. Hipoksia memainkan peranan penting dalam ekspresi gen VEGF baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, tetapi efek dari kronik hipoksia pada *signaling* VEGF dan *angiogenesis* pada sel endothelial manusia belum sepenuhnya dimengerti. *Hypoxia inducible factor-1*(HIF-1) merupakan mediator kunci untuk respon hipoksia bersama dengan gen supresor tumor *von hippel lindau* (vHL). Dibawah kondisi normoksia, HIF-1 α didegradasi secara cepat oleh jalur ubiquitin-proteosom, suatu proses yang dikontrol oleh produk gen supresor tumor vHL. HIF-1 α akan bersatu dengan HIF-1 β , saat tidak adanya vHL atau terjadi mutasi, sehingga kompleks ini akan

bertranslokasi pada nukleus dan terikat pada promotor VEGF terjadi peningkatan transkripsi VEGF.⁴⁴

Regulasi VEGF juga dipengaruhi oleh sitokin atau *growth factor* yang meningkatkan ekspresi VEGF di mRNA, paparan dari keratinosit, *keratinosit growth factor* (KGF), *epidermal growth factor* (EGF), TGF- β , TGF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, PGE2, IGF-1 yang akan melepaskan VEGF mRNA. TNF- α adalah proinflamasi yang merangsang ekspresi VEGF mRNA.⁴⁵ Difrensiasi sel berperan penting pada ekspresi gen VEGF dimana VEGF mRNA meningkat selama difrensiasi miogenik, sebaliknya ekspresi gen VEGF juga menurun atau ditekan selama proses difrensiasi sel pheochromocytoma menjadi *non malignant neuron-like cell*.⁴⁶

2.3 Sel Punca Mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cell*)

Alex Ander Maksimov (1874-1928), seorang ahli histologi asal Rusia, pada kongres hematologi tahun 1908 di Berlin memperkenalkan Istilah *stem cell* atau sel punca. Pada tahun 1978 teori dari Alex Ander Maksimov mengatakan bahwa didalam tubuh ada sel induk yang membentuk sel sel darah, terbukti dengan ditemukannya sel punca di sumsum tulang belakang manusia yang memiliki kemampuan membentuk seluruh jenis sel darah di dalam tubuh manusia. Pada tahun 1981, oleh Gail, university of California, San Fransisco dan Martin Evans, University of Cambridge, melakukan isolasi sel punca yang berasal dari embrio pertama

kalinya. Penelitian di University of Wisconsin dan John Hopkins University pada tanggal 5 november 1998, melaporkan sel punca yang diisolasi dari embrio manusia memiliki potensi untuk tumbuh menjadi berbagai tipe sel serta dapat dipergunakan untuk menggantikan sel sel tubuh yang sudah rusak. Pada tahun 2007, Martin Evans, Mario Capecchi, dan Oliver Smithies memperoleh hadiah Nobel Kedokteran untuk riset mereka yang telah mengubah gen-gen tertentu pada mencit menggunakan sel punca embrionik hewan ini. Penelitian sel punca terus dikembangkan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit, khususnya penyakit degeneratif, saat ini banyak negara di dunia telah menggunakan terapi sel punca sebagai pilihan terapi bagi penyakit kelainan hematologi maupun penyakit degeneratif.⁴⁷

Stem cell mempunyai arti kata yaitu stem berarti batang; *cell* berarti sel, sel punca adalah sel awal mula sebagai penyusun dari pertumbuhan sel lain dari keseluruhan tubuh suatu organisme, termasuk manusia. Seperti batang pada pohon yang menjadi tumpuan pertumbuhan ranting dan daunnya, sel punca juga menjadi awal pembentukan dari berbagai jenis sel penyusun tubuh. Sel punca yang berasal sel dari embrio, fetus, atau sel dewasa yang mempunyai kemampuan untuk memperbanyak diri sendiri dalam jangka waktu yang lama, belum mempunyai fungsi yang spesifik, serta mampu berdiferensiasi menjadi tipe sel tertentu yang membangun sistem jaringan dan organ tubuh.

Sel punca mempunyai karakteristik:

1. Mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi. Sel punca mampu berkembang menjadi sel lainnya, menjadi berbagai jenis sel yang matang, misalnya sel otot rangka, sel saraf, sel otot jantung, sel pankreas, dan berbagai sel lainnya. International Society for Cellular Therapy (ISCT) menetapkan minimal kriteria yang dibutuhkan untuk identifikasi MSC yaitu: kemampuan melekat ketika dirawat dalam kondisi kultur, harus mengekspresikan penanda permukaan CD105, CD73, dan CD90, tidak mengekspresikan CD45, CD14 atau CD11b, CD34, CD19 atau CD79- α , *human leukocyte antigen* (HLA)-DR, harus memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi osteoblast, adiposit dan kondroblast secara invitro.⁴⁸
2. Mempunyai kemampuan untuk meregenerasi atau memperbaharui dirinya sendiri (*self regenerate/self-renewel*), dapat membuat salinan sel yang sama persis dengan dirinya melalui proses pembelahan sel.

Berdasarkan pada kemampuannya untuk berdiferensiasi sel punca dapat dibagi menjadi:

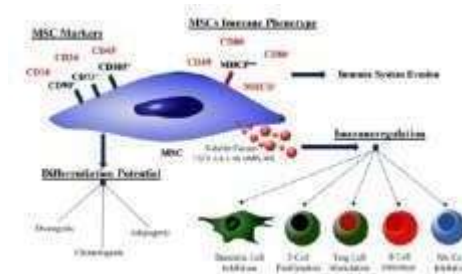
1. Totipotent.

Sel punca mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi semua jenis sel. Merupakan sel embrionik awal yang masih mempunyai kemampuan membentuk berbagai jenis sel. Sel punca jenis ini mempunyai kemampuan membentuk satu individu yang utuh, contohnya adalah zigot dan morula.

2. Pluripotent.

Sel punca yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Misalnya, *hemopoetic stem cell* pada sumsum tulang mampu untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel darah seperti eritrosit, trombosit, dan leukosit. Contoh lainnya *neural stem cell* mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi sel saraf dan sel glia.

Sel punca yang mampu menghasilkan satu jenis sel, yang mempunyai sifat dapat memperbaharui atau meregenerasi diri (*self-regenerate/self-renew*).



Gambar 3. MSC potensi dan difrensiasi⁴⁹

Pembagian sel punca berdasarkan sumbernya, dibagi menjadi dua yaitu *embryonic stem cell* dan *adult stem cell* yang mempunyai karakter dan fungsi yang berbeda.

- *Embryonic stem cell.*

Sel punca embrionik adalah sel punca yang berasal dari jaringan embrionik tahapan embriogenesis. Sel punca tipe ini memiliki potensi pembaharuan diri dan diferensiasi terkuat dibandingkan sel punca tipe lain. Sel embrionik ini didapatkan dari *inner cell mass* pada fase blastomer/blastokis (paska fase morula hingga 6 minggu), merupakan turunan epiblas yang dapat membentuk embrio dan sel penyusun plasenta (ektoderm dan trophoctoderm). Peranan sel embrionik secara spesifik terlihat jelas pada pertumbuhan dan perkembangan embrio. Sel punca yang berasal dari *inner cell mass* merupakan sel punca embrionik pluripoten, yang menghasilkan 3 lapisan sel germinal, yaitu lapisan ektoderm, mesoderm dan ektoderm. Ketiga lapisan sel tersebut berdiferensiasi menjadi sel spesifik (sel matur). Sumber embrionik sel punca biasanya didapatkan dari sisa embrio yang pada IVF (in vitro fertilization). Penelitian dengan menggunakan embrionik sel punca masih terbatas karena isu etik, berbagai teknik telah dikembangkan teknik pengambilan *embryonic stem cell* yang tidak membahayakan embrio tersebut sehingga dapat mengurangi kontroversi etik terhadap *embryonic stem cell*.⁵⁰

- *Adult stem cell.*

Sel punca dewasa adalah sel punca yang bersifat multipoten, yaitu mampu menghasilkan berbagai turunan sel terdiferensiasi, sekalipun terbatas pada salah satu lapisan asal germinal dimana sel punca tersebut berasal. Sel punca ini berasal dari jaringan dewasa paska tahapan janin terbentuk (*embrio-organogenesis*) selesai. Tipe sel turunan yang dihasilkan akan tergantung pada asal jaringan sel punca tersebut, contohnya adalah :

- *Mesenchymal stem cell (MSC)*

Populasi sel yang berbeda mempunyai potensi diffrensiasi yang bervariasi pada sel somatik turunannya. Bisa menjadi osteosit, chondrosit, tenosit dan miosit, bisa diisolasi dari sumsum tulang dan menjadi *hematopoietic stem sel* yang digunakan pada *tissue engineering* dan *regenerative medicine*.

- *Haematopoietic stem cell*

Mempunyai potensi/ kemampuan *self-renewing* dan kapasitas untuk berdiffrensiasi menjadi semua lini turunan sel hematopoetik.

- *Neural Multipotent dan self-replikasi sel.*

Pembentukan kedalam *microenvironment* molekuler pada otak mamalia dewasa, mempunyai peranan penting pada terapi seluler otak.

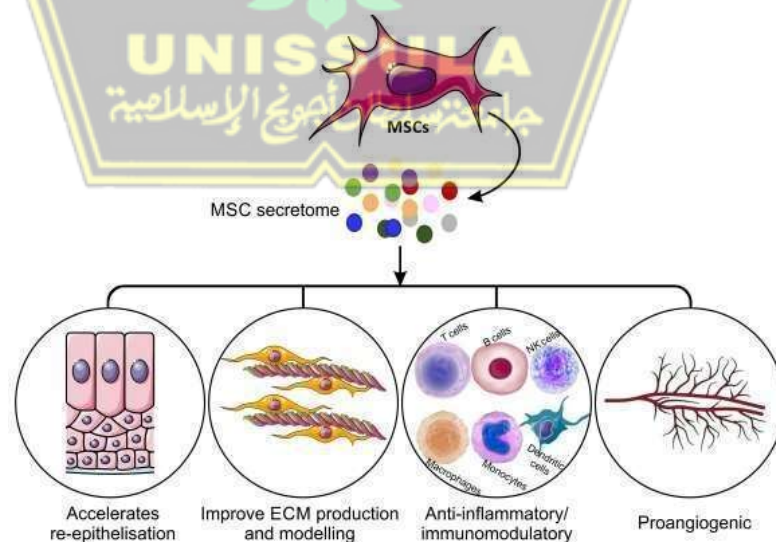
- *Gastrointestinal stem cell* dari GIT ini berada di “*niche*” *intestinal crypta* dan kelenjar gaster
- *Epidermal stem cell* terdapat pada epidermis mamalia, peremajaan jaringan secara cepat, mengandung keratinosit, berada di basal layer. Pada kulit normal sebagai homeostasis dan seluler regenerasi
- *Hepatic stem cell* mempunyai kapasitas regenerasi yang kuat. Menggunakan mode yang berbeda tergantung pada jenis dan lamanya *injury*.
- *Pancreatic* sel yang memproduksi insulin, lokasi di *ductus pancreaticus*. Produksi insulin oleh sel beta pancreas setiap 40-50 hari dengan proses apoptosis dan propagasi dan diffrensiasi sel beta pancreas yang baru dari *progenitor* sel epitel.⁵¹

2.4 Secretome MSC

Mesenchymal stem cell (MSCs) didefinisikan sebagai *fibroblast-like-non-hematopoietic* sel. MSC memiliki harapan yang tinggi dalam pengobatan regeneratif, bukan hanya karena karakteristiknya yang bersifat multipotent, efek immunomodulator, tetapi juga memiliki sumber yang luas, biostabilitas ketika dikultur dan dikembangkan secara invitro. Terapi berbasis sel telah dipelajari selama puluhan tahun, termasuk dalam pergantian kulit (menghidupkan fibroblast dan keratinosit), menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam mempercepat penutupan luka, memperbaiki *reepitelisasi*, dan *vaskularisasi* pada luka, akan tetapi terapi tersebut mahal,

potensi *tumoregenik*, infeksi dan risiko penolakan serta harus disimpan dalam kondisi spesifik sehingga sulit digunakan dalam komunitas.⁵²

MSC menunjukkan kemampuan melepaskan molekul secara *paracrine* dan memiliki efek antiinflamasi, MSC mensekresikan bioaktif molekul *exosome*, protein, asam nukleat, sitokin, *growth factor*, *membrane vesicle*, yang disebut dengan *secretome*. *Secretome* MSC dianggap alternatif yang unggul, kaya akan sitokin dan *growth factor*, dapat mengirimkan sejumlah protein pada luka. *Secretome* MSC memiliki kemampuan memodulasi respon imun, merangsang *angiogenesis*, melindungi sel dari apoptosis, menarik sel endogen dari sistem sirkulasi ke luka ulkus diabetik, sebagai hasilnya membangkitkan sel residen dan merangsang jaringan endogen untuk sembuh.⁵³



Gambar 4 potensi *secretome*⁵⁴

2.5 Luka Diabetik

Salah satu komplikasi *microvascular* diabetes melitus yang sangat mempengaruhi kualitas hidup penderita adalah ulkus diabetikum. Komplikasi ini dapat dicegah, karena faktor pemicu terseringnya adalah trauma ringan sehingga terjadi luka diabetikum yang selanjutnya dapat berkembang menjadi ulkus diabetikum. Identifikasi dini cedera kulit ini juga dapat mengarah pada hasil yang lebih baik sambil mengurangi risiko perkembangan luka menjadi ulkus diabetikum. Pasien dengan diabetes melitus (tipe 1 atau 2) memiliki risiko total komplikasi ulkus kaki diabetik seumur hidup sebesar 25%.⁵⁵

Insiden ulkus diabetikum adalah 2% setiap tahunnya diantara semua pasien dengan diabetes dan sekitar 5%–7,5% pada pasien diabetes dengan neuropati perifer. Penelitian terkini, didapatkan kelompok umur terbanyak pada diabetes melitus dengan komplikasi ulkus diabetikum adalah umur lansia akhir 56-65 tahun sebanyak 55 pasien dengan 46.2% dari rekam medik RSUD Dr.H.Abdul Moeloek Provinsi Lampung tahun 2018, dimana pasien yang memiliki riwayat keluarga penyakit diabetes peptikum dengan ulkus diabetikum terdapat 101 pasien dengan presentasi 89.9%, pasien diabetes melitus dengan komplikasi ulkus diabetikum lama rawat inap kategori 0-5 hari sebanyak 94 pasien dengan presentasi 79.0%. Penyebab tersering terjadinya amputasi pada penderita diabetes adalah gangguan

neuroiskemik yang diperberat oleh infeksi. Dalam 1 tahun sebanyak 5 – 8% penderita diabetes akan menjalani amputasi mayor.^{56,57}.

Ulkus kaki diabetik merupakan penyakit yang disebabkan oleh multi faktor, lebih dari 60% insiden ulkus diabetikum disebabkan oleh neuropati. Hiperglikemia meningkatkan produksi dari beberapa enzim, seperti *aldose reductase* dan *sorbitol dehydrogenase*, yang dapat mengubah glukosa menjadi sorbitol dan fruktosa. Ketika terjadi akumulasi produk gula, sintesis myoinositol pada sel saraf menurun sehingga konduksi saraf terganggu. Neuropati, baik neuropati sensorik, motorik ataupun autonomik akan mengakibatkan perubahan kulit dan otot, yang kemudian mengakibatkan perubahan distribusi tekanan pada telapak kaki sehingga mempermudah terjadinya ulkus. Hiperglikemia menyebabkan disfungsi sel endotel dan abnormalitas sel otot polos pada arteri perifer. Disfungsi endotel menyebabkan perubahan proliferasi sel endotel, penebalan membran basalis, penurunan sintesis nitrit oksida, penurunan aliran darah dan meningkatkan viskositas darah. Penurunan nitrit oksida sebagai vasodilator dapat menyebabkan aterosklerosis dan vasokonstriksi yang berakhir pada iskemia. Berdasarkan 7th Practical Diabetes International Foot Conference, terdapat 6 tingkatan ulkus diabetikum :

Tahap 1: kaki normal tanpa faktor risiko;

Tahap 2: kaki berisiko tinggi

Tahap 3: ulserasi kaki

Tahap 4: kaki selulit

Tahap 5: kaki nekrotik

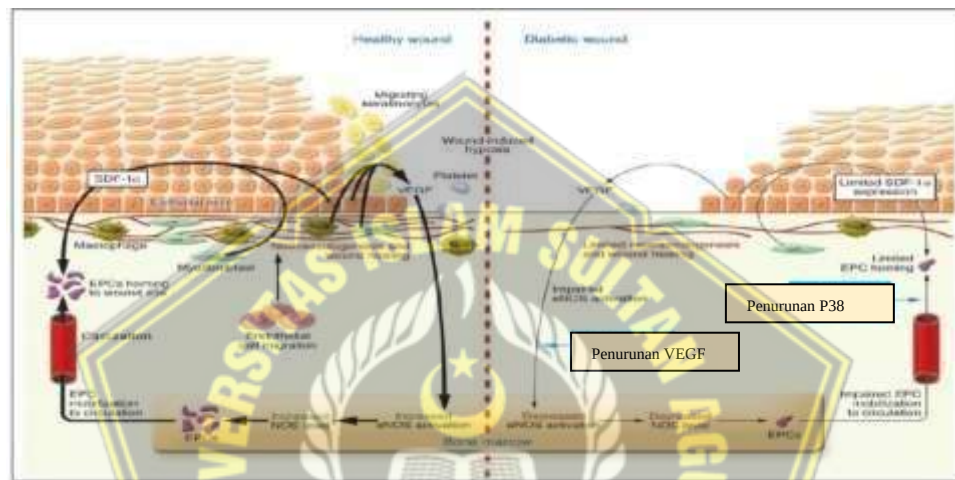
Tahap 6: kaki yang tidak bisa diselamatkan (harus diamputasi)^{58,59}

Ada tiga jenis ulkus diabetikum yaitu neuropatik, neuroiskemik dan iskemik. Neuropati sensorik menyebabkan sebagian besar tukak akibat trauma ringan yang tidak dirasakan oleh pasien sehingga tidak diobati dikarenakan tidak adanya gejala nyeri. Infark miokard adalah salah satu kejadian paling signifikan terkait penyakit arteri perifer yang meningkatkan risiko iskemik. Namun, iskemik yang menyebabkan ulkus diabetik menambah morbiditas yang parah dan biaya perawatan kesehatan karena dapat menjadi komplikasi kronis yang sulit diobati karena suplai darah tidak mencukupi.

Faktor risiko

- Neuropati motorik perifer: anatomi dan biomekanik kaki yang tidak normal seperti kuku jari kaki yang melengkung, lengkungan telapak kaki yang tinggi serta subliksasi sendi metatarsophalangeal menyebabkan tekanan berlebih pada kaki, pembentukan kalus dan luka.
- Neuropati sensorik perifer: kurangnya sensasi protektif, menyebabkan cedera ringan tanpa pengawasan yang disebabkan oleh tekanan berlebih atau cedera mekanis atau termal.

- Neuropati otonom perifer: kurangnya sekresi keringat menyebabkan kulit kering dan pecah pecah
- Deformitas neuro-osteoarthropathy (yaitu, penyakit Charcot) atau mobilitas sendi yang terbatas



Gambar 5. pathway ulkus diabetikum³⁵

Hiperglikemia dan *Advanced Glycation of Ends Product* (AGEs) menyebabkan *stress oksidatif* dan prolong hipoksia yang mengakibatkan menurunnya perfusi jaringan dan inadkuat *angiogenesis*, sehingga meningkatkan respon akut inflamasi dan produksi ROS, disregulasi imun sel T, kerusakan leukosit kemotaksis, fagositosis, kemampuan membunuh bakteri patogen, disfungsi fibroblas dan sel epidermal. Proses lain yang berpengaruh adalah produksi *growth factor*, *angiogenesis*, aktifitas fagosit, deposisi kolagen, fungsi barrier epidermal, granulasi jaringan, migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas, *remodelling* oleh MMPs

dan *extraceluller matriks* (ECM).⁶⁰ Pada pasien diabetes, penyembuhan luka memiliki kecenderungan untuk lebih lama sembuh, hal ini disebabkan :

- Masa inflamasi yang memanjang.

Zat inflamasi dalam luka kronik lebih tinggi 100 kali dibandingkan pada luka akut. Hal ini dikarenakan adanya invasi bakteri dan jaringan nekrosis pada luka.

- Degradasi yang berlebihan pada jaringan kolagen.

Kadar enzim yang mendegradasi kolagen lebih tinggi pada luka kronis dibandingkan pada luka akut.

- Penurunan berbagai faktor pertumbuhan seperti VEGF

VEGF berperan pada penyembuhan luka melalui mekanisme deposisi kolagen, *angiogenesis* dan epitelisasi. Pada kondisi Hiperglikemia dan AGEs menyebabkan kerusakan *signaling pathway* ikatan VEGF dengan reseptornya, ekspresi VEGF diatur melalui hipoksia, sitokin, difrensiasi dan transformasi.

- Gangguan penutupan luka akibat perubahan struktural keratinosit.

- Adanya peningkatan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pembuluh darah.

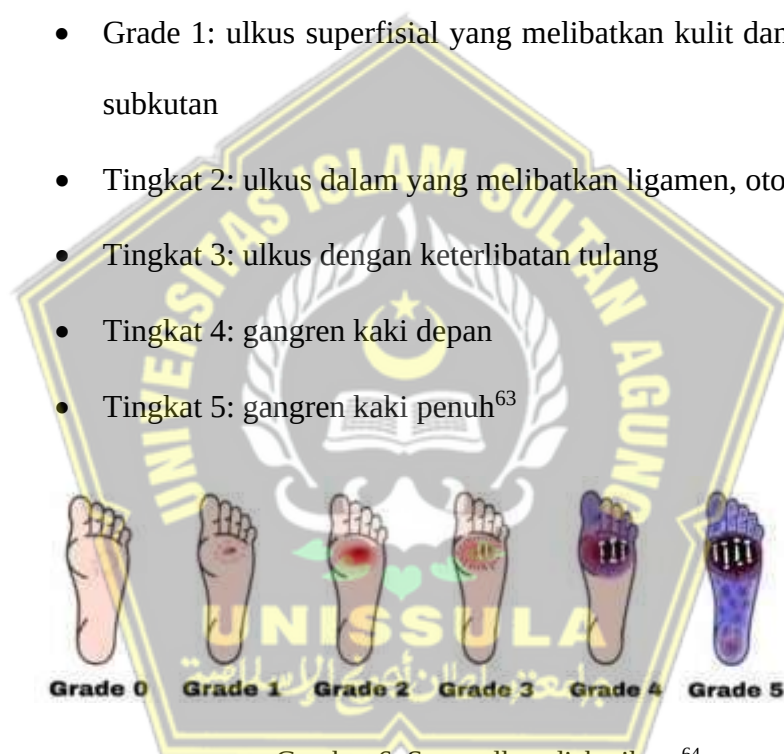
- Perlekatan platelet

Peningkatan faktor Von Wille dan ketidaknormalan *angiotensin converting enzyme (ACE)*, sehingga mengakibatkan vasokonstriksi kapiler yang dapat memperparah aliran pembuluh darah kecil.

- Penurunan kontraksi luka yang mengakibatkan luka lebih sulit menutup.^{61,62}

Berdasarkan kedalaman lukanya, ulkus dapat diklasifikasikan menurut sistem klasifikasi ulkus Wagner.

- Grade 0: gejala kaki seperti nyeri saja
- Grade 1: ulkus superfisial yang melibatkan kulit dan jaringan subkutan
- Tingkat 2: ulkus dalam yang melibatkan ligamen, otot, tendon, dll
- Tingkat 3: ulkus dengan keterlibatan tulang
- Tingkat 4: gangren kaki depan
- Tingkat 5: gangren kaki penuh⁶³



Gambar 6. Stage ulkus diabetikum⁶⁴

2.6 Pengaruh Pemberian Gel *Secretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSC) Terhadap Ekspresi Gen P38 dan Gen VEGF Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Luka Diabetik

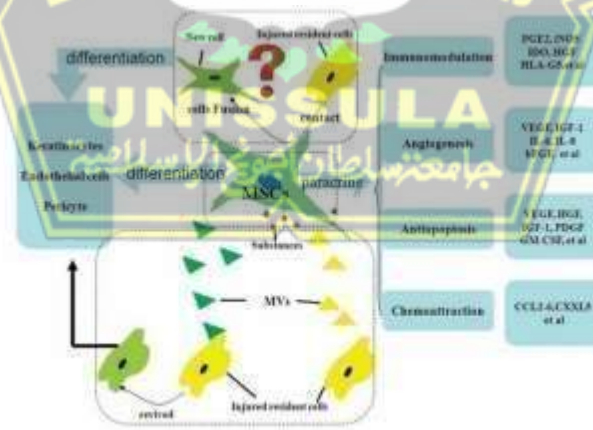
MSC mempunyai potensi regenerasi, potensi ini sangat dipengaruhi berbagai faktor ekstrinsik, yang sangat berpengaruh terhadap potensi terapeutik MSC misalnya, sumber jaringan, status kesehatan dan

umur donor, jumlah serum yang digunakan dalam kultur MSC secara invitro, jumlah passage, oksigen konsentrasi. Secara invitro, *preconditioned* medium MSC dengan beragam perbedaan faktor yang mempengaruhinya telah dikembangkan untuk meningkatkan kapasitas/potensi terapinya termasuk kultur, kandungan farmakologi, sitokin inflamasi, dan hipoksia. Masih sedikit sekali studi yang mempelajari bagaimana *preconditioned* MSC dan profil sekresinya.⁶⁵

Secretome adalah molekul yang diekskresikan ke ruang ekstraselular oleh MSC. Molekul ini berupa protein *soluble*, asam nukleat bebas, lemak dan vesikel ekstraseluler. vesikel ekstraselular dapat dibagi menjadi badan apoptosis, mikropartikel dan *exosome*. *Secretome* dari setiap sel dan jaringan bersifat spesifik dan dapat mengalami perubahan akibat kondisi fisiologis atau patologis. MSC mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang disebut *secretome* yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti sitokin anti inflamasi (IL-10), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *tumor necrosis factor alfa* (TNF- α), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor* (TGF β 1), angiopoietin, IL-1, IL-6, dan IFN γ .⁶⁶⁻⁶⁸

Tekanan oksigen *normoxic* pada standar kultur sel adalah tekanan atmosfer (21% O₂), keadaan hipoksia apabila tekanan oksigen pada rentang 0-10%. Hipoksia *preconditioned* meningkatkan efek sitoprotektif mampu

menjaga multipotensi nya, meningkatkan proliferasi, meningkatkan kemampuan MSC bertahan dalam lingkungan yang kasar dalam menemukan daerah *injury* selama transplantasi.⁶⁹ *Secretome* MSC berfungsi dalam regenerasi jaringan. Peranan ini berkaitan dengan kemampuan *secretome* MSC dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun tubuh. Kemampuan diferensiasi *secretome* MSC memungkinkan untuk mengganti jaringan rusak. Modulasi kondisi imun tubuh berkaitan dengan fungsi *secretome* MSC dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan komponen inflamasi segera menuju ke lokasi penyembuhan luka, sehingga proses inflamasi akan lebih cepat selesai, termasuk memperbaiki proliferasi sel, sintesis matrix ekstraseluler, pelepasan *growth factor*, dan *neovascularisasi*.⁴⁹



Gambar 7. Potensi *secretome* MSC pada luka ulkus⁴⁹

Pada luka diabetik, secara *invivo* *secretome* MSC dalam kondisi hipoksia, mempunyai kemampuan dalam merespon lingkungan hipoksia akibat *stress oksidatif*, peningkatan ROS dan lingkungan luka yang

hipoksia, *secretome* MSC melakukan up regulasi melalui HIF-1 α , yang merangsang VEGF dan angiotensin sebagai promotor vascularisasi, sehingga terjadi neovascularisasi, perbaikan jaringan dan regenerasi. *Secretome* MSC hipoksia juga menunjukkan peningkatan VEGF dan TGF- β , dimana meningkatkan proliferasi sel dan migrasi dari dermal fibroblas luka ulkus diabetikum. Pada luka akut terjadi iskemik jaringan dan *stress oksidatif* yang mengakibatkan dilepaskan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oleh makrofag, fibroblas, dan sel epitel, memulai fosforilasi dan *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) pada sumsum tulang, mengakibatkan hiperoksia yang akan mengaktifkan *Nitric oxide* (NO) yang berfungsi sebagai vasodilatasi sel endotel dan penyembuhan luka diabetik. Ekspresi *chemokine stromal-derived factor-1 α* (SDF-1 α) melalui reseptor CXCR4 akan merangsang *endothelial progenitor cell* (EPC) untuk homing menuju tempat luka, sehingga terjadi proses *angiogenesis*. *Secretome* MSC juga menghasilkan VEGF melalui reseptor VEGFR-2 terjadi upregulasi *pathway* P38 MAPK yang meregulasi migrasi sel endotel melalui MAPKK2K, AP-1 reseptor, memfosforilasi LIMK1 sebagai bagian dari migrasi sel endotel sebagai respon dari VEGF. *Secretome* MSC hipoksia akan melepaskan molekul anti inflamasi IL6, IL8 sebagai respon dari proinflamasi yaitu TNF α , melalui up regulasi P38 MAPK MAGEKs (MKK6, TAK1, dan MKK4) menurunkan TNF α , IL6. LPS.⁷⁰⁻⁷²

BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

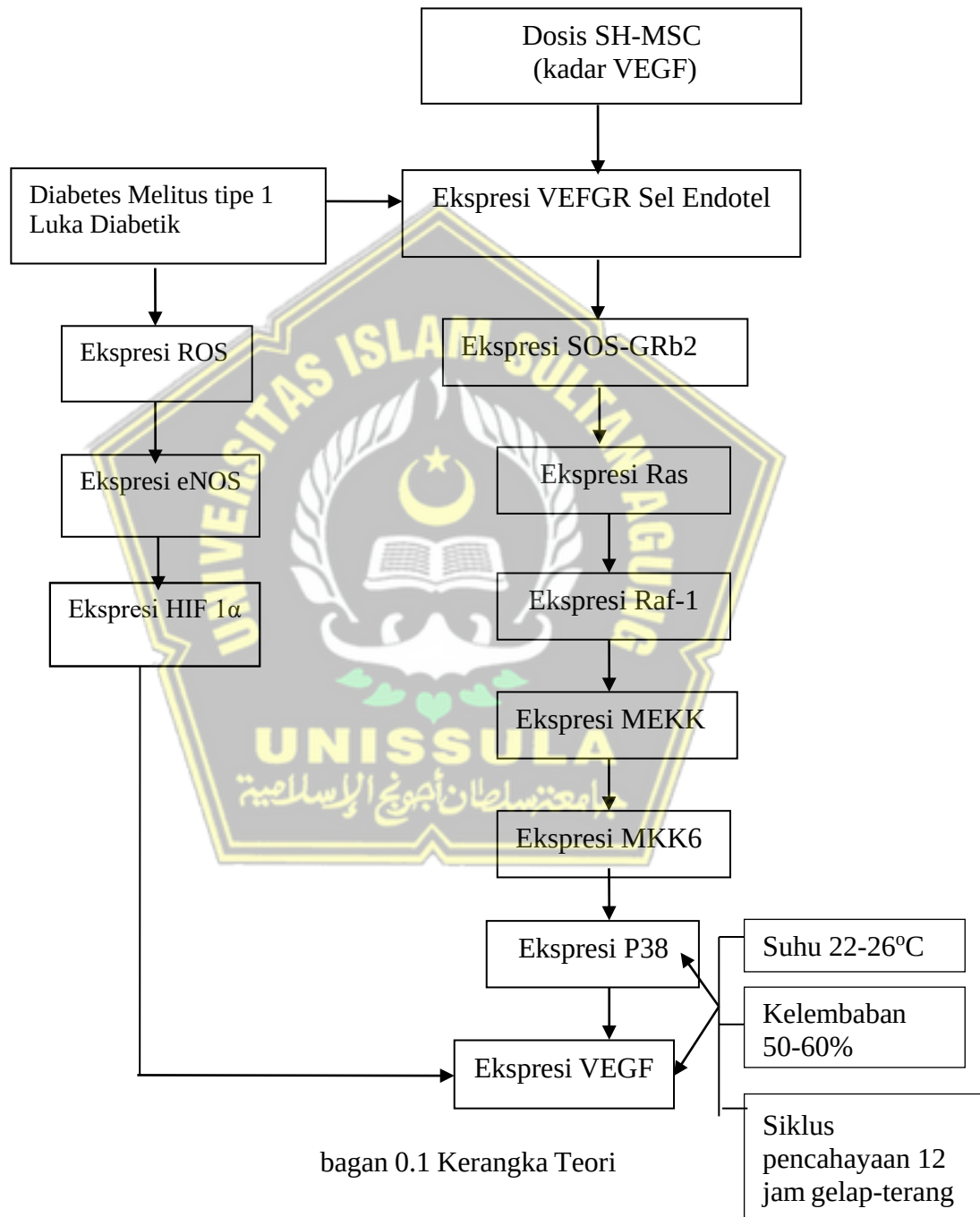
Pada luka diabetik yang berpotensi berkembang menjadi ulkus diabetikum, dikaitkan dengan *delayed wound healing* yang disebabkan menurunnya *growth* faktor VEGF yang mengakibatkan disregulasi P38 MAPK *signaling* sehingga menghambat migrasi endotel, keratinosit dan fibroblast serta dekomposisi kolagen dan matriks ekstraseluler yang terlibat dalam penyembuhan luka.^{31,73}

Ekstraseluler signal yang dikeluarkan oleh VEGF akan ditransduksikan kedalam sel melalui reseptor VEGFR2, beberapa *pathway* termasuk P38 MAPK kinase *pathway*, melalui *canonical* aktivasi kaskade *small GTPases Rac1 tau Cdc42* yang akan memodulasi MAPKKK (ASK1, TAK1, MEKK3, MLK3), dilanjutkan ke MKK3, MKK6, MKK4, membentuk protein scaffolding OSM, mengaktifasi P38 yang mengatur *substrat* sitoplasmik dan regulasi nukleus, merangsang aktivasi faktor transkripsi di nukleus, mengatur berbagai proses *angiogenesis*, migrasi sel endotel, inflamasi respon, deposisi kolagen, MMPs dan *matrik ekstra seluler* (ECM) dalam penyembuhan luka.²³

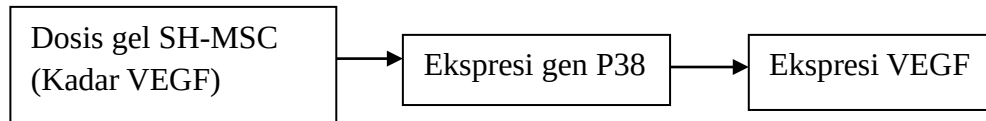
Prekondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan *survival* dan proliferasi MSC, mengekspresikan *soluble* molekul berupa sitokin,

kemokin dan *growth factor* yang lebih banyak dari kondisi normal. Berbagai sitokin dan mediator yang muncul akibat respon MSC terhadap adanya hipoksia, salah satunya adalah *growth factor*, IL-10, TGF dan PDGF.⁷⁴ Berbagai sitokin tersebut yang diekspresikan pada medium, difiltrasi menggunakan TFF yang selanjutnya disebut sebagai SH-MSC.

Growth factor yang berasal dari SH-MSC mengaktifkan jalur RTK faktor akan berikatan dengan reseptor trans membrane ligan (RTK) terjadi *dimerisasi* RTK yang kemudian sinyal ditransduksikan ke sitoplasma, yang membentuk kompleks protein SH2-SH3-SOS-Grb2 kemudian mengaktifkan protein Ras, Raf-1, MEKK1, MKK6, kemudian mengaktivasi P38 MAPK di nukleus, mengaktivasi faktor transkripsi sehingga terjadi peningkatan VEGF pada sel endotel yang berperan pada migrasi sel endotel pada proses *angiogenesis* luka diabetik.^{26,30}



3.2 Kerangka Konsep



Bagan 0.2 Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

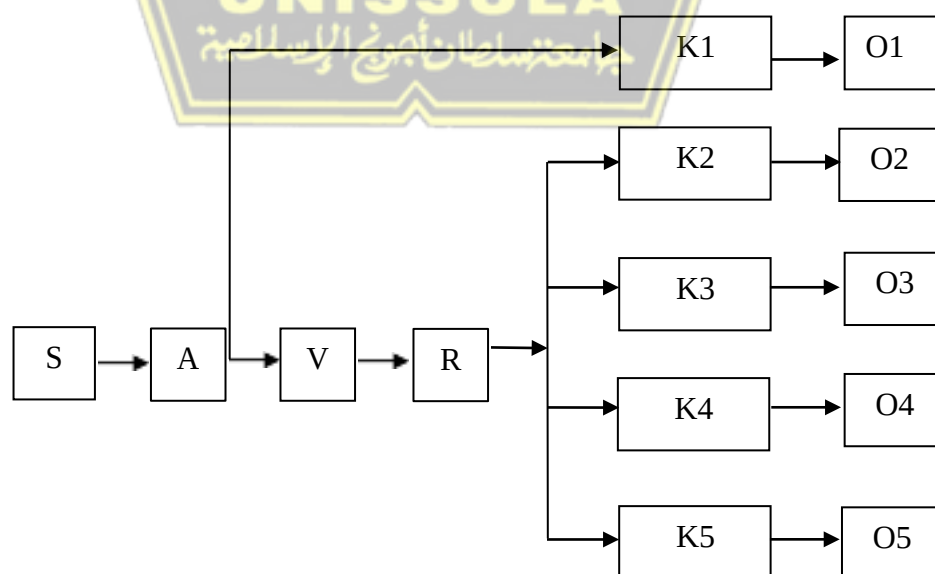
1. Terdapat peningkatan ekspresi gen P38 pada pemberian gel SH-MSC dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel dan dosis 200 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel terhadap pada tikus galur *Wistar* model luka diabetik dibanding kontrol
2. Terdapat peningkatan ekspresi VEGF pada pemberian gel SH-MSC dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel dan dosis 200 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel pada tikus galur *Wistar* model luka diabetik dibanding kontrol.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan mendapatkan intervensi standar (kontrol positif) dan 1 kelompok tikus perlakuan dengan base gel, dan 1 kelompok tikus sehat. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Bagan 0.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

A : Adaptasi

V : Validasi

R : Randomisasi

Perlakuan : K1: Tikus sehat

Perlakuan : K2: Kontrol negatif (tikus model luka diabetik dengan base gel)

Perlakuan : K3: Kontrol positif (tikus model luka diabetik dengan terapi gentamycin)

Perlakuan : K4: Tikus model luka diabetik dengan pemberian gel SH-
MSC dosis 100 μ L/kgBB dalam 100 mg gel

Perlakuan : K5: Tikus model luka diabetik dengan pemberian gel SH-
MSC dosis 200 μ L/kgBB dalam 200 mg gel

O : Observasi

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1 Variabel Penelitian

4.2.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel SH-MSC dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel dan 200 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel

4.2.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi VEGF

4.2.1.3 Variabel Antara

Variabel antara pada penelitian ini adalah ekspresi gen P38

4.2.2 Definisi Operasional

4.2.2.1 Gel SH-MSC

Gel SH-MSC adalah gel yang mengandung molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSC. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan. *Secretome* diperoleh dari medium hasil prekondisi MSC secara hipoksia, kemudian difiltrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*. SH-MSC kemudian dicampur dengan gel sebanyak 1 gr sebagai campuran. Gel *secretome* terbagi dalam beberapa

kelompok yaitu kelompok K4 diberikan SH-MSD dosis 100 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel kelompok K5 diberikan SH-MSD dosis 200 $\mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel

Skala: rasio

4.2.2.2 Ekspresi gen P38

P38 (MAPK) adalah gen salah satu subfamily *Mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), yang diaktivasi oleh sel mamalia oleh adanya stres di lingkungan seluler sebagai respon dari sitokin inflamasi. yang memiliki peran dalam proses ulkus diabetikum sekresi sitokin inflamasi akibat tingginya kadar ROS. Pengukuran ekspresi gen P38 jaringan kulit luka ulkus diabetikum dilakukan dengan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk persentase.

Skala: rasio

4.2.2.3 Ekspresi VEGF

VEGF adalah glikoprotein proangiogenik pada sel endotel yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, survival dan permeabilitas kapiler yang mempunyai peran penting pada proses *angiogenesis* pada proses penyembuhan luka. Pengukuran ekspresi gen VEGF

jaringan kulit luka ulkus diabetikum dilakukan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang disajikan dalam bentuk persentase.

Skala: rasio

4.3 Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 g yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House* SCCR, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang.

4.3.2 Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 8-12 minggu
2. Tikus kondisi ulkus diabetikum yang diinduksi streptozotosin yang divalidasi dengan pemeriksaan gula

darah > 200 mg, secara makroskopis dan mikroskopis

jumlah sel leukosit dengan pewarnaan HE

3. Bobot badan 200-250 g.
4. Sehat dan aktif selama masa adaptasi

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit sebelum masa penelitian.
4. Terdapat infeksi pada luka yang ditandai adanya pus

4.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 5 perlakuan yaitu perlakuan K1 (tikus sehat), K2 (pemberian base gel), K3 (pemberian gentamycin), K4 (Pemberian gel SH-MSC dosis 100 μ L/kgBB dalam 100 mg gel), dan K5 (Pemberian gel SH-MSC dosis 200 μ L/kgBB dalam 200 mg gel).

4.5 Besar Sampel

Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini menggunakan rumus sampel eksperimental dari Federer, dengan rumus:

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6 \rightarrow \text{Pembulatan menjadi 6}$$

keterangan :

t= banyaknya perlakuan

n= banyaknya sampel setiap perlakuan

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, *dissecting kit*, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. Oksigen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Alat untuk induksi DM adalah beaker glass, pengaduk,

sprit 1 cc, neraca dan handscoon, gluco test easy touch. Alat untuk luka eksisi pada tikus adalah punch incisi , sprit 1 cc, stemple cetakan luka 2x2 cm, pinset, gunting bedah, handscoon dan tempat fiksasi. Selain itu, penelitian ini juga steril swab untuk mengoleskan gel SH-MSC.

4.6.2 Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, dinitrophenyl-bovine serum albumin (DNP-BSA), gel aluminium hidroksida (Al(OH)), 2,4-Dinitrochlorobenzene 1,5% (DNCB), aseton-minyak zaitun NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah , streptozotosin, buffer sitrat, gel berbasis air, ketamin, dan xylasine.

4.7 Cara Penelitian

4.7.1 Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearence penelitian disetujui oleh komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan nomor 178/V/2023/Komisi Bioetik.

4.7.2 Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke *petri dish*, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.

8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.7.3 Proses Hipoksia dan TFF

- 4.7.3.1 MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit hingga 10 ml
- 4.7.3.2 Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
- 4.7.3.3 Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam *chamber*
- 4.7.3.4 Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
- 4.7.3.5 Setelah 24 jam, media kultur diambil dan disaring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SH-MSC yang selanjutnya disesuaikan dengan P1 dan P2

4.7.3.6 Kemudian dilakukan validasi kandungan VEGF, PDGF, FGF, TGF- β , IL-10 pada SH-MSC dengan ELISA ASSAY

4.7.4 Pembuatan Sediaan Gel

4.7.4.1 Pembuatan sediaan gel SH-MSC dilakukan dengan cara mencampurkan SH-MSC dengan gel sehingga mempunyai konsentrasi 250 μ L/g. Gel SH-MSC 100 mg dan 200 mg masing-masing mempunyai kandungan SH-MSC dengan dosis 100 μ L/kgBB (P1) dan 200 μ L/kgBB *secretome* (P2).

4.7.4.2 Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah pengamatan mikroskop.

4.7.5 Pembuatan Tikus Model Luka diabetic

4.7.5.1 Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu, dipuasakan selama 8-12 jam kemudian, kemudian dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb), diinjeksi Streptozotocin secara intraperitoneal dengan dosis 65 mg/kgbb (1x sehari), yang dilarutkan Dalam buffer sitrat 0,1 M pH 4,0. Pada hari ke-7 setelah induksi dilakukan pengujian kadar gula darah, dinyatakan diabetes bila konsentrasi gula darah >200 mg/dl dengan menggunakan gluco-check dan pemeriksaan kadar insulin C-Peptide dengan spektrofotometri

4.7.5.2 21 hari setelah injeksi Streptozotosin, di cek ulang kadar gula darah > 200 mg/dl, rambut pada punggung atas tikus potong hingga bersih.

4.7.5.3 Menggunakan steril dan aseptik, dilakukan punch incisi pada punggung atas, berbentuk bulat dengan diameter 6 mm dan kedalam 2 mm menggunakan alat punch incisi disposable. Luka dibiarkan selama 5 hari.

4.7.5.4 Selanjutnya pada hari ke enam setelah terbentuk luka diabetik, diberi treatment dengan pemberian gel topikal setiap hari selama 10 hari, yang mengandung gel SH-MSC dosis $100 \mu\text{L/kgBB}$ dalam 100 mg gel (P1) dan dosis $200 \mu\text{L/kgBB}$ dalam 200 mg gel (P2). Tikus kontrol negatif (K) diberikan perlakuan base gel, tikus kontrol positif (GE) diberikan perlakuan terapi Gentamycin.

4.7.6 Validasi luka diabetik pemeriksaan makroskopis.

Makroskopis dengan menggunakan foto sampel Treatment
Luka Diabetik

4.7.7 Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA **Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10% dan dibuat menjadi blok paraffin.**

- 4.7.7.1 Sampel kulit sebanyak 50 mg-100 mg kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 μ l RNA Iso Plus. Potongan kulit ditumbuk menggunakan ultrarotator dan ditambahkan lagi RNA Iso Plus sebanyak 50 μ L dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
- 4.7.7.2 Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada kecepatan 15.000 xg-force selama 15 menit pada suhu 4°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
- 4.7.7.3 Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
- 4.7.7.4 Tabung Eppendorf diresuspensi hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 12.000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.

- 4.7.7.5 Setelah kering ditambahkan 100 μ l etanol 75% dalam larutan (Diethyl pyrocarbonat) DEPC lalu bolak-balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.
- 4.7.7.6 Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 50-100 μ l dan simpan pada suhu -80°C atau dapat digunakan pada penelitian selanjutnya.
- 4.7.7.7 kemudian sebanyak 2 μ l sampel RNA dikuantifikasi menggunakan nanodrop dengan Panjang gelombang 260 nm. Hasil kuantifikasi akan dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
- 4.7.7.8 Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 μ L OligoDT serta PCR NFW water hingga mencapai volume 10 μ L, kemudian dimasukkan dalam thermal cycler selama 5 menit dalam suhu 70°C.
- 4.7.7.9 Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 μ L, DEPC-Treated H₂O 5 μ L, ReverTrace 1 μ L. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 45-50°C selama 30 menit.

4.7.8 Pembacaan P38/VEGF dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

- 4.7.8.1 Ekspresi gen P38 dan gen VEGF dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)
- 4.7.8.2 Campuran dari 1 μL cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan MgCl_2) sebanyak 10 μL , primer forward dan reverse masing masing sebanyak 1 μL dan nuclease free water hingga total 20 μL .

- 4.7.8.3 Primer P38 yang digunakan adalah

F: 5' GAGCGTTACCAGAACCTGTCTC dan

R: 5' AGTAACCGCAGTTCTCTGTAGGT dan primer

VEGF yang digunakan adalah F: 5'

CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG dan R: 5'

GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC

Primer housekeeping

Primer GAPDH, F: 5' ACTCCACTCACGGCAAATTC

R: 5' TCTCCATGGTGGTGAAGACA

Primer β actin, F: 5'

CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG

R: 5' TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

4.7.8.4 PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine dengan profil suhu predenaturasi sebesar 95°C selama 3 menit, denaturasi sebesar 95°C lama 30 detik, kemudian di aneling selama 20 detik pada suhu 64°C dengan siklus sebanyak 40 kali

4.7.8.5 Peningkatan ekspresi gen P38 dan gen VEGF dianalisis dalam ratio peningkatan terhadap house keeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.

4.8 Tempat dan Waktu Penelitian

4.8.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) FK Unissula Semarang.

4.8.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli-Agustus 2023 .

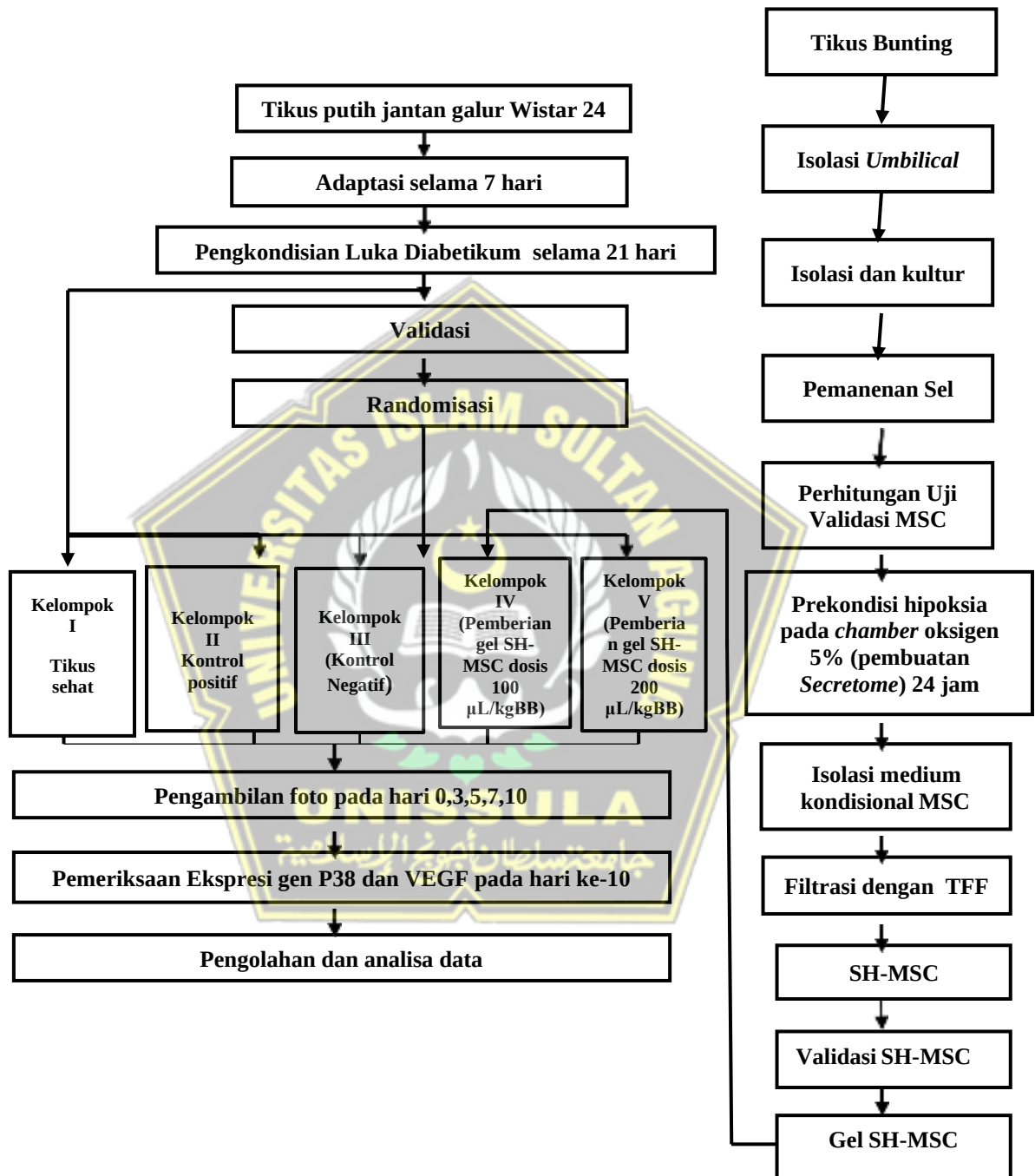
4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Didapatkan sebaran dan varian data normal ($p < 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji beda *Kruskal Wallis*. Hasil analisis terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok

penelitian, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



4.10 Alur Penelitian



bagian 4.2 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian gel *secretome* MSC terhadap peningkatan ekspresi P38 dan VEGF pada tikus model luka diabetik. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juli sampai Agustus 2023 bertempat di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.

Penelitian menggunakan Tikus Wistar jantan sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 30 ekor tikus sesuai kriteria Frederer. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 5 kelompok, (K1) tikus sehat, (K2) tikus sakit tanpa perlakuan (kontrol negatif), (K3) tikus sakit dengan perlakuan terapi gentamycin (kontrol positif), (K4) tikus sakit dengan perlakuan *secretome* dosis 100µl dan (K5) tikus sakit dengan perlakuan *secretome* dosis 200µl.

Sel punca mesenkimal yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Umbilical Cord* tikus usia kehamilan 21 hari. Validasi MSC dilakukan menggunakan analisis kemampuan differensiasi *osteogenic* serta analisis fenotip sel menggunakan *flowcytometri*. Sel yang telah tervalidasi kemudian di inkubasi pada kondisi hipoksia.

5.1 HASIL PENELITIAN

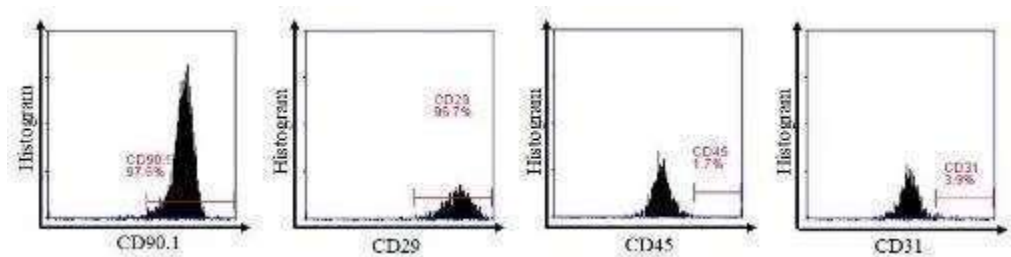
5.1.1 Isolasi *Secretome* Hipoksia *Mesenkimal Stem Cell*

Isolasi MSC dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang yang menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask plastik dengan medium khusus. Hasil kultur SPM setelah pasase ke 5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis.



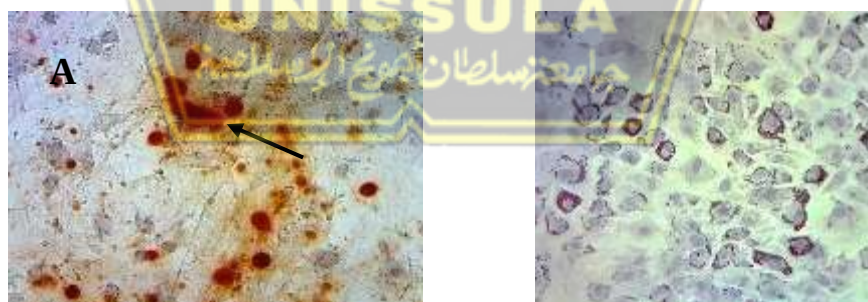
Gambar 8. Isolasi MSC dengan sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 100x.

Hasil isolasi MSC divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSC dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa MSC mampu mengekspresikan CD90 (99,80%), CD29 (94,20%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%)



Gambar 9. Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

Penelitian ini juga menganalisis kemampuan MSC dalam berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel matur. MSC diberi medium khusus agar dapat berdiferensiasi masing-masing menjadi osteofit dan adiposit. Penelitian ini menunjukkan bahwa SPM mampu berdiferensiasi menjadi osteofit dan adiposit yang diindikasikan dari endapan kalsium dan lemak berupa penampakan merah menggunakan pewarnaan *Alizarin Red* dan *oil Red dye* pada masing-masing kultur osteogenik dan adipogenik



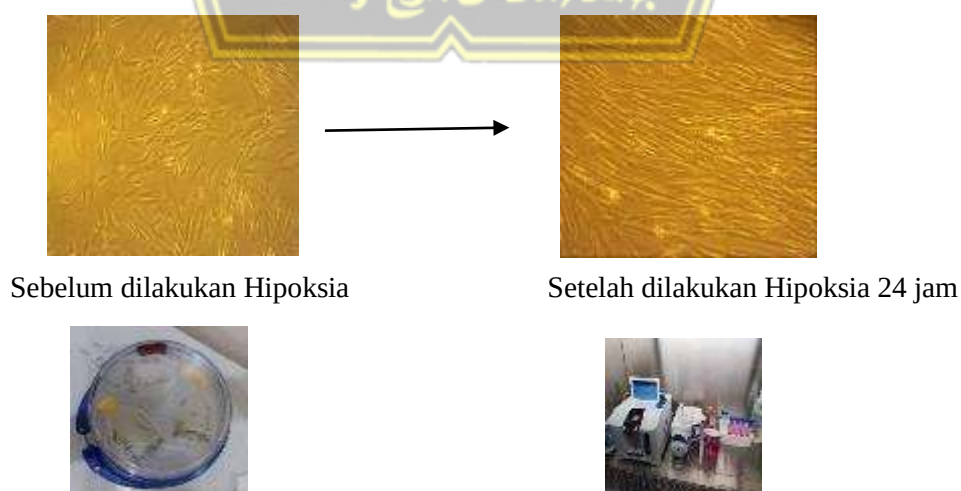
Gambar 10. (A) MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) berdiferensiasi menjadi Adiposit setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red* pada pembesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).

MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O₂ 5% selama 24 jam menggunakan *chamber hypoxia*.

Tabel 2. Hasil Analisis Kandungan *Secretome*

Molecules	SH-MSCs Value $\pm$ SE (pg/mL)
VEGF	1137.56 $\pm$ 37.51
PDGF	947.26 $\pm$ 34.93
bFGF	1175.54 $\pm$ 38.82
IL-10	525.12 $\pm$ 10.24
TGF- β	372.53 $\pm$ 9.18

Medium kultur MSC yang mengandung *secretome* kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *Tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan molekular *weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50 kDa yang mengandung sitokin interleukin-10 atau IL-10 dan *Transforming growth factor* - β ^{75,76}. IL-10 merupakan molekul antiinflamasi monomer berukuran ~18kDa yang berfungsi dominan dalam proses imunosupresi dan dapat disekresikan oleh sel punca mesenkimal pada kondisi hipoksia.⁷⁷ VEGF merupakan molekul *growth factor* dimer berukuran 25kDa yang memiliki peran mencegah proses inflamasi berlangsung lebih lama.

Gambar 11. Pembuatan *secretome* MSC hipoksia

5.1.2 Efek pemberian gel secretome hipoksia MSC dosis 100 μ L dan 200 μ L pada ekspresi gen VEGF

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa pemberian gel SH-MSC mampu meningkatkan ekspresi VEGF pada tikus luka diabetik secara signifikan bergantung pada dosis.

Tabel 3 Data Hasil Penelitian ekspresi p38 dan VEGF

kelompok		Variabel	
		Ekspresi p38	Ekspresi VEGF
K2	Rerata $\pm$ SD	0.2954 $\pm$ 0.0847	0.3979 $\pm$ 0.0909
K3	Rerata $\pm$ SD	0.3330 $\pm$ 0.3722	1.2326 $\pm$ 0.3722
K4	Rerata $\pm$ SD	0.4928 $\pm$ 0.2034	0.9924 $\pm$ 0.0708
K5	Rerata $\pm$ SD	0.7414 $\pm$ 0.1473	1.2543 $\pm$ 0.1719
P Value		*<0.05 **0.000	*<0.05 ** 0.000

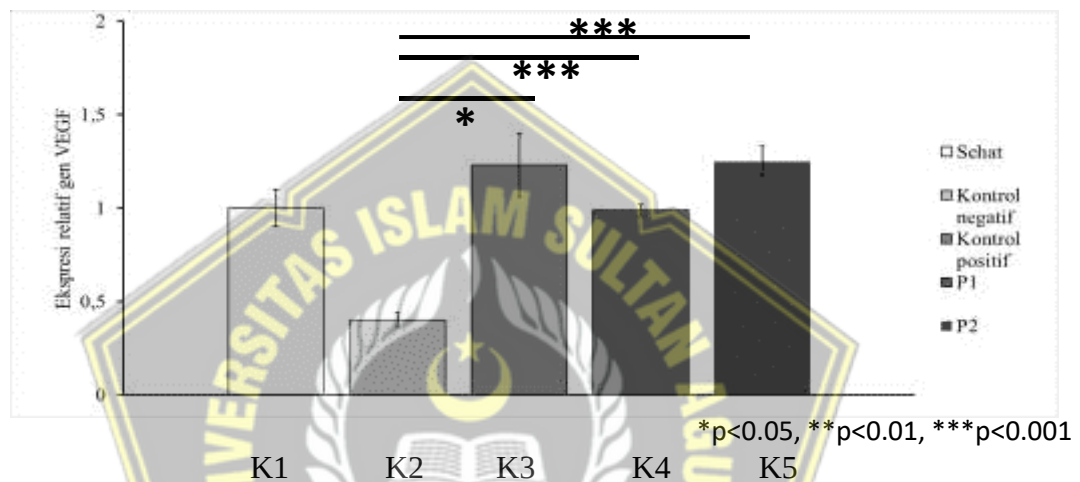
Keterangan :

*Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

** kruskal wallis ($p < 0,05$ = ada beda makna)

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 3, Rerata ekspresi VEGF meningkat di kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan K4 dan K5, dimana pada kelompok P1 meningkat paling signifikan. Data ekspresi VEGF keempat kelompok terdapat data yang tidak berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p < 0,05$, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal wallis* menghasilkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga

dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi VEGF yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal Wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Mann Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 12. Grafik ekspresi VEGF pada seluruh kelompok penelitian

Tabel 4. Uji *Post Hoc Mann whitney* Ekspresi VEGF dan P38 Pada Masing-Masing Kelompok.

Variabel	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
				Batas Bawah	Batas Atas
VEGF	K2	K3*	0.000	0.000	0.139
		K4*	0.000	0.000	0.139
		K5*	0.000	0.000	0.139
P38	K2	K3	0.550	0.332	0.768
		K4*	0.000	0.000	0.139
		K5*	0.000	0.000	0.139

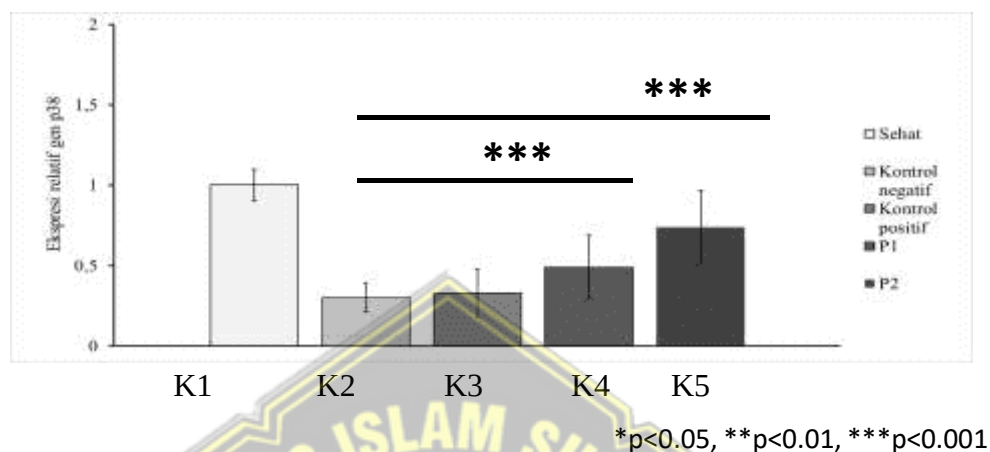
Tanda * menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan data diatas didapatkan rerata K2 dengan K3 ($p=0.000$), K2 dengan K4 ($p=0.000$), K2 dengan K4 ($p=0.000$) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$). Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p < 0,001$). Hasil uji *Post Hoc Mann Whitney* pada data ekspresi VEGF menunjukkan bahwa pemberian gel SH-MSD dosis 100 μ L dan 200 μ L dapat meningkatkan ekspresi VEGF pada tikus jantan galur wistar dengan luka diabetik dan hasil ini terdapat perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan pemberian kontrol.

5.1.3 Efek Pemberian Gel Secretome Hipoksia MSD dosis 100 μ L dan 200 μ L pada ekspresi Gen p38

Berdasarkan hasil penelitian yang di tunjukkan pada tabel 4, Rerata ekspresi p38 meningkat paling signifikan dikelompok perlakuan K4 dan K5 dibanding kelompok kontrol, dimana pada kelompok K4 meningkat paling signifikan. Data ekspresi p38 keempat kelompok terdapat data yang tidak berdistribusi normal, ditunjukkan dengan hasil *Shapiro Wilk* diperoleh nilai $p < 0,05$, maka dilakukan analisis statistik non parametrik dengan uji *Kruskal wallis* menghasilkan nilai $p=0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan terdapat perbedaan rerata ekspresi p38 yang bermakna diantara keempat kelompok. Hasil uji *Kruskal Wallis*

yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Mann Whitney* untuk melihat kelompok mana yang paling berpengaruh.



Gambar 13. Grafik ekspresi p38 pada semua kelompok penelitian

Berdasarkan data dari tabel 5.6 didapatkan rerata K2 dengan K3 ($p=0.550$) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p>0.001$), sedangkan K2 dengan K4 ($p=0.000$) dan K2 dengan K5 ($p=0.000$) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$). terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p<0,001$). Hasil uji *Post Hoc Mann Whitney* pada data ekspresi p38 menunjukkan bahwa pemberian gel SH-MSC dosis 100 μ l dan 200 μ l dapat meningkatkan ekspresi p38 pada tikus jantan galur wistar dengan luka diabetik dan hasil ini terdapat perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan pemberian kontrol.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Proses penyembuhan luka melibatkan cascade yang kompleks yang meliputi mekanisme perbaikan jaringan termasuk inflamasi, granulasi,

reepitelisasi, angiogenesis dan lymphangiogenesis proses ini didorong oleh sekresi *growth factor* oleh sel inflamasi, sel stromal sebagai respon dari kerusakan jaringan.⁶⁴

Luka diabetik sebagai inflamasi kronis ditandai dengan kerusakan fungsi dari sel inflamasi penurunan dari sekresi *growth factor*, dan fase inflamasi yang memanjang.⁷⁸ Tingginya proteolitik *microenvironment* mengakibatkan penurunan aktivitas VEGF pada luka diabetik, sehingga terjadi perkembangan yang rendah dari granulasi jaringan dan terhambatnya penutupan luka.⁷⁹ Penelitian terkini membuktikan bahwa *secretome* hipoksik Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) mengandung soluble molecule bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti inflamasi yang memiliki kemampuan dalam aktivasi jalur MAPK untuk memicu proses regenerasi jaringan luka dan angiogenesis melalui peningkatan VEGF.^{22,31} Selain itu MSC yang dikultur pada kondisi hipoksia mampu mengekspresikan VEGF-A lebih tinggi dibandingkan kondisi normoksia. Penelitian lain menyatakan bahwa peningkatan produksi VEGF dan ANG sebagai angiogenik faktor mampu menginduksi angiogenesis pada luka di kulit serta memicu sintesis kolagen dan reepitelisasi.²²

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terjadi peningkatan ekspresi P38 dan VEGF pada pemberian gel SH-MSC dengan variasi dosis 100µl dan 200µl pada luka diabetik menggunakan tikus jantan galur wistar yang diinduksi Streptozotocine 65 mg/kgbb dosis tunggal

selama 21 hari, yang kemudian dibuat luka eksisi 6 mm di punggung belakang dengan kedalaman 2 mm. Penelitian juga membandingkan pemberian gel SH-MSC dengan antibiotik sebagai kelompok kontrol positif. Pemilihan antibiotik sebagai kontrol karena memiliki kemampuan menghambat dan membunuh mikroba pada luka terbuka yang berkorelasi terhadap penyembuhan luka pada luka diabetik.

Penelitian ini melakukan pengukuran ekspresi gen P38 dan VEGF. Hasil penelitian menunjukkan pemberian gel SH-MSC kelompok perlakuan (pemberian gel SH MSCs dosis 100µl dan 200 µl) secara statistik signifikan dalam meningkatkan ekspresi gen P38 dan VEGF dibandingkan pada kelompok (p=0,000) yang dapat berkorelasi dalam percepatan penyembuhan luka. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat indikasi peningkatan proses proliferasi sel dan angiogenesis pada dosis pemberian gel SH-MSC dosis 100 µl dan 200 µl. Peningkatan ekspresi P38 dan VEGF diduga disebabkan karena adanya pengaruh dari sitokin IL-10 dan beberapa *growth factor* yang terkandung dalam gel SH-MSC yang memiliki fungsi penting sebagai anti-inflamasi dan inisiasi proses proliferasi dan reepitelialisasi.²²

Secretome MSC telah terbukti mengandung berbagai molekul bioaktif, termasuk faktor-faktor pertumbuhan dan sitokin. Beberapa komponen ini dapat mengaktifkan jalur sinyal intraseluler pada sel penerima. Dalam konteks ekspresi P38, telah teramati bahwa beberapa

komponen dari *secretome* MSC dapat merangsang jalur sinyal P38-MAPK pada sel target.²⁵

Aktivasi P38-MAPK memiliki peran penting dalam mengatur berbagai proses seluler, termasuk angiogenesis. Dengan mempromosikan aktivasi jalur ini, *secretome* MSC dapat memainkan peran sentral dalam meningkatkan ekspresi P38 dalam sel target. Hal ini sangat relevan dalam regenerasi jaringan di mana peningkatan ekspresi P38 dapat berkontribusi pada angiogenesis dan perbaikan jaringan.^{74,80}

Penelitian lain melaporkan bahwa komponen yang ada dalam *secretome* MSC seperti *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β) atau *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) dapat mengikat reseptor pada sel target dan memulai kaskade sinyal yang mengarah pada aktivasi P38. Selain itu, *secretome* MSC juga mengandung sitokin sitokin seperti Interleukin-6 (IL-6) atau Interleukin-8 (IL-8) yang dapat mengaktifkan jalur MAPK, termasuk P38 pada sel-sel target. Aktivasi ini kemungkinan melibatkan reseptor permukaan sel target dan jalur sinyal intraseluler. Dalam konteks angiogenesis, aktivasi P38 oleh *secretome* MSC dapat merangsang produksi faktor faktor seperti VEGF, yang diperlukan untuk pembentukan pembuluh darah baru.^{20,28}

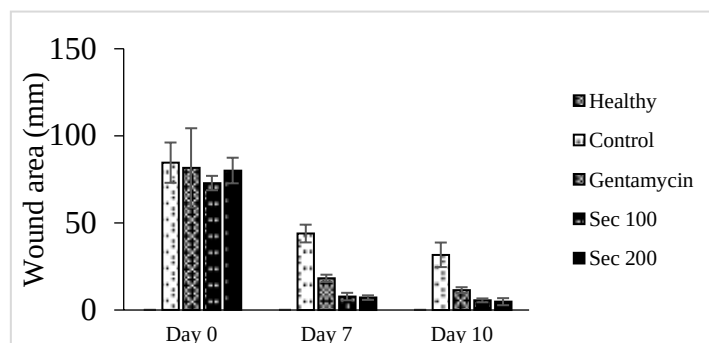
Selain itu, aktivasi P38 dapat memodulasi ekspresi gen yang terkait dengan angiogenesis, seperti VEGF dan FGF (*Fibroblast Growth*

Factor), yang penting dalam memicu pembentukan pembuluh darah baru. Terdapat bukti bukti yang menunjukkan bahwa jalur P38 MAPK dapat memainkan peran penting dalam mengatur ekspresi VEGF. Jalur ini dapat diaktifkan oleh sejumlah faktor pertumbuhan, sitokin, atau stres oksidatif. Aktivasi jalur P38 dapat merangsang transkripsi gen VEGF, yang mengarah pada peningkatan produksi VEGF oleh sel sel target. Menurut penelitian terdahulu VEGF adalah faktor pertumbuhan utama yang merangsang pembentukan pembuluh darah baru.^{81,82}

Jalur P38 juga dapat berinteraksi dengan faktor-faktor transkripsi seperti HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha), yang terlibat dalam regulasi VEGF. Aktivasi P38 dapat mempengaruhi stabilitas dan aktivitas HIF-1 α , yang pada gilirannya dapat memengaruhi ekspresi VEGF.⁸³



Gambar 14. Foto penutupan luka pada hari 0,7 dan 10



Gambar 15. Grafik kecepatan penyembuhan luka pada hari 0, 7 dan 10

Pada penelitian ini secara statistik terdapat perbedaan yang bermakna pemberian gel SH-MSC dengan kelompok kontrol. Pemberian Gentamycin pada kelompok kontrol positif dapat membantu mengontrol infeksi luka diabetes, yang merupakan faktor penting dalam mempromosikan penyembuhan. Dengan mengurangi jumlah bakteri patogen di luka, gentamycin dapat membantu mengurangi peradangan dan memungkinkan sel-sel penyembuhan luka untuk bekerja lebih efektif.⁸⁴ Hal ini juga dibuktikan dengan kecepatan penutupan luka secara makroskopis dan grafik *wound closure rate* terlihat pada foto yang diambil pada hari 0,7 dan 10. Pemberian gentamycin mempunyai efek yang sama dengan pemberian Gel SH-MSCs, penelitian terdahulu menyatakan bahwa *secretome* MSC selain bersifat antiinflamasi dan regeneratif, juga memiliki potensi antimikroba. Komponen dalam *secretome* MSC dapat memodulasi respons imun untuk dapat membantu dalam mengarahkan sistem kekebalan untuk melawan infeksi dengan lebih efektif.⁸⁵ Penelitian lain mengungkapkan bahwa MSC *secretome*

mengandung peptida antimikroba, seperti defensin, LL-37 dan cathelicidin, yang memiliki kemampuan alami untuk merusak membran sel bakteri dan jamur. Ini mengakibatkan kematian mikroba dan menghambat perkembangan mereka.^{86,87}

Dalam kesimpulan, *secretome* MSC dapat berperan dalam peningkatan ekspresi P38 melalui aktivasi jalur MAPK dan sinyal seluler yang memengaruhi angiogenesis dan regenerasi jaringan. Pemahaman lebih lanjut tentang mekanisme ini akan membantu mengarahkan pengembangan terapi yang memanfaatkan potensi regeneratif *secretome* MSC dalam aplikasi klinis.

Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan histopatologi densitas kolagen dan ekspresi keratinosit setelah diberikan dosis SH-MSC dimana migrasi keratinosit merupakan tahapan penting pada reepitelisasi luka melalui up regulasi p38 MAPK. Pada luka diabetik yang berpotensi berkembang menjadi ulkus diabetikum, dikaitkan dengan *delayed wound healing* yang disebabkan menurunnya *growth* faktor VEGF yang mengakibatkan disregulasi P38 MAPK *signaling* sehingga menghambat migrasi endotel, keratinosit dan fibroblast serta dekomposisi kolagen dan matriks ekstraseluler yang terlibat dalam penyembuhan luka.⁷³

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Terdapat pengaruh pemberian gel *secretome* MSC hipoksia terhadap ekspresi gen P38 dan VEGF pada tikus jantan galur wistar model luka diabetik.
2. Pemberian gel SH-MSC dosis 100 μ L dan 200 μ L berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan ekspresi P38 pada tikus luka diabetik yang diinduksi Streptozotocine
3. Pemberian gel SH-MSC dosis 100 μ L dan 200 μ L berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan ekspresi VEGF pada tikus luka diabetik yang diinduksi Streptozotocine

6.2 Saran

1. Sebagai saran untuk penelitian ini adalah adanya pengukuran parameter antiinflamasi seperti IL-10, TGF beta dan IL-4 untuk dapat menjelaskan mekanisme SH-MSC dalam meningkatkan P38 dan VEGF
2. Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi densitas kolagen dan ekspresi keratinosit, serta sitokin dan kemokin SDF-1/CXCR4 yang berperan dalam migrasi sel endotel pada proses angiogenesis

DAFTAR PUSTAKA

1. Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. Vol. 122, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. Georg Thieme Verlag; 2014. p. 384–6.
2. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? Vol. 20, *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. Medknow Publications; 2016. p. 546–53.
3. Hanai Y, Adachi S, Yasuda I, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, et al. Collagen-induced p38 MAP kinase activation is a biomarker of platelet hyper-aggregation in patients with diabetes mellitus. *Life Sci*. 2009 Aug 26;85(9–10):386–94.
4. Endokrinologi Indonesia Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes melitus tipe 2 dewasa di indonesia-2021 perkeni penerbit pb. perkeni.
5. Khan I, Neumann C, Sinha M. Tissue regeneration and reprogramming. In: *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*. Elsevier; 2020. p. 515–34.
6. Ilmiah Kesehatan Sandi Husada J, Utia Detty A, Fitriyani N, Prasetya T, Florentina B. Karakteristik Ulkus Diabetikum Pada Penderita Diabetes Melitus The Characteristics of Diabetic Ulcer in Patients with Diabetes Mellitus. Juni [Internet]. 2020;11(1):258–64. Available from: <https://akper-sandikarsa.e-journal.id/JIKSH>
7. Sudoyono S. Diabetes Mellitus Di Indonesia. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. IV. Suyuno S, editor. Vol. III. Jakarta: Interna Publishing; 2006.
8. Regmi S, Pathak S, Kim JO, Yong CS, Jeong JH. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. Vol. 98, *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH; 2019.
9. Zarei F, Negahdari B, Eatemadi A. Diabetic ulcer regeneration: stem cells, biomaterials, growth factors. Vol. 46, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd.; 2018. p. 26–32.
10. Fui LW, Lok MPW, Govindasamy V, Yong TK, Lek TK, Das AK. Understanding the multifaceted mechanisms of diabetic wound healing and therapeutic application of stem cells conditioned medium in the healing process. Vol. 13, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. John Wiley and Sons Ltd; 2019. p. 2218–33.

11. Parikh U, Masri L, Saravanan S, Li H, Miao Q, Balaji S. Role of cytokines and chemokines in wound healing. In: *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*. Elsevier; 2020. p. 197–235.
12. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Vol. 176, *Cell*. Cell Press; 2019. p. 1248–64.
13. Park SR, Kim JW, Jun HS, Roh JY, Lee HY, Hong IS. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy*. 2018 Feb 7;26(2):606–17.
14. Yan J, Liang J, Cao Y, El Akkawi MM, Liao X, Chen X, et al. Efficacy of topical and systemic transplantation of mesenchymal stem cells in a rat model of diabetic ischemic wounds. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Dec 1;12(1).
15. Ahmadi H, Amini A, Fadaei Fathabady F, Mostafavinia A, Zare F, Ebrahimpour-malekshah R, et al. Transplantation of photobiomodulation-preconditioned diabetic stem cells accelerates ischemic wound healing in diabetic rats. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Dec 1;11(1).
16. Pomatto M, Gai C, Negro F, Cedrino M, Grange C, Ceccotti E, et al. Differential therapeutic effect of extracellular vesicles derived by bone marrow and adipose mesenchymal stem cells on wound healing of diabetic ulcers and correlation to their cargoes. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 2;22(8).
17. Wang B, Pang M, Song Y, Wang H, Qi P, Bai S, et al. Human fetal mesenchymal stem cells secretome promotes scarless diabetic wound healing through heat-shock protein family. *Bioeng Transl Med*. 2022;
18. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Vol. 1773, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2007. p. 1358–75.
19. Pernow J, Kiss A, Tratsiakovich Y, Climent B. Tissue-specific up-regulation of arginase i and II induced by p38 MAPK mediates endothelial dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *Br J Pharmacol*. 2015 Oct 1;172(19):4684–98.
20. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Vol. 429, *Biochemical Journal*. 2010. p. 403–17.
21. Nandipati KC, Subramanian S, Agrawal DK. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. Vol. 426, *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer New York LLC; 2017. p. 27–45.
22. Li L, Zhang J, Zhang Q, Zhang D, Xiang F, Jia J, et al. High glucose suppresses keratinocyte migration through the inhibition of p38 MAPK/autophagy pathway. *Front Physiol*. 2019;10(JAN).

23. Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells [Internet]. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
24. Falcicchia C, Tozzi F, Arancio O, Watterson DM, Origlia N. Involvement of p38 mapk in synaptic function and dysfunction. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–14.
25. Whitmarsh AJ. A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. Vol. 8, BMC Biology. 2010.
26. Brennan CM, Emerson CP, Owens J, Christoforou N. p38 MAPKs - roles in skeletal muscle physiology, disease mechanisms, and as potential therapeutic targets. Vol. 6, JCI Insight. 2021.
27. Komers R, Schutzer W, Xue H, Oyama TT, Lindsley JN, Anderson S. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on blood pressure, renal hemodynamics, and renal vascular reactivity in normal and diabetic rats. Translational Research. 2007;150(6):343–9.
28. You J, Wang Z, Xu S, Zhang W, Fang Q, Liu H, et al. Advanced Glycation End Products Impair Glucose-Stimulated Insulin Secretion of a Pancreatic β -Cell Line INS-1-3 by Disturbance of Microtubule Cytoskeleton via p38/MAPK Activation. J Diabetes Res. 2016;2016.
29. Bengal E, Aviram S, Hayek T. P38 mapk in glucose metabolism of skeletal muscle: Beneficial or harmful? Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–17.
30. Stanca Melincovici C, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Miha C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. Rom J Morphol Embryol [Internet]. 2018;59(2):455–67. Available from: <http://www.rjme.ro/>
31. Wiszniak S, Schwarz Q. Exploring the intracrine functions of vegf-a. Vol. 11, Biomolecules. MDPI AG; 2021. p. 1–13.
32. Parikh U, Masri L, Saravanan S, Li H, Miao Q, Balaji S. Role of cytokines and chemokines in wound healing. In: Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes. Elsevier; 2020. p. 197–235.
33. Simsek S, van den Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. Vol. 2010, Mediators of Inflammation. 2010.
34. Haigh JJ. Role of VEGF in organogenesis. Vol. 4, Organogenesis. 2008.
35. Nur Rosyid F, Dharmana E, Suwondo A, Seno KHNH. VEGF: structure, biological activities, regulations and roles in the healing of diabetic ulcers. Int J Res Med Sci. 2018 Jun 25;6(7):2184.

36. Castillo MFR, Cohen A, Edberg D, Hoppensteadt D, Fareed J, Martin B, et al. Vascular endothelial growth factor in bipolar depression: A potential biomarker for diagnosis and treatment outcome prediction. *Psychiatry Res.* 2020;284.
37. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, et al. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2011;301:695–704. Available from: www.ajpcell.org
38. Wautier JL, Wautier MP. Vascular Permeability in Diseases. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
39. Maharaj ASR, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. Vol. 74, *Microvascular Research*. 2007.
40. Ghahramani M, Razavi Majd Z. The Effect of Physical Activity on VEGF and HIF-1 Signaling. *Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences*. 2020;9(2).
41. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, et al. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Current Biology*. 2003;13(12).
42. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*. 2008;456(7223).
43. Ribatti D. The discovery of the fundamental role of VEGF in the development of the vascular system. *Mech Dev*. 2019;160.
44. Wautier JL, Wautier MP. Cellular and molecular aspects of blood cell–endothelium interactions in vascular disorders. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 1;21(15):1–16.
45. Wang M, Liu H. Role of HIF-VEGF-Notch signaling pathway in angiogenesis. *China Journal of Leprosy and Skin Diseases*. 2021;37(5).
46. Dalton SJ, Whiting CV, Bailey JR, Mitchell DC, Tarlton JF. Mechanisms of chronic skin ulceration linking lactate, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, collagen remodeling, collagen stability, and defective angiogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007 Apr;127(4):958–68.
47. Punca S, Karakteristik :, Dan P, Budiman A, Staf H, Bagian P, et al. *Tinjauan Pustaka*. Vol. 22, *J. Kedokt Meditek*. 2016.
48. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017;35(4).

49. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
50. Alwi I. Perkembangan Terapi Sel Punca (Stem Cell) Pada Penyakit Jantung: Masa Kini dan Masa Depan. *medica hospital*. 2013;1 (2):71–9.
51. Widowati W, Widyanto R. Sel Punca Sebagai Alternatif Terapi. *Zenit*. 2015;2 (1):1–5.
52. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
53. Ezhilarasu H, Vishalli D, Dheen ST, Bay BH, Kumar Srinivasan D. Nanoparticle-based therapeutic approach for diabetic wound healing. Vol. 10, *Nanomaterials*. 2020.
54. Ahangar P, Mills SJ, Cowin AJ. Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–15.
55. Habtemariam S. Pathophysiology of type 2 diabetes complications. In: *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*. 2019.
56. Ilmiah Kesehatan Sandi Husada J, Utia Detty A, Fitriyani N, Prasetya T, Florentina B. Karakteristik Ulkus Diabetikum Pada Penderita Diabetes Melitus The Characteristics of Diabetic Ulcer in Patients with Diabetes Mellitus. Juni [Internet]. 2020;11(1):258–64. Available from: <https://akper-sandikarsa.e-journal.id/JIKSH>
57. Anas I, Kurniawaty E, Anisa Nuraisa Jausal | Peran Sel Punca Mesenkimal dalam Penyembuhan Luka pada Ulkus Kaki Diabetik Majority | Volume 8 | Nomor 2 | Desember. 2019.
58. Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. Vol. 25, *Journal of Tissue Viability*. 2016.
59. Monteiro-Soares M, Boyko EJ, Jeffcoate W, Mills JL, Russell D, Morbach S, et al. Diabetic foot ulcer classifications: A critical review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020;36(S1).
60. Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. Vol. 25, *Journal of Tissue Viability*. Tissue Viability Society; 2016. p. 229–36.

61. Wang CJ, Ko JY, Kuo YR, Yang YJ. Molecular changes in diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(1).
62. Blakytyn R, Jude EB. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds.* 2009;8(2).
63. Syauta D, Mulawardi, Prihantono, Hendarto J, Mariana N, Sulmiati, et al. Risk factors affecting the degree of diabetic foot ulcers according to Wagner classification in diabetic foot patients. *Medicina Clinica Practica.* 2021;4.
64. Ansari P, Akther S, Khan JT, Islam SS, Masud MSR, Rahman A, et al. Hyperglycaemia-Linked Diabetic Foot Complications and Their Management Using Conventional and Alternative Therapies. Vol. 12, *Applied Sciences (Switzerland).* MDPI; 2022.
65. An T, Chen Y, Tu Y, Lin P. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Application and Challenges. Vol. 17, *Stem Cell Reviews and Reports.* 2021.
66. Lopes L, Setia O, Aurshina A, Liu S, Hu H, Isaji T, et al. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: A review of preclinical and clinical research. Vol. 9, *Stem Cell Research and Therapy.* 2018.
67. Qi M, Zhou Q, Zeng W, Wu L, Zhao S, Chen W, et al. Growth factors in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. *Frontiers in Bioscience - Landmark.* 2018;23(2).
68. Wechsler ME, Rao V v., Borelli AN, Anseth KS. Engineering the MSC Secretome: A Hydrogel Focused Approach. Vol. 10, *Advanced Healthcare Materials.* 2021.
69. Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. Vol. 28, *Tissue engineering. Part B, Reviews.* 2022.
70. Zheng Q, Zhang S, Guo WZ, Li XK. The Unique Immunomodulatory Properties of MSC-Derived Exosomes in Organ Transplantation. Vol. 12, *Frontiers in Immunology.* 2021.
71. Witwer KW, van Balkom BWM, Bruno S, Choo A, Dominici M, Gimona M, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1).
72. Loughlin DT, Artlett CM. Modification of collagen by 3-deoxyglucosone alters wound healing through differential regulation of p38 MAP kinase. *PLoS One.* 2011;6(5).

73. Medicherla S, Wadsworth S, Cullen B, Silcock D, Ma JY, Mangadu R, et al. p38 MAPK inhibition reduces diabetes-induced impairment of wound healing. Vol. 2, Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2009.
74. Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, et al. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: The paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant*. 2011;20(5).
75. Bar-Or D, Thomas GW, Rael LT, Gersch ED, Rubinstein P, Brody E. Low Molecular Weight Fraction of Commercial Human Serum Albumin Induces Morphologic and Transcriptional Changes of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2015;4(8):945–55.
76. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, Amansyah F, Amansyah F, Berlian MA, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Research*. 2021;10:1–19.
77. Walter MR. The molecular basis of IL-10 function: From receptor structure to the onset of signaling. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2014;380(Icd):191–212.
78. Robert AW, Azevedo Gomes F, Rode MP, Marques da Silva M, Veleirinho MB da R, Maraschin M, et al. The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *J Tissue Eng*. 2019;10.
79. Li Y, Baccouche B, Olayinka O, Serikbaeva A, Kazlauskas A. The role of the Wnt pathway in VEGF/anti-VEGF-dependent control of the endothelial cell barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(12).
80. Zhao Z, Zhang X, Dai Y, Pan K, Deng Y, Meng Y, et al. PPAR- γ promotes p38 MAP kinase-mediated endothelial cell permeability through activating Sirt3. *BMC Neurol*. 2019 Nov 15;19(1).
81. Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Mol Oncol*. 2014;8(1).
82. Dai J, Shen J, Chai Y, Chen H. IL-1 β Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. *Mediators Inflamm*. 2021;2021.
83. Ryu CH, Park SA, Kim SM, Lim JY, Jeong CH, Jun JA, et al. Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal

cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jul;398(1):105–10.

84. Hendrawan S, Kusnadi Y, Lagonda CA, Fauza D, Lheman J, Budi E, et al. Wound healing potential of human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium: An in vitro and in vivo study in diabetes-induced rats. *Vet World.* 2021 Aug 1;14(8):2109–17.
85. Ibrahim R, Mndlovu H, Kumar P, Adeyemi SA, Choonara YE. Cell Secretome Strategies for Controlled Drug Delivery and Wound-Healing Applications. Vol. 14, *Polymers*. MDPI; 2022.
86. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010 Dec;28(12):2229–38.
87. Silva J Da, Leal EC, Carvalho E. Bioactive antimicrobial peptides as therapeutic agents for infected diabetic foot ulcers. Vol. 11, *Biomolecules*. 2021.

