

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MSCs*  
TERHADAP EKSPRESI PROTEIN CD68 DAN CD163  
( Studi Eksperimental *In Vivo* pada Polarisasi Sel Makrofag Tikus  
Jantan Galur Wistar Model DM Tipe 1 )**

**Tesis**

Untuk Memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



**Magister Ilmu Biomedik**

**A`AN HARIES PRANOWO**

**MBK 19.14.01.0148**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG  
2022**

**TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM HYPOXIA MSCs TERHADAP  
EKSPRESI PROTEIN CD68 DAN CD163  
Studi Eksperimental In Vivo pada Polarisasi Sel Makrofag Tikus Jantan  
Galur Wistar Model DM tipe 1**

Disusun oleh

**A'an Haries Pranowo**

**MBK 1914010148**

akan dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal Juli 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Menyetujui,  
Pembimbing

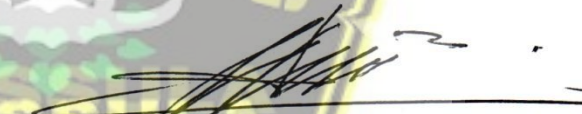
Telah disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II



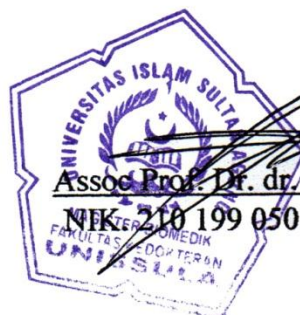
Dr.dr. Danis Pertiwi, M.Si.Med.Sp.PK  
NIK. 210199051



Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med  
NIK. 210 199 050

Mengetahui,

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



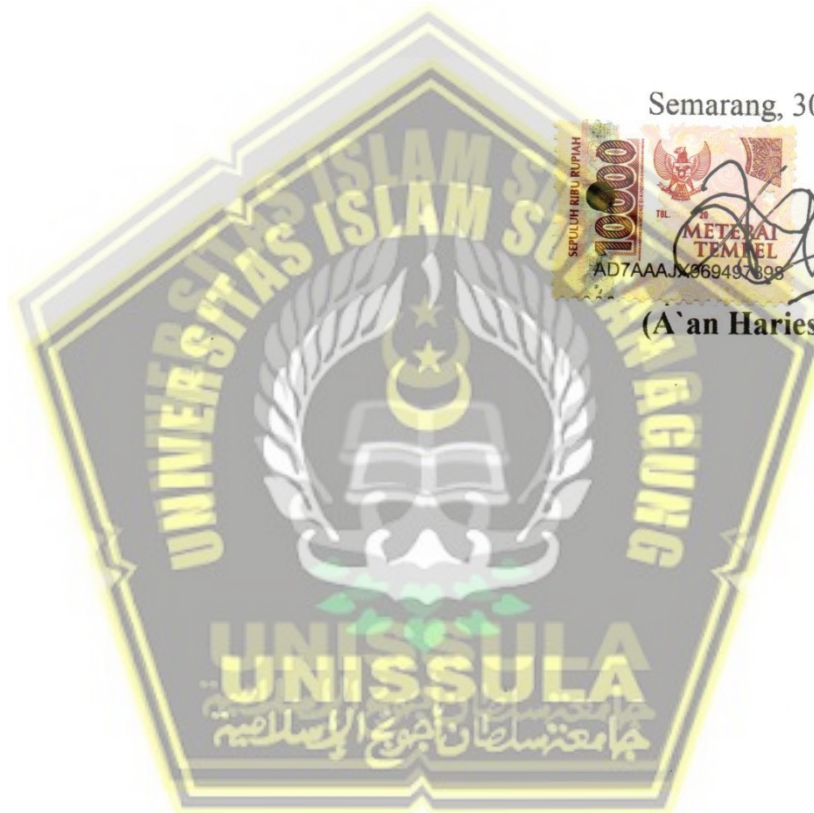
## PERNYATAAN

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

Semarang, 30 Juni 2022



(A'an Haries Pranowo)



## RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas Diri

Nama : A`an Haries Pranowo  
Tempat / tanggal lahir : Tolitoli, 20 Desember 1994  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Laki-laki

### B. Riwayat Pendidikan Formal

1. TK Kamala Bhayangkari : Lulus tahun 2000
2. SDN Pembina Tolitoli : Lulus tahun 2006
3. SMP Negeri 1 Tolitoli : Lulus tahun 2009
4. SMA Negeri 1 Tolitoli : Lulus tahun 2012
5. S1 Kedokteran Umum UNISSULA : Lulus tahun 2018
6. Profesi Dokter FK UNISSULA : Sumpah Dokter 2020
7. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019- sekarang

### C. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua  
Ibu : Hj. Mastia. M. Basiman, S.Pd  
Ayah : Kumpul (Purn) Suwandi B Gimam  
Nama Saudara Kandung  
Saudara 1 : Meffy Sulistyowati S.Farm.Apt  
Saudara 2 : Dwi Rekno Indarwati, SST

## KATA PENGANTAR

*Assalamua'laikum warohmatullahi wabarakatuh*

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa, atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga tesis dengan judul “Pengaruh Pemberian Sekretom Hypoxia MSC terhadap Ekspresi Protein CD68 dan CD163” ini dapat diselesaikan.

Proposal tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada :

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. Gunarto SH, MHum.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH dan juga sebagai dosen penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med dan juga sebagai dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis

4. Ibu Dr. dr. Hj. Danis Pertiwi, M.Si.Med, Sp.PK selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis
5. Ibu Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
6. Ibu Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
8. Kedua Orangtua KOMPOL(Purn), Suwandi dan Hj. Mastia M Basiman, S.Pd serta saudari penulis yang selalu menghaturkan doa dan memberi dukungan.
9. Teman dan rekan yang selalu memberikan semangat, motivasi, perhatian dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
10. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

*Wassalammua 'laikum warohmatullahi wabarakatuh*

Semarang, 30 Juni 2022



**A'an Haries Pranowo**



## ABSTRAK

### PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM HYPOXIA MSCs TERHADAP EKSPRESI PROTEIN CD68 DAN CD163

(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Polarisasi Sel Makrofag Tikus Jantan Galur Wistar Model DM tipe 1)

**Latar belakang** : Kondisi DMT1 terjadi akibat autoreaktif sel T sehingga menimbulkan aktivasi makrofag proinflamasi M1 dan penurunan makrofag anti-inflamasi M2 yang memperparah kerusakan sel  $\beta$  pankreas. Perkembangan terapi Sekretom Hipoksia *Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) berperan dalam meregenerasi sel islet dan perbaikan fungsi jaringan pankreas yang rusak. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap polarisasi sel makrofag melalui ekspresi CD68 sebagai marker makrofag M1 dan CD163 sebagai marker makrofag M2 pada tikus model DMT1.

**Metode** : Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 5 ekor tikus putih galur *Wistar* yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat (tidak diberi perlakuan), kelompok kontrol negatif, dan 2 kelompok perlakuan pemberian SH-MSCs dosis 0.5 cc pada kelompok P1 dan 1 cc pada kelompok P2. Pengkondisian DMT1 pada kelompok tikus kontrol negatif, P1 dan P2 menggunakan induksi STZ 60mg/KgBB. Data kemudian diuji parametrik menggunakan SPSS 22.

**Hasil** : Rerata ekspresi CD68 kelompok tikus sehat  $3.06 \pm 0.35\%$ , kontrol negatif:  $21.67 \pm 0.93\%$ , P1:  $10.98 \pm 0.68\%$ , P2:  $5.85 \pm 0.55\%$ , sedangkan rerata ekspresi CD163 kelompok tikus sehat:  $22.83 \pm 0.51\%$ , kelompok kontrol negatif:  $3.56 \pm 0.50\%$ , P1:  $15.81 \pm 1.80\%$ , P2:  $20.80 \pm 2.24\%$ . Pada uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil  $p > 0,05$ . Hasil uji Anova  $p < 0,05$ . Hasil uji *Post Hoc LSD*  $p < 0,05$

**Kesimpulan** : SH-MSCS terbukti bermakna dalam menurunkan CD68 dan meningkatkan ekspresi CD163 pada tikus model DMT1

**Kata kunci** : CD68, CD163, Makrofag M1, Makrofag M2, DMT1



## **ABSTRACT**

### **THE EFFECT OF HYPOXIC MSCs SECRETOME ON THE EXPRESSION OF CD68 AND CD163 PROTEIN**

(*In vivo* experimental study on the macrophage cell polarization of DMT1 male Wistar rats)

**Background:** DMT1 occurs due to autoreactivity of T cells, causing activation of proinflammatory M1 macrophages and a decrease in anti-inflammatory macrophages M2 which exacerbates pancreatic cell damage. The development of Secretome Hypoxic Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) therapy plays a role in regenerating islet cells and repairing the function of damaged pancreatic tissue. The purpose of this study was to determine the effect of administration of SH-MSCs on macrophage cell polarization through the expression of CD68 as a marker of M1 macrophages and CD163 as a marker of M2 macrophages in DMT1 rats.

**Metode :** Sample of this study were 5 white Wistar strain rats which divided into 4 groups, namely the normal mouse group (no treatment), negative control group, and 2 treatment groups with 0.5 cc of SH-MSCs in the P1 group and 1 cc in the P2 group. DMT1 conditioning in the group of negative control rats, P1 and P2 using STZ 60mg/KgBB induction. The data were then tested parametrically using SPSS 22.

**Results:** The mean of CD68 expression in the normal mouse group was  $3.06 \pm 0.35\%$ , negative control:  $21.67 \pm 0.93\%$ , P1:  $10.98 \pm 0.68\%$ , P2:  $5.85 \pm 0.55\%$ , while the mean of CD163 expression in the normal mouse group:  $22.83 \pm 0.51\%$ , negative control group:  $3.56 \pm 0.50\%$ , P1:  $15.81 \pm 1.80\%$ , P2:  $20.80 \pm 2.24\%$ . The results of normality and homogeneity test were obtained  $p > 0.05$ . Anova test results  $p < 0.05$ . *Post Hoc LSD* test results  $p < 0.05$

**Conclusion:** SH-MSCS was shown to be significantly decrease CD68 and increase the CD163 expression in DMT1 rats.

**Keywords:** CD68, CD163, M1 macrophages, M2 macrophages, DMT1

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I 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.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Polarisasi Sel Makrofag Terkait Ekspresi Protein CD68 dan CD163.....	9
2.1.1. CD68 Sebagai Marker Makrofag M1.....	10
2.1.2. CD163 Sebagai Marker Makrofag M2.....	11
2.2. Sekretom <i>Mesenchymal Stem Cell</i> .....	12
2.2.1. Definisi.....	12
2.2.2. Komposisi.....	13
2.3. Hipoksia.....	13

2.4.	Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT1) .....	14
2.4.1.	Gambaran Umum DMT1 .....	14
2.4.2.	Patogenesis .....	15
2.4.3.	Terapi.....	16
2.5.	Streptozotosin (STZ).....	16
2.6.	Hubungan Pemberian SHMHC terhadap Polarisasi Makrofag .....	17
<b>BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....</b>		<b>19</b>
3.1.	Kerangka Teori .....	19
3.2.	Kerangka Konsep.....	21
3.3.	Hipotesis .....	21
<b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>		<b>22</b>
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	22
4.2.	Varibel dan Definisi Operasional.....	23
4.2.1.	Varibel Penelitian .....	23
4.2.2.	Definisi Operasional.....	23
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	24
4.3.1.	Subyek Penelitian .....	24
4.3.2.	Sampel Penelitian .....	24
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	25
4.3.4.	Besar Sampel.....	25
4.4.	Alat dan Bahan.....	26
4.4.1.	Alat .....	26
4.4.2.	Bahan.....	26
4.5.	Cara Penelitian .....	27
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i> .....	27
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> ... 27	
4.5.3.	Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i> .....	28
4.5.4.	Proses Hipoksia .....	29
4.5.5.	Pembuatan Tikus Model DMT1 <sup>53</sup> .....	30
4.5.6.	Terminasi dan pengambilan jaringan .....	32

4.5.7. Pembuatan <i>Slide</i> .....	33
4.5.8. Analisis ekspresi CD68 dan CD 163 .....	34
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian .....	36
4.6.1. Tempat Penelitian .....	36
4.6.2. Waktu Penelitian .....	36
4.7. Analisis Data .....	36
4.8. Alur Penelitian .....	37
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>38</b>
5.1. Hasil Penelitian .....	38
5.1.1. Isolasi Secretome Hipoksia <i>Mesenchymal Stem Cell</i> (SH- MSCs).....	38
5.1.2. Ekspresi CD68 pada Tikus Model DMT1 Setelah Pemberian SH-MSCs.....	40
5.1.3. Ekspresi CD163 pada Tikus Model DMT1 Setelah Pemberian SH-MSCs.....	44
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian .....	47
5.3. Keterbatasan Penelitian.....	53
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>55</b>
6.1. Kesimpulan .....	55
6.2. Saran .....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>56</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>64</b>

## DAFTAR SINGKATAN

AMSC	: <i>Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
CCL18	: <i>C-C Motif Chemokine Ligand 18</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
DMT1	: <i>Diabetes Mellitus Tipe 1</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic acid</i>
eNOS	: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
GAD65	: <i>Glutamic Acid Decarboxylase 65 Autoantibodies</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
hMSC	: <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
ICA	: <i>Islet Cell Antibody</i>
IDAI	: <i>Ikatan Dokter Anak Indonesia</i>
IDF	: <i>International Diabetes Federation</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon Gamma</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factors</i>
IHC	: <i>Immunochemistry</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IL-1RA	: <i>Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
iNOS	: <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRF5	: <i>Interferon Regulatory Factor 5</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KAD	: <i>Ketoacidosis Diabetikum</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
MCSF	: <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MHC	: <i>Major Hystocompatibility Complex</i>

NF-κB	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
NK cell	: <i>Natural Killer cell</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PPOK	: <i>Penyakit Paru Obstruksi Kronis</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SH-MSCs	: <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
SOCS3	: <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TFF	: <i>Tangential flow filtration</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TH cell	: <i>T Halper cell</i>
TLR4	: <i>Toll Like Reseptor 4</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZDF	: <i>Zucker diabetic fatty rats</i>
ZnT8	: <i>β-cell- specific zinc transporter 8 autoantibodies</i>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Proses Fagositosis.....	9
Gambar 3.1.	Kerangka Teori.....	20
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep .....	21
Gambar 4.1.	Gambar rancangan penelitian .....	22
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	37
Gambar 5.1.	Gambaran MSCs yg berdiferensiasi menjadi sel adiposit: Pengamatan mikroskop pembesaran 200x .....	39
Gambar 5.2.	Gambaran MSCs yang berdiferensiasi menjadi sel osteosit: Pengamatan mikroskop pembesaran 200x .....	39
Gambar 5.3.	Hasil luas MSCs yang tervalidasi dan pemeriksaan ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 menggunakan metode <i>flow</i> <i>cytometry</i> .....	40
Gambar 5.4.	Ekspresi CD68 Insulin pada kelompok; Tikus sehat : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol negatif : subyek induksi diabetes tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek induksi diabetes yang diberikan perlakuan injeksi IP sekretom <i>Hypoxia-MS</i> C 0,5 cc, P2 : subyek induksi diabetes yang diberi perlakuan injeksi IP sekretom <i>Hypoxia-MS</i> C 1 cc.....	44
Gambar 5.5.	Gambaran Histologi pankreas tikus yang mengekspresikan CD163 dengan pewarnaan HE pada pembesarn 40x; (A) preparat tikus sehat, (B) preparat kontrol negaif, (C) preparat P1 dan (D) preparat P2 .....	45
Gambar 5.6.	Ekspresi CD163 Insulin pada kelompok; tikus sehat : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol : subyek induksi diabetes tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek induksi diabetes yang diberikan perlakuan injeksi IP sekretom <i>Hypoxia-MS</i> C 0,5 cc, P2 : subyek induksi diabetes yang diberi perlakuan injeksi IP sekretom <i>Hypoxia-MS</i> C 1 cc.....	47

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian (2016-2021) .....	6
Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i> <sup>52</sup> .....	29
Tabel 5.1. Hasil Uji Normalitas, Homogenitas dan Uji <i>One-way Anova</i> terhadap Ekspresi Protein CD 68 antar kelompok .....	43
Tabel 5.2. Uji Post Hoc Ekspresi CD 68 .....	43
Tabel 5.3. Hasil uji Normalitas, Homogenitas dan uji <i>One-way Anova</i> terhadap Ekspresi Protein CD163 antar kelompok .....	46
Tabel 5.4. Uji <i>Post Hoc</i> Ekspresi CD 163.....	46





## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearens</i> .....	64
Lampiran 2.	Analisis Statistika.....	65
Lampiran 3.	Tabel Prosedur yang digunakan induksi STZ pada tikus.....	67
Lampiran 4.	Hasil Pengukuran GDS Tikus .....	68
Lampiran 5.	Dokumentasi Penelitian .....	69



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus tipe 1 (DMT1) adalah penyakit autoimun spesifik yang diperantarai sel T dimana terjadi destruksi sel  $\beta$  pankreas penghasil insulin yang mengakibatkan defisiensi insulin absolut. *International Diabetes Federation/ IDF* (2019) menyebutkan 90% DM pada anak dan remaja muda adalah DMT1.<sup>1</sup> Kasus DMT1 sering pada usia muda rentang usia 5-7 tahun.<sup>2</sup> Terapi insulin eksogen pada DMT1 kurang memuaskan karena meningkatkan kejadian hipoglikemia berat yang mengancam nyawa.<sup>3</sup> Pada DMT1 terjadi aktivasi makrofag proinflamasi M1 yang mensekresi sitokin dan kemokin inflamasi yang mengganggu sinyal insulin, sedangkan makrofag M2 merupakan makrofag utama (residen) dalam mencegah inflamasi.<sup>4</sup> Sekretom Hipoksia *Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) memiliki potensi besar dalam meregenerasi sel islet dan memperbaiki fungsi jaringan pankreas yang rusak.<sup>5</sup> Sejauh ini pembahasan terkait SH-MSCs hanya sebatas *self-renewal* sel, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut terkait pengaruh SH-MSCs terhadap polarisasi makrofag yang dilihat dari marker Makrofag M1 yaitu ekspresi CD68 dan marker Makrofag M2 yaitu CD163 pada perbaikan sel  $\beta$  pankreas.<sup>6</sup>

Prevalensi DMT1 sebanyak 5- 10 % dari total penderita DM di dunia. Hingga akhir 2018 tercatat 1220 kasus DMT1.<sup>2,7</sup> Terapi DMT1 membutuhkan waktu yang lama dan rentan terjadi komplikasi. Proses

pengobatan yang berkelanjutan dan berlangsung lama berdampak pada ketidak patuhan pasien yang berujung pada meningkatnya kejadian Ketoasidosis Diabetikum (KAD). KAD merupakan komplikasi akut DMT1 pada anak dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi.<sup>8</sup> Pengobatan alternatif lain seperti tranplantasi organ pankreas sering direkomendasikan tetapi memiliki risiko respon imun yang tidak diinginkan dan jumlah pendonor yang masih sedikit.<sup>9</sup> Pemanfaatan SH- MSCs sebagai terapi DMT1 memiliki potensi besar untuk dikembangkan. IDF 2017 menjelaskan sebanyak US\$850M dana yang dikeluarkan pertahun untuk perawatan DMT1.<sup>1</sup>

Makrofag adalah komponen imun bawaan yang bertindak sebagai pertahanan awal melawan patogen dalam tubuh, dibagi menjadi dua yaitu makrofag M1 (M1) yang diaktivasi secara klasik dan makrofag M2 (M2) yang diaktivasi secara alternatif. SH-MSCs bekerja dalam perubahan pola ekspresi sitokin dari Makrofag M1 pro-inflamasi (seperti TNF- $\alpha$  dan IL-2) menjadi Makrofag M2 anti-inflamasi.<sup>5,10</sup> Keterlibatan *growth factor* PDGF yang merupakan molekul SH-MSCs yang berperan sebagai immunomodulator yang menekan aktivitas autoimun dengan cara menghentikan produksi *self-antibody* yang menyerang sel  $\beta$  pankreas. Suski(2020) menjelaskan manfaat pemberian proteom dan sekretom makrofag THP-1 dapat menurunkan respons M1.<sup>11</sup> Sekretom merupakan bio-aktif yang terdiri dari IL-10, IGF-1 dan VEGF yang dapat melindungi sel  $\beta$  pankreas dan membantu merangsang regenerasi sel islet lainnya.<sup>12</sup>

Beberapa penelitian telah membahas manfaat sekretom dalam meningkatkan viabilitas sel, proliferasi sel, migrasi sel serta penurunan inflamasi sel pada berbagai penyakit autoimun. Penelitian *Shiddiq 2017* membahas terkait manfaat sekretom dalam menurunkan ekspresi IL-17, TNF-  $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang berperan pada pathogenesis penyakit autoimun, seperti pada *Systemic Lupus Erythematosus (SLE)*.<sup>14</sup> Studi terbaru menjelaskan SH-MSCs memicu proliferasi dan angiogenesis pada sel  $\beta$  pankreas DMT1.<sup>15</sup> Proses prakondisi Hipoksia MSCs (oksigen 1%) dapat menghambat proses *senescence* sehingga meningkatkan *survival stem cells* setelah ditransplantasikan.<sup>16</sup> Aktivitas parakrin dari sekretom dapat meregulasi kadar glukosa darah melalui persinyalan molekul anti-inflamasi, anti-apoptosis, dan sitoprotektif.<sup>17</sup>

Studi terkait peran SH-MSCs dalam memodulasi sistem imun terutama sel makrofag pada DMT1 belum pernah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut maka diperlukan upaya penelitian terhadap pengaruh SH-MSCs terhadap polarisasi makrofag yang dilihat dari ekspresi CD68 sebagai marker makrofag M1 dan CD163 sebagai marker makrofag M2 pada tikus model DMT1 yang diinduksi dengan streptozotocin (STZ). Penggunaan tikus galur Wistar sebagai obyek penelitian dikarenakan rentang hidup yang panjang, mudah diperoleh dan proses perawatan, pertumbuhan dan fertilitas yang cepat serta memiliki kemampuan metabolik yang cepat, hal ini sangat baik dipergunakan dalam penelitian eksperimental yang berhubungan dengan proses metabolisme tubuh.<sup>18</sup>

## **1.2. Rumusan Masalah**

Apakah pengaruh sekretom *Hypoxia MSCs* terhadap polarisasi sel makrofag melalui ekspresi protrin CD68 dan CD163 pada tikus model DM tipe 1?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap polarisasi sel makrofag melalui ekspresi protein CD68 dan CD163 pada tikus model DM tipe 1.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1.3.2.1. Mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs dosis 0.5 cc dan 1 cc intra peritoneal terhadap ekspresi protein CD68 pada tikus model DMT1 yang dibandingkan dengan kontrol

1.3.2.2. Mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs dosis 0.5 cc dan 1 cc intra peritoneal terhadap ekspresi protein CD163 pada tikus DMT1 yang dibandingkan dengan kontrol

## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Manfaat Teoritis**

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan SH-MSCs terhadap polarisasi sel makrofag melalui penurunan ekspresi protein CD68 dan peningkatan ekspresi protein CD163 pada tikus model DMT1.

#### 1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi dan acuan bagi pihak yang berkepentingan mengenai penelitian secara in vivo tentang pengaruh SH-MSCs terhadap polarisasi sel makrofag melalui penurunan ekspresi protein CD68 dan peningkatan ekspresi protein CD163 pada tikus model DMT1.



## 1.5. Originalitas Penelitian

**Tabel 1.1. Originalitas Penelitian (2016-2021)**

Peneliti,Tahun	Judul	Metode	Hasil
Kalil Alves de Lima, Gislane L. V. de Oliveira, Juliana Navarro Ueda Yaochite, Daiel Guariz Pinheiro, 2016(De Lima et al., 2016)	Transcriptional profiling reveals intrinsic mRNA alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients	Eksperimental, pasien	MSCs dari <i>bone marrow</i> meregulasi molekul imunomodulator seperti VCAM-1, CXCL 12, HGF, CCL2, serta mengaktifasi jalur JAK-STAT pada pasien DMT1.
Jonathan Ribor, Guavri Caliaperoumal, Joseph Paquet, Catherine Boisson-Vidal, Herve Petite, Fani Anagnostou, 2017(Ribot et al., 2017)	Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties	In Vitro, Eksperimental	Secretom MSCs memiliki efek angiogenik pada sel <i>Zucker diabetic fatty rats</i> (ZDF) DMT2.
Katarzyna Kornicka, Jenny Houston, Krzysztof Marycz, 2018(Kornicka et al., 2018)	Dysfunction of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetic Patients as Result of Oxidative Stress and Autophagy may Limit Their Potential Therapeutic Use	Eksperimental, pasien	Pemberian MSCs dapat menurunkan produksi ROS pada pasien DMT2.
Songyan Yu, Yu Cheng, Linxi Zhang, Yaqi Yin, Jing Xue, Bing Li, Zhengyuan Gong, Jieqing	Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic	In vivo, Eksperimental	Pemberian MSCs menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6, IL-1 $\beta$ , dan TNF- $\alpha$ serta meningkatkan

Gao, Yiming Mu, 2019(Yu et al., 2019)	effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats		ekspresi IL-10 pada tikus model DMT2.
Isabella Dias, Daphne Pinheiro, karina Ribeiro Silva, Ana Carolina Stumbo, Alessandra Thole, Erika Cortez, Lais de Carvalho, Simone Nunes Carvalho, 2021(Dias et al., 2021)	Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes	In Vivo, Eksperimental	<i>Conditioned medium</i> dari <i>adipose tissue-derived stem cells</i> terbukti menurunkan produksi insulin dan PDX-1 pada tikus model DMT1 diinduksi streptozocin.
Vivi Yustianingsih, 2018	Pengaruh pemberian <i>mesenchymal stem cell Hypoxia conditioned medium</i> (MSC-HCM) terhadap <i>Self-renewal</i> MSCs, yang ditandai ekspresi CD73 CD90 dan CD105	In Vitro, Eksperimental	MSC-HCM dapat digunakan kembali sebagai medium kultur yang sangat baik untuk MSCs, dimana dapat meningkatkan jumlah self-renewal dan meningkatkan ekspresi CD73, CD90, dan CD105.
Nadiar Dwi Nuarisa, I Gede Rurus Suryawan, Andrianto,2021	Pengaruh prakondisi hipoksia terhadap proses senescence sel pada kultur <i>adipose-derived mesenchymal stem cells</i> (AMSC)	In vitro, eksperimental menggunakan Human- AMSC	Prakondisi MSCs hipoksia menimbulkan efek penghambatan proses senescence pada AMSC atau memperpanjang rentang hidupnya.



Perbedaan penelitian ini dengan penelitian-penelitian terdahulu (tabel 1.1) adalah belum ada penelitian yang menggunakan SH-MSCs terhadap polarisasi sel makrofag melalui ekspresi protein CD 68 dan CD163 pada tikus model DMT1 yang di induksi STZ. Penelitian-penelitian terdahulu masih sebatas efek pemberian SH-MSCs dari sumber jaringan adiposa dan *bone marrow* yang dapat memperbaiki kondisi tikus DMT2 melalui perbaikan efek angiogenik pada sel *Zucker diabetic fatty rats* (ZDF), penurunan produksi ROS dan penurunan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6, IL-1 $\beta$ , dan TNF- $\alpha$  serta meningkatkan ekspresi IL-10. Pengkondisian *hypoksia* pada sel MSCs dapat berefek pada meningkatkan jumlah *self-renewal* dan penghambatan proses *senescence* pada AMSC yang baik dalam memperpanjang rentang hidup sel MSCs.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Polarisasi Sel Makrofag Terkait Ekspresi Protein CD68 dan CD163

Makrofag adalah komponen imun bawaan yang memodulasi proses homeostatik pada respon inflamasi dan bertindak sebagai pertahanan lini pertama melawan patogen dalam tubuh. Makrofag sangat dibutuhkan dalam imunitas *innate* dan *adaptive* dalam tubuh kita. Perannya sebagai sel fagosit didistribusikan keseluruh jaringan tubuh dalam bentuk matur dari monosit yang ada dalam vaskular.<sup>19</sup>



**Gambar 2.1.** Proses Fagositosis

Proses Fagositosis makrofag berperan dalam pertahanan terhadap bakteri, dimana reseptor permukaan sel mampu mengenali dan berikatan dengan komponen permukaan bakteri dan mensekresikan sitokin inflamasi.<sup>20</sup> Hasil akhir dari proses fagositosis adalah memori yang akan

dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) kepada limfosit. Proses ini diperlukan untuk inisiasi respons imun adaptif dari host. Proses ini diawali dengan sel makrofag mengelilingi sel bakteri, kemudian memakan dan menghancurkan antigen tersebut, proses ini merupakan bagian dari reaksi peradangan. Proses diferensiasi makrofag tergantung pada induksi sitokin yang diterimanya, umumnya dikategorikan menjadi dua himpunan bagian yaitu aktivasi secara klasik Makrofag M1 yang terekspresi pada marker CD68 dan aktivasi secara alternatif Makrofag M2 yang terekspresi pada marker CD163.<sup>19</sup>

#### **2.1.1. CD68 Sebagai Marker Makrofag M1**

Makrofag M1 dapat memproduksi sitokin pro-inflamsi, memiliki kemampuan bakteriosidal yang kuat dan mengupayakan resistensi terhadap patogen asing. Proses ini juga berdampak luas terhadap kerusakan jaringan sel. Aktivasi M1 diinisiasi oleh PAMPs, IFN- $\gamma$  yang dihasilkan oleh sel NK dan sel Th1, aktivasi Lipopolisakarida (LPS) bakteri dan stimulus dari *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) yang merangsang produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ , TNF, IL-12, IL-18 dan IL-23 sehingga membantu untuk mendorong respons inflamasi sel Th1 dan Th17 spesifik antigen.<sup>21</sup>

Pada sel M1 terjadi peningkatan ekspresi *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC II) sebagai penanda CD68 dan molekul kostimulator CD80 dan CD86. Kemampuan fagositosis M1 diinduksi oleh *inducible NO synthase* (iNOS) untuk memproduksi *nitric oxide* (NO).

Penggunaan arginin oleh sel M1 sebagai substrat untuk membentuk iNOS dan menghasilkan NO yang bersifat mikrobisidal.<sup>22</sup>

Sel Makrofag M1 mengatur ekspresi protein intraseluler yang disebut *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) yang mengaktifkan sintase oksida nitrat (NOS2 atau iNOS) yang dapat diinduksi menghasilkan NO.<sup>23</sup> Makrofag M1 memperburuk proses inflamasi yang dapat merugikan kesehatan. Ketika makrofag berada di bawah kondisi aktivasi klasik, mereka memulai mekanisme mikrobisidal dengan sintesis NO, pembatasan zat besi atau nutrisi untuk mikroorganisme dan *acidification* dari fagosom.<sup>24</sup> Penelitian Krausgruber, et.al, (2011) menjelaskan protein IRF5 adalah protein penting untuk membantu proses polarisasi makrofag M1. Rangsangan IFN- $\gamma$  dan aktivasi protein GM-CSF dapat menekan ekspresi IRF5 yang secara langsung mengaktifkan 20 gen spesifik M1 dan menghambat pengkodean 19 gen spesifik sitokin M2. Proses regulasi SOCS3 sangat penting dalam aktivasi sel makrofag M1 sehingga terjadi penurunan Il-10 yang kemudian mengarah ke polarisasi M1.<sup>20</sup>

### 2.1.2. CD163 Sebagai Marker Makrofag M2

Makrofag M2 bersifat anti-inflamasi yang diinduksi oleh infeksi jamur, infeksi cacing, komponen komplemen, sel apoptosis, hipersensitifitas kompleks imun, *macrophage colony stimulating factor* (MCSF), IL-4, IL-10, IL-13 dan TGF- $\beta$ . Aktivasi ini menyebabkan sekresi IL-10 dalam jumlah banyak dan IL-12 dalam

jumlah lebih sedikit. Proses ini juga berperan dalam perbaikan dan pembentukan jaringan terkait peradangan kronis dan mendukung pro-angiogenesis. Makrofag M2 menghasilkan beberapa sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan *interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1RA).<sup>21</sup> Fenotip makrofag M2 tidak efektif dalam presentasi antigen, meskipun terjadi peningkatan molekul MHC II. Proses Analisa makrofag M2 dapat dilihat dari munculnya marker CD163 yang berhubungan dengan proses anti-inflamasi.<sup>25</sup> Makrofag M2 menggunakan arginin sebagai substrat untuk arginase 1 (Arg1), kemudian mendegradasi arginine menjadi ornithine, yang merupakan prekursor untuk poliamin, prolin, dan kolagen yang dibutuhkan untuk proses perbaikan jaringan. Poliamin terlibat dalam pertumbuhan sel dan pembelahan sel, sedangkan prolin merupakan komponen utama dari kolagen. Oleh karena itu makrofag tipe ini lebih cenderung bersifat sebagai regulator dan pemulih daripada sebagai sel efektor.<sup>26</sup>

## 2.2. Sekretom *Mesenchymal Stem Cell*

### 2.2.1. Definisi

Sekretom merupakan sekret hasil pengembangan dari MSCs yang lebih praktis digunakan. Sekretom MSCs kaya akan faktor terlarut seperti sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan dan molekul imunomodulator. Molekul yang terkandung didalam sekretom MSCs

dapat memperbaiki jaringan yang rusak dengan merangsang dan mendorong pembentukan jaringan baru pada sel yang rusak.<sup>27.28</sup>

### 2.2.2. Komposisi

Komponen didalam sekretom MSCs telah diteliti untuk diidentifikasi molekul mana saja yang bermanfaat dan berpotensi besar memberikan efek terapeutik. Hal ini bertujuan sebagai substitusi dari terapi berbasis sel (MSCs) menjadi terapi tanpa sel untuk mencapai efek yang diharapkan. Molekul faktor utama yang terdeteksi dalam sekretom MSCs.<sup>29</sup>: BMP, CCL5/RANTES, EGF, FGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, ICAM, IDO, IGF, IL-10, IL-6, IL-8, LIF, MCP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, PDGF, PGE2, TGF- $\beta$ , TIMP-1, TIMP-2, VEGF.<sup>30</sup>

### 2.3. Pengkondisian Hipoksia MSCs

Tujuan prakondisi hipoksia pada molekul MSCs adalah untuk memperpanjang kelangsungan hidup MSCs dalam medium agar. Proses ini berupaya agar MSCs tetap memiliki efek regeneratif dan memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang bermanfaat dalam pelepasan sitokin-sitokin yang bermanfaat dari MSCs. MSCs dengan prekondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, *self renewal*, pergerakan dan perlekatan dari MSCs.<sup>31</sup>

## 2.4. Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT1)

### 2.4.1. Gambaran Umum DMT1

DMT1 adalah penyakit autoimun spesifik multifaktor yang diperantarai sel T dimana terjadi destruksi sel  $\beta$  pankreas penghasil insulin dan mengakibatkan defisiensi insulin absolut yang berpotensi besar menyebabkan morbiditas dan mortalitas pada usia muda.<sup>32,33</sup> Penyebab DMTI dipahami sebagai interaksi yang kompleks antara faktor lingkungan dan genom, mikrobioma, metabolisme, dan sistem kekebalan yang berkontribusi dalam proses autoimun sel  $\beta$  pankreas.<sup>34,35</sup> Faktor lingkungan dan mekanisme imunitas host dapat memperparah perkembangan penyakit ini dimasa depan.<sup>36</sup>

Peningkatan prevalensi penyakit DMT1 menurut data Ikatan Dokter Indonesia (IDAI) semakin meningkat, proporsi penderita perempuan jauh lebih banyak dibandingkan penderita laki-laki.<sup>7,38</sup> Penegakan diagnosis DM didasarkan pada tanda dan gejala yang disampaikan oleh pasien diikuti pemeriksaan gula darah sebagai gold standar diagnosis DM.<sup>39,40,41</sup> Perubahan lingkungan eksposur dikaitkan erat dengan peningkatan kejadian penyakit ini, termasuk diet bayi dan dewasa, kecukupan vitamin D, paparan virus diawal kehidupan yang menyebabkan kerusakan sel pulau *langerhans* (Contohnya: *enterovirus*), stress sel pada pasien obesitas dan penurunan mikrobia usus.<sup>7,42</sup>

#### 2.4.2. Patogenesis

Penyebab terjadinya DMT1 berhubungan dengan kerusakan 40 gen yang telah teridentifikasi berhubungan dengan penyakit ini. Gejala klinis biasanya muncul saat kerusakan sel pankreas mencapai >90%. Faktor turunan keluarga hanya sekitar 10%-15% yang mengidap penyakit serupa. Beberapa autoantibodi yang diduga sebagai pencetus kejadian DMT1 antara lain seperti; *Glutamic Acid Decarboxylase 65 autoantibodies (GAD65)*; *Tyrosine Phosphatase-like insulinoma antigen 2 (IA2)*; *Insulin Autoantibodies (IAA)*; dan  *$\beta$ -cell-specific zinc transporter 8 autoantibodies (ZnT8)*.<sup>7</sup>

Menurut *Genome-wide association (GWAS)* dan *candidate gene association studies* menjelaskan terkait penyakit DMT1 yang memiliki elemen gen yang dapat diturunkan. kejadian ini dapat dijelaskan melalui keterkaitan lokus region HLA, yaitu HLA kelas II, DQ dan lokus DR dan HLA kelas I pada kromosom 6p21 yang berperan 50% dalam penggarisan keturunan. *Single nucleotide polymorphisms (SNPs)* yang terdiri dari genetic insulin menyumbang 10% dari kecenderungan genetik DMT1. Penandaan genetic sedari dini sangat bagus untuk mendiagnosis cepat dan mempermudah penemuan kasus DMT1 di masyarakat.<sup>32</sup> Beberapa penyakit yang diduga juga berperan dalam patogenesis penyakit ini antara lain, kongenital rubella sindrom, infeksi human enterovirus dan proses diet yang salah. Konsumsi beberapa makanan seperti sereal terlalu



dini, susu sapi dan konsumsi vitamin D maternal juga berkontribusi dalam penyebab penyakit ini.<sup>1</sup>

### 2.4.3. Terapi

Tujuan pengobatan DMT1 adalah meningkatkan kualitas hidup pasien agar mencapai kontrol metabolik yang optimal, meminimalisir kejadian komplikasi jangka panjang serta membantu menguatkan psikologis anak dan keluarga dalam mengupayakan pengobatan pada penyakit ini. Sigap tanggap dalam terapi insulin dirangkum dalam 5 pilar tatalaksana DMT1, yaitu injeksi insulin; pemantauan gula darah rutin; nutrisi seimbang; aktivitas fisik dan edukasi kepada keluarga agar tercapai kondisi pasien yang lebih baik.<sup>32</sup>

### 2.5. Streptozotosin (STZ)

Streptozotosin (STZ) berasal dari *Streptomyces achromogenes* yang digunakan sebagai penginduksi hewan coba menjadi model DMT1.<sup>43</sup> STZ juga dimanfaatkan sebagai obat anti kanker tertentu pada sel Langerhans pankreas. Selain STZ pemberian senyawa aloksan juga dapat memicu kerusakan pada sel  $\beta$  pankreas, akan tetapi waktu paroh yang dimiliki aloksan adalah 1,5 menit pada pH 7,4 dan suhu 37<sup>0</sup> C dan sangat mudah teroksidasi. Pemanfaatan STZ lebih disukai dari aloksan dikarenakan tikus dapat mempertahankan hiperglikemia lebih lama, rentang dosisnya lebih lama dan tidak mudah teroksidasi.<sup>44,45</sup>

STZ bekerja pada proses pembentukan NO dan anion supraoksida lain yang berfungsi menghambat siklus krebs serta menurunkan penggunaan oksigen pada mitokondria dalam proses menghasilkan ATP. Proses ini mengakibatkan destruksi sel- $\beta$  Langerhans dimana STZ mempengaruhi semua fungsi, struktur dan tahapan pembelahan sel. STZ dapat menghasilkan radikal bebas yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan DNA pada sel. Proses kronis ini dapat merusak sel pankreas yang menghasilkan insulin sehingga terjadi defisit pengeluaran insulin oleh pankreas. Pemberian dosis induksi Streptozotocin yang dibutuhkan untuk menyebabkan DMT1 pada tikus adalah dosis letal yaitu 65 mg/kg BB secara intraperitoneal atau intravena. Tikus menunjukkan hiperglikemi pada pemeriksaan kadar gula darah serum dan plasma dalam rentang waktu sekitar 72 jam sampai 8 minggu paska penyuntikan STZ.<sup>43,45,71</sup>

## 2.6. Hubungan Pemberian SHMHC terhadap Polarisasi Makrofag

Proses *over-expression* pada sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  yang disekresi oleh makrofag M1 menyebabkan meningkatnya ROS pada sel  $\beta$  pankreas. Peningkatan ROS berdampak pada destruksi sel  $\beta$  yang mengakibatkan kerusakan hingga kematian sel  $\beta$  hewan pengerat dan manusia pada model eksperimental dari DMT1.<sup>46</sup> Pemberian MSCs yang mengandung *growth factor* dapat meningkatkan regenerasi sel  $\beta$  pankreas dan dapat menekan produksi ROS yang berlebihan. Pengkondisian MHC hipoksia merangsang pengeluaran molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator anti-inflamasi dan *growth factor* yang baik dalam

regenerasi sel  $\beta$  pankreas. SH-MSCs merangsang proliferasi sel dan angiogenesis endotel pembuluh darah.<sup>5,6</sup> Sekresi IL-10 oleh SH-MSCs dapat menekan produksi sitokin pro-inflamasi dan menghambat aktivasi sel T sehingga dapat memperbaiki kerusakan endotel pembuluh darah, pencegahan stress oksidatif dan proses inflamasi yang lama pada tikus model DMT1. Proses ini diperantarai melalui penurunan IL-6, TNF- $\alpha$ , ROS dan peningkatan eNOS.<sup>11</sup> SH-MSCs dapat merubah sitokin pro-inflamasi oleh makroafag M1 menjadi anti inflamasi makrofag M2. Proses ini dibantu oleh IL-10, IGF-1, VEGF dan mikrovesikel yang dapat memperbaiki sel  $\beta$  pankreas secara endogen dan merangsang regenerasinya. Secara keseluruhan SH-MSCs dapat memberikan perbaikan sekresi insulin pada sel islet yang sebelumnya rusak.<sup>12</sup>



## BAB III

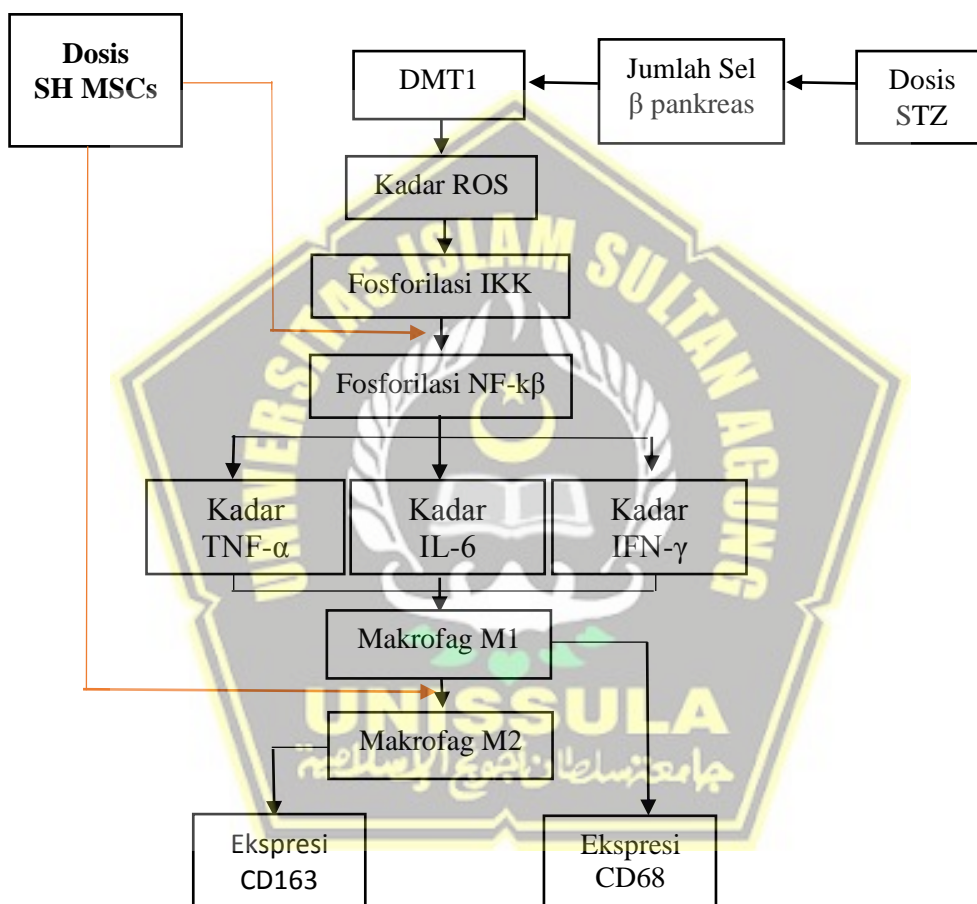
### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### 3.1. Kerangka Teori

STZ menginduksi ROS yang akan mengaktifkan jalur IKK/ NF- $\kappa$ B dan JNK/ AP-1 untuk menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ . Proses tersebut menyebabkan inflamasi yang berdampak terhadap kerusakan islet langerhans dan kematian pada sel  $\beta$  pankreas. Destruksi sel  $\beta$  pankreas mengakibatkan hambatan sekresi insulin hingga resistensi insulin yang menyebabkan pasien jatuh ke kondisi hiperglikemia. Disisi lain tingginya kadar ROS menyebabkan aktivasi sel imun naïve CD4+ yang dengan adanya sitokin IL-4 akan menginduksi ekspresi Th2, adanya TGF- $\beta$  akan menginduksi Treg, dan sitokin IL-13 akan mengekspresikan Th1.<sup>48</sup> Adanya Treg yang terhambat akan membentuk ketidak stabilan sistem imun yang merupakan penanda DMT1. Sistem imun yang tidak terkontrol menyebabkan induksi kematian sel  $\beta$  pankreas yang mengakibatkan sekresi insulin tidak keluar.<sup>49</sup>

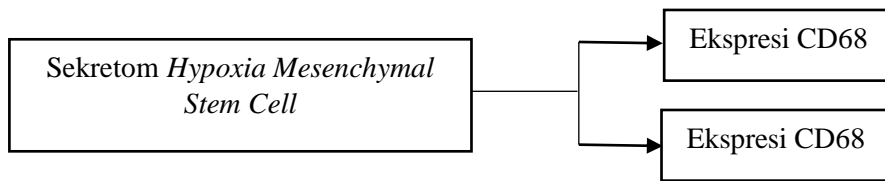
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. SH-MSCs akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal. Sitokin-sitokin dan mediator–mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, IL-6, IL-1, TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ ,  $\beta$ FGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, IGF-1, dan HGF yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem*

*cells* (SH-MSCs). Pada penelitian ini sekretom diberikan secara intra peritoneal pada tikus model DMT1. Pada penelitian *Suski,2020* menjelaskan hubungan pemberian proteom dan sekretom makrofag THP-1 yang mengalami penurunan respons M1 pro-inflamasi dilihat dari penghambatan dipeptidyl peptidases 8/9 dalam makrofag THP-1–proteomik kuantitatif.<sup>11</sup>



**Gambar 3.1.** Kerangka Teori

### 3.2. Kerangka Konsep



**Gambar 3.2.** Kerangka Konsep

### 3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap polarisasi sel makrofag melalui ekspresi protein CD68 dan CD163 pada tikus model DM tipe 1.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian true eksperimen, dengan menggunakan rancangan *Post test only Group Design* menggunakan tikus jantan galur wistar dengan bobot badan  $200 \text{ gr} \pm 10 \text{ gr}$  ( $cv = 5\%$ ).

Perlakuan terdiri dari:

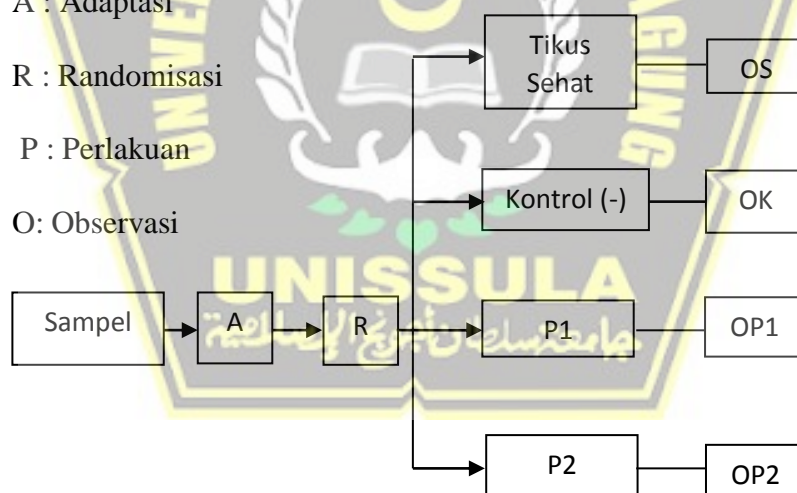
1. Kelompok: Tikus Sehat (tidak diberi perlakuan),
2. Kelompok: Kontrol negatif (diinduksi STZ tanpa pemberian SH-MSCs)
3. Kelompok: P1 (pemberian SH-MSCs secara ip dosis 0.5 cc)
4. Kelompok: P2 (pemberian SH-MSCs secara ip dosis 1 cc)

A : Adaptasi

R : Randomisasi

P : Perlakuan

O: Observasi



**Gambar 4.1.** Gambar rancangan penelitian

## 4.2. Varibel dan Definisi Operasional

### 4.2.1. Varibel Penelitian

#### 4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini *Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*.

#### 4.2.1.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi protein CD68 dan CD163.

### 4.2.2. Definisi Operasional

#### 4.2.2.1. Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*

SH-MSCs adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs secara hipoksia yang diinjeksikan secara intraperitoneal pada kelompok perlakuan dengan dosis 0.5 cc pada kelompok P1 dan 1 cc pada kelompok P2.<sup>50</sup> SH- MSCs diberikan pada hari ke 7, 14 dan 21.

Skala: Ordinal

#### 4.2.2.2. Ekspresi Protein CD68 dan CD163

Polarisasi sel makrofag dinilai dari ekspresi CD68 yang merupakan marker makrofag M1 dan CD163 yang merupakan marker makrofag M2 yang terdapat dalam organ pankreas tikus galur wistar yang diukur ekspresinya



menggunakan metode IHC dengan satuan pengukuran pg/ml.

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  $200 \text{ gr} \pm 10 \text{ gr}$  yang dipelihara di *Animal House Integrated Biomedical Laboratory*, 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. Usia tikus 2-3 bulan dengan Bobot  $200 \pm 10$  gram
2. Gerakan aktif
3. Kondisi sehat dan tidak terdapat cacat morfologi yang tampak

###### **4.3.2.2. Kriteria Eksklusi**

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

###### **4.3.2.3. Kriteria *Drop Out***

Tikus sakit atau mati selama penelitian.

### 4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *Randomized Sampling Allocation*. Tikus yang akan diberi perlakuan diadaptasi selama 5 hari. Tikus jantan galur wistar sebanyak 24 ekor yang masuk kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok secara acak sederhana, yaitu kelompok tikus sehat, kelompok kontrol negatif, kelompok P1 dan kelompok P2. Pada kelompok tikus sehat tidak diberikan perlakuan sama sekali sebagai pembanding antara tikus yang sakit dan yang sehat, kelompok kontrol negatif hanya diberikan NaCl sebagai ketetapan, sedangkan pada dua kelompok perlakuan diberi SH-MSCs selama 21 hari pada hari ke 7,14 dan 21.

### 4.3.4. Besar Sampel

Jumlah sampel berdasarkan besar sampel eksperimental dari Federer.<sup>51</sup>

$$\text{rumus Federer : } (t-1) (n-1) \geq 15$$

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$N \geq 6$$

Keterangan :

t : Banyaknya perlakuan

n : Banyaknya sampel setiap perlakuan

Sehingga jumlah sampel yang digunakan sebanyak 6 ekor per kelompok kemudian diambil secara acak, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat (tidak diberi perlakuan), kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Jumlah keseluruhan sampel mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor.

#### **4.4. Alat dan Bahan**

##### **4.4.1. Alat**

Penelitian ini menggunakan perlengkapan kultur sel yang terdiri dari; *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO<sub>2</sub>, *dissecting kit*, dan flask 75T. Kultur hipoksia dilakukan menggunakan prakondisi *hypoxic chamber*. Kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber* diukur menggunakan Oxygen meter. Penelitian ini juga menggunakan peralatan flebotomi untuk induksi STZ dan pemberian SH-MSCs yaitu spuit 3 ml, jarum suntik 23-G, alat ukur glukosa digital, kandang tikus, tabung mikrocentrifuge 1,5ml, sentrifugator, alat IHC yang digunakan untuk analisis ekspresi CD68 dan CD163.

##### **4.4.2. Bahan**

Bahan yang dipergunakan pada penelitian ini terdiri dari tali pusat tikus, NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alcohol 70%, PBS, Ketamin, Xylazine. Makanan

standard hewa pengerat (Harlan), Natrium sitrat 50 mM pH 4,5 (ezyme grade, Fisher), Streptozotocin (STZ, Sigma), dan sukrosa 10% (Sigma).

#### **4.5. Cara Penelitian**

##### **4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance***

*Ethical clearance* penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

##### **4.5.2. 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 dimasukkan ke dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. *Umbilical cord* diletakkan ke petri dish menggunakan pinset steril, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darahnya dibuang.
4. Cacah *Umbilical cord* hingga halus dan letakkan secara merata pada flask 25T dan didiamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.

5. Tambahkan secara perlahan Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Setiap 3 hari sekali dilakukan penggantian medium dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

#### 4.5.3. Prosedur Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BD<sup>TM</sup> accutase<sup>TM</sup> *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1x10<sup>7</sup> sel /ml di dalam BD Pharmingen<sup>TM</sup> Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS) *buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5x 10<sup>6</sup> sel/ml jika jumlah sel terbatas.
2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).

3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100  $\mu\text{l}$  sampel kedalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.

**Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*** <sup>52</sup>

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD29	5 $\mu\text{l}$
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD90	5 $\mu\text{l}$
3	T a CD45	5 $\mu\text{l}$
4		
5	e Kosong	-
6	1 hMSCs <i>positive isotype control cocktail</i>	20 $\mu\text{l}$
7	4 hMSCs <i>negative isotype control cocktail</i>	20 $\mu\text{l}$
7. s	4 hMSCs <i>positive cocktail</i>	20 $\mu\text{l}$
	7 PE hMSCs <i>negative cocktail</i>	20 $\mu\text{l}$

sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 $\mu\text{l}$  *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).

8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* ( sebagai kompensasi).

#### 4.5.4. Prosedur Hipoksia

1. MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah terisi MSCs kemudian diletakan ke dalam hypoxic chamber.

3. Alirkan gas nitrogen melalui katup inlet dan ukur konsentrasi oksigen di dalam chamber menggunakan oxygen meter yang ditempatkan pada lubang sensor
4. Tambahkan nitrogen hingga jarum indicator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFT untuk mendapatkan HypMSC-Scr yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis P1 dan P2.

#### **4.5.5. Prosedur Pembuatan Tikus Model DMT1**

1. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dimasukkan dalam satu kandang, dimana berisi dua sampai lima tikus jantan dan dikondisikan pada suhu  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dan kelembaban  $55\% \pm 5\%$ , dengan siklus terang-gelap selama 12 jam (cahaya pada jam 8:00 dan mati pada pukul 20:00) Beri tikus akses menuju makanan dan air secara bebas.
2. Timbang semua tikus secara akurat. Sebar hewan secara acak menjadi kelompok control dan kelompok perlakuan dalam jumlah yang sama untuk setiap kelompok.
3. Pada percobaan hari 1, puasakan semua tikus selama 6 sampai 8 jam sebelum perlakuan STZ. Berikan minum seperti biasa.

4. Siapkan buffer natrium sitrat 50 mM (pH 4,5). Tempatkan 1 ml buffer ke dalam masing-masing tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tutup tabung dengan aluminium foil.
5. Segera sebelum injeksi, larutkan STZ dalam 50 mM buffer natrium sitrat (pH 4,5) hingga konsentrasi akhir 10 mg / ml. Larutan STZ harus disiapkan secara baru untuk setiap injeksi dan diinjeksikan dalam 5 menit setelah larut.
6. Menggunakan spuit 3-ml dan jarum 23-G, injeksi larutan STZ secara intraperitoneal pada 60 mg/kg untuk kelompok perlakuan. Masukkan buffer sitrat dengan volume yang sama (pH 4,5) secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol.
7. Kembalikan tikus ke kandangnya. Berikan makanan seperti biasa dan air sukrosa 10%.
8. Pada hari percobaan ke-2, ganti air sukrosa 10% menjadi air biasa
9. Untuk penelitian yang melibatkan DMT1 tahap awal: Pada hari percobaan ke-3, puasakan semua tikus selama 6 sampai 8 jam. Uji kadar glukosa darah dari sampel vena di ekor menggunakan alat cek kadar gula digital. Jika hewan diabetes digunakan untuk menilai mekanisme tahap awal DMT1 atau untuk skrining senyawa untuk pengobatan diabetes tahap awal, model divalidasi untuk studi lebih lanjut ketika hiperglikemia ditemukan pada tikus yang diinjeksi STZ (yaitu, kadar glukosa



darah >200 mg / dl dan / atau secara statistik lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kontrol). Biasanya penentuan kadar glukosa darah cukup untuk mendiagnosis diabetes, sehingga tidak perlu dilakukan pengukuran kadar insulin.

10. Kadar glukosa puasa untuk hiperglikemia ringan harus >200 mg / dl dan / atau menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik pada tikus yang disuntik STZ dibandingkan dengan tikus kontrol.
11. Pada minggu ke-3, sebagian besar tikus yang diinjeksi STZ mengalami diabetes berat dengan tingkat glukosa darah biasanya > 250 sampai 600 mg / dl.
12. Rawat kelompok hewan seperti yang dijelaskan pada langkah 3 sampai 9 untuk membentuk status diabetes dan kemudian obati hewan dengan terapi restoratif potensial. Sertakan kelompok yang menerima suntikan *vehicle* yang sesuai sebagai kontrol.
13. Tikus DMT1 yang telah terkonfirmasi menderita DMT1 dilakukn treatment menggunakan SH-MSCs 0.5 cc dan P2 SH-MSCs 1 cc. Tikus sehat tidak di berikan treatmen apapun, sedangkan tikus kontrol negatif diberikan perlakuan STZ 60 mg/KgBB.<sup>53</sup>

#### **4.5.6. Prosedur Terminasi dan pengambilan jaringan**

1. Sampel tikus dikumpulkan sesuai dengan kelompok .

2. Terminasi tikus dengan menggunakan cocktail dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Xylazine 10 mg/kgBB dan Acepromazine 2 mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuskular.
3. Setelah tikus meninggal, dilakukan koleksi organ pankreas kemudian disimpan
4. cryotube yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

#### 4.5.7. Prosedur Pembuatan Slide

1. Slide sampel yang di didiamkan dalam kulkas bersuhu 4 °C kemudian dikeluarkan dan didiamkan pada suhu ruang selama ±30 menit.
2. Rendam sampel dalam xylene 1,2 dan 3 masing masing selama 5 menit
3. Celupkan slide sampel pada rak staining logam kedalam etanol absolut 1, absolut 2, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 70% masing masing selama 3 menit
4. Cuci pada air mengalir selama 5 menit
5. Rendam aquades selama 5 menit
6. Rendam slide dalam citrate buffer 1x pH 6,5 dan masukkan dalam Decloaking Chamber (Biogear) selama 30 menit pada suhu 90°C

7. Keluarkan *glass jar* dari *microwave* dan diamkan hingga mencapai suhu ruang ( $\pm 30$  menit)
8. *Cuci* dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali
9. *Slide* dilakukan *blocking peroksidase* endogen dengan  $H_2O_2$  selama 5 menit
10. *Cuci* dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali
11. *Slide* dilakukan *blocking background* dengan meneteskan larutan *Background Sniper* (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) pada jaringan per *slide* dan diinkubasi selama 20 menit.
12. Keringkan *slide* dengan menggunakan tisu pada permukaan bawah dan sekitar jaringan tanpa merusak jaringan
13. Tambahkan *first Antibody* sebanyak 70-100  $\mu L$  antibodi anti- $\alpha$ SMA (Dako; Carpinteria, CA),
14. Tutup *humidity chamber* dan simpan di dalam kulkas 4  $^{\circ}C$  *overnight*

#### 4.5.8. Prosedur Analisis Ekspresi CD68 dan CD 163

1. Ekspresi Makrofag M1 dan M2 dilihat dari ekspresi CD68 untuk marker makrofag M1 dan CD163 untuk marker makrofag M2 dianalisis menggunakan Imunohisto Kimia (IHC).
2. Jaringan blok parafin dipotong dengan ketebalan 3 mikron. Letakkan di atas object glass Poly L Lysin.

3. Letakkan object glass di inkubator suhu 45 derajat celcius, biarkan semalam.
4. Diparafinasi
5. Cuci dengan air kran mengalir, cuci dengan aquadest.
6. Inkubasi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 15 menit.
7. Cuci dengan air kran mengalir. Cuci dengan aquades.
8. Dinginkan kurang lebih selama 30 menit.
9. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
10. Inkubasi dengan antibody primer CD68 dan CD163, biarkan selama 1jam. (1:100).
11. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
12. Inkubasi dengan antibodi sekunder atau trekkie universal link selama 20 menit.
13. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
14. Inkubasi dengan trekkie avidin HRP selama 10 menit.
15. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
16. Teteskan cromogen DAB (1:50), biarkan selama 2 menit.
17. Cuci air
18. Counterstain dengan Hematoxylin Mayer selama 2 menit
19. Cuci air
20. Celupkan ke alkohol bertingkat 70%, 96%, 100%, xylol
21. Mounting

22. Data imunohistokimia dianalisis. Cara perhitungan ekspresi CD68 dan CD163 adalah melalui pengamatan sitoplasma epitel sel. Dihitung sel yang positif berwarna coklat dalam persentase.

#### **4.6. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **4.6.1. Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL), Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang.

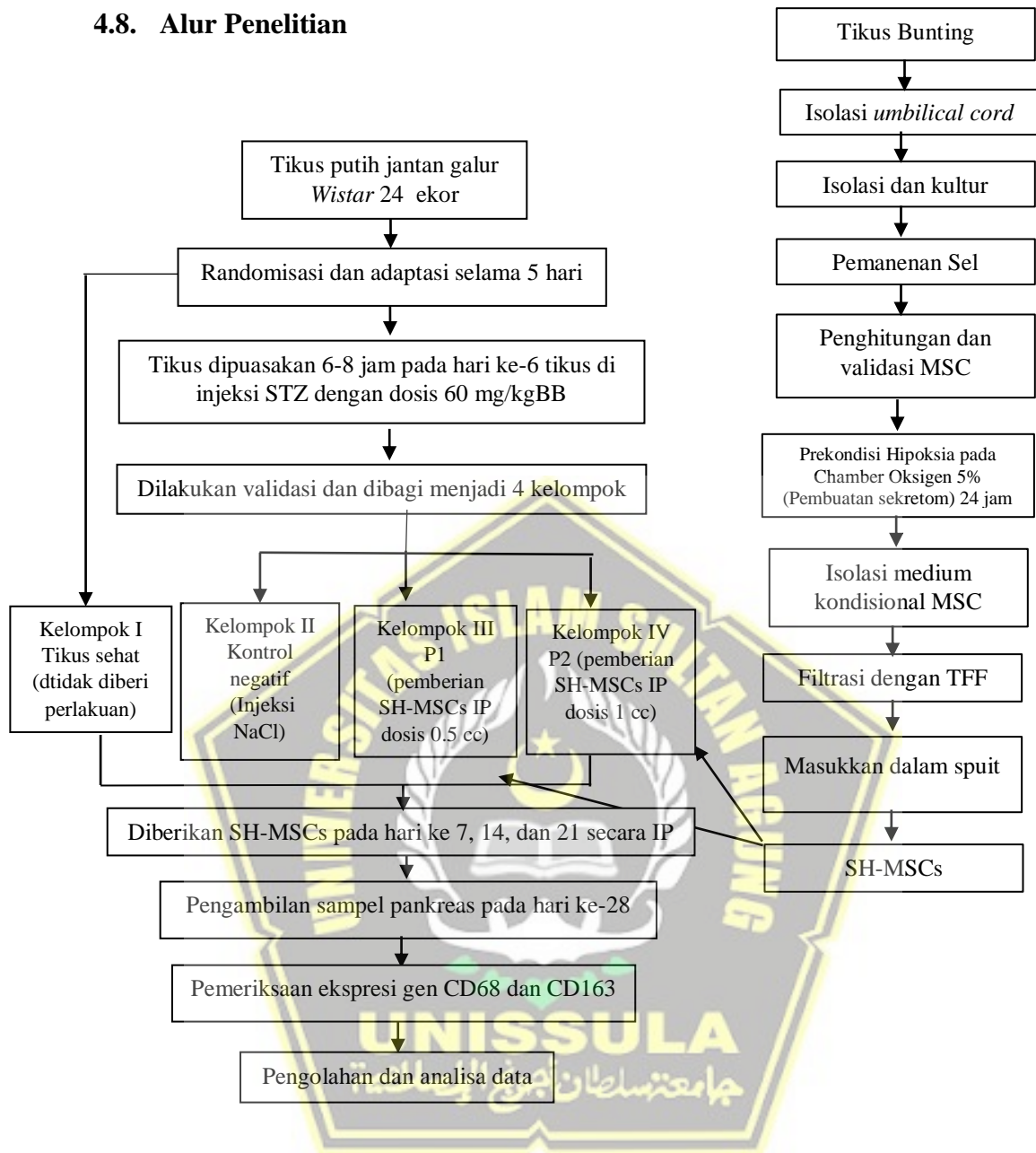
##### **4.6.2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan februari- maret 2022.

#### **4.7. Analisis Data**

Data yang telah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Karena data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji homogenitas *Lavene test*. Data yang homogen dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ) yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD*. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 22.0 for Windows.

#### 4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

## BAB V

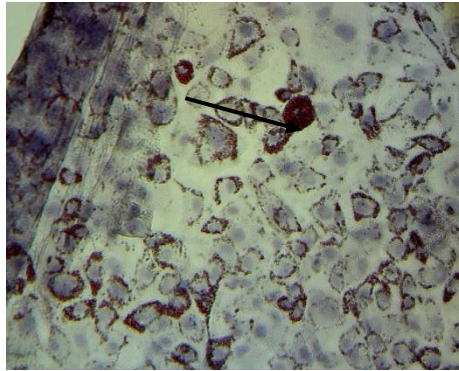
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari 2022 hingga Maret 2022. Selama penelitian berlangsung, sebanyak 6 ekor tikus mengalami *dropout* karena mati, yaitu 3 ekor pada kelompok kontrol negatif, 2 ekor pada kelompok P1, 1 ekor pada kelompok P2 dan tidak ditemukan tikus yang mati pada kelompok tikus sehat. Peningkatan hasil pengukuran GDS tikus pada kelompok kontrol negatif, kelompok P1 dan kelompok P2 setelah penyuntikan STZ diminggu pertama. Pemberian SH-MSCs dilakukan pada hari ke 7, 14 dan 21 setelah penyuntikan STZ.

#### 5.1. Hasil Penelitian

##### 5.1.1. Isolasi Secretome Hipoksia *Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSCs)

Hasil kultur MSC diamati secara mikroskopis, didapatkan gambar sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell*. Setelah 14 hari, tampak disposisi lemak yang berwarna merah menggunakan pewarnaan *oil red O* (Gambar 5.1). Hal ini menandakan MSCs dapat berdiferensiasi menjadi sel adiposit. Pewarnaan menggunakan *Alizarin red dye*, membuat MSCs tampak berwarna merah yang menunjukkan terjadi endapan kalsium. Hal ini menandakan MSCs dapat berdiferensiasi menjadi sel osteosit. (Gambar 5.2).<sup>54</sup>



**Gambar 5.1.** Gambaran MSCs yg berdiferensiasi menjadi sel adiposit: Pengamatan mikroskop pembesaran 200x

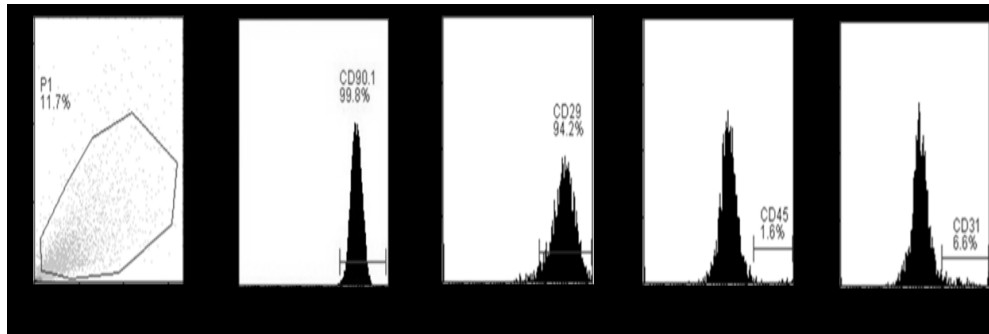


**Gambar 5.2.** Gambaran MSCs yang berdiferensiasi menjadi sel osteosit: Pengamatan mikroskop pembesaran 200x

Hasil isolasi MSCs juga divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk mengetahui kemampuan MSC dalam mengekspresikan beberapa *surface marker*.<sup>55</sup> MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99,80%), CD29 (94,20%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%) (Gambar 5.2). Hasil validasi tersebut memenuhi syarat *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) bahwa MSCs diantaranya harus mengekspresikan *Cluster of Differentiation* 105, 73, 90 (CD105, CD73 dan CD90) dan tidak memiliki CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79a atau CD19, dan



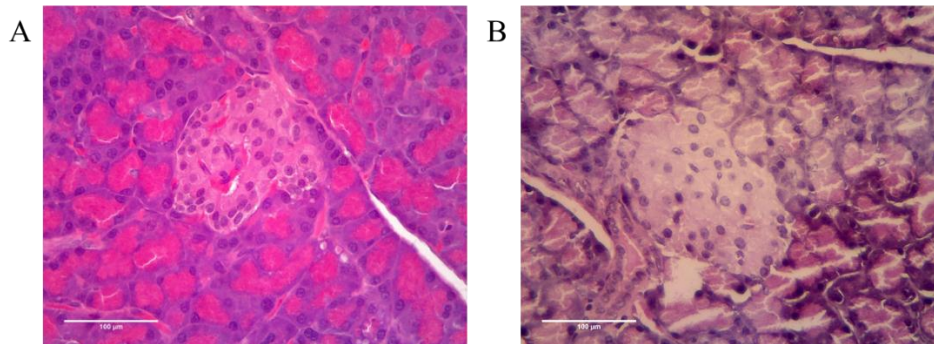
HLA-DR agar tidak menimbulkan reaksi imunologi dan dapat dipergunakan.<sup>56</sup>



**Gambar 5.3.** Hasil luas MSCs yang tervalidasi dan pemeriksaan ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 menggunakan metode *flow cytometry*

### 5.1.2. Validasi Tikus Model DM Tipe 1

Pemberian STZ 60mg/KgBB dapat terlihat efek sitotoksik terhadap sel  $\beta$  pankreas setelah 72 jam pemberian. Gugus glukosa pada STZ dapat dengan mudah masuk ke sel  $\beta$  pankreas. Hal ini disebabkan karena sifat selektif sel  $\beta$  pankreas yang lebih aktif mengambil glukosa dibanding sel lainnya. Kematian sel  $\beta$  pankreas terjadi akibat metilasi DNA yang disebabkan adanya gugus metilnitrosourea STZ. Proses ini kemudian berlanjut menjadi deplesi simpanan energi seluler yang mengakibatkan nekrosis sel  $\beta$  pankreas. Menurut *Fauzul.et.al,(2019)* menjelaskan bahwa pemberian dosis tinggi STZ >60 mg/kgBB dapat berefek pada kerusakan pankreas secara masif sehingga lebih dominan mengarah pada model hewan DM tipe 1.<sup>75,77</sup> Pada penelitian ini ditemukan penurunan jumlah dan perbesaran sel  $\beta$ -pankreas tikus dan juga didapatkan perubahan struktur pulau Langerhans (Gambar 5.3 A-B).

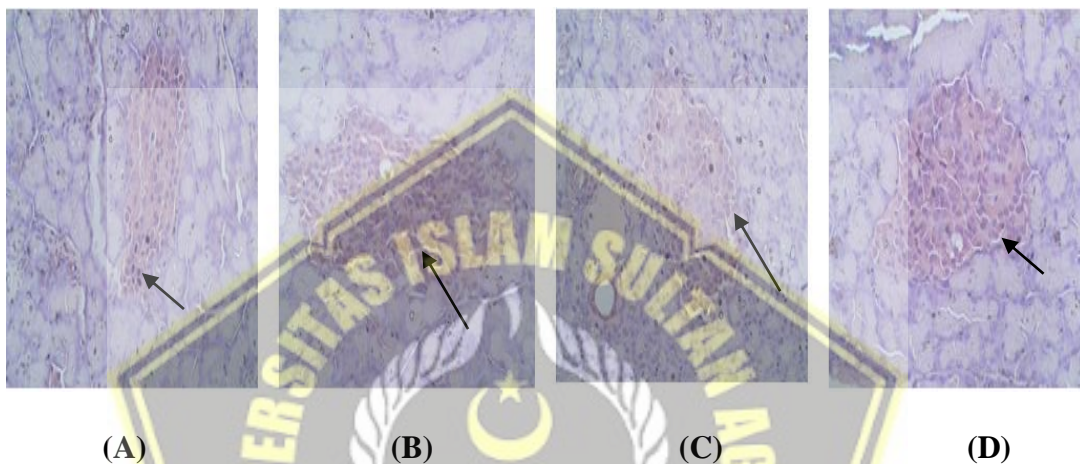


**Gambar 5.4.** (A) Kondisi Sel pada Kelompok Sham. (B) Kondisi Sel pada Sampel Penelitian setelah Dilakukan Induksi STZ dengan Dosis 60mg/kgBB. Perbesaran 100x

Perubahan kondisi tikus pada penelitian ini juga terkonfirmasi dengan pemeriksaan GDS sebelum pemberian STZ, hari ke 7, 14, 21, dan sebelum terminasi. Terdapat peningkatan hasil pengukuran GDS tikus pada kelompok kontrol negatif, kelompok P1 dan kelompok P2 pada hari ke 7 percobaan dibandingkan dengan hasil GDS tikus sebelum penyuntikan STZ. Pada hari ke 7 perlakuan, terlihat kenaikan rerata tikus kelompok kontrol menjadi 261,60 mg/dL, kelompok P1 menjadi 252,67 mg/dL dan kelompok P2 menjadi 263,83 mg/dL. Rerata GDS tikus sehat juga mengalami sedikit peningkatan menjadi 134,83 mg/dL dicurigai akibat kondisi stress saat perlakuan. Hasil GDS kemudian dikonfirmasi kembali pada hari ke 21 perlakuan dimana rerata GDS kelompok kontrol negatif mengalami peningkatan menjadi 401,67 mg/dL sedangkan kelompok P1 dan P2 yang diberikan SH-MSCs mengalami penurunan secara berturut-turut menjadi 186,75 mg/dL dan 182,00 mg/dL.

### 5.1.3. Ekspresi CD68 pada Tikus Model DMT1 Setelah Pemberian SH-MSCs

Pada penelitian ini ekspresi CD68 diperiksa dengan metode IHC dan dinyatakan sebagai persentase luasnya jaringan pankreas yang mengekspresikan CD68 (terpulas berwarna coklat) terhadap luas jaringan pankreas keseluruhan.(Gambar 5.4)



**Gambar 5.4.** Gambaran histologi pankreas tikus yang mengekspresikan CD68 dengan pewarnaan HE pada pembesaran 40x; (A) preparat tikus sehat, (B) preparat kontrol negatif (C) preparat P1 dan (D) preparat P2.

Gambar 5.4 menunjukkan perbedaan ekspresi CD68 pada setiap kelompok. Peningkatan CD68 paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol negatif dengan rerata ( $\pm$ SD) adalah  $21\% \pm 0.9\%$ . Persentase ekspresi CD68 paling rendah terdapat pada kelompok tikus sehat dengan rerata ( $\pm$ SD) adalah  $3\% \pm 0,3\%$ , diikuti dengan kelompok P2  $5\% \pm 0.5\%$  dan kelompok P1 yaitu  $10\% \pm 0,6\%$ . Data yang ada kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai  $p > 0.05$  pada semua kelompok. Hasil tersebut dapat diartikan bahwa data

berdistribusi normal dan homogen sehingga syarat uji parametrik *One-way* ANOVA terpenuhi.

**Tabel 5.1. Hasil Uji Normalitas, Homogenitas dan Uji *One-way Anova* terhadap Ekspresi Protein CD 68 antar kelompok**

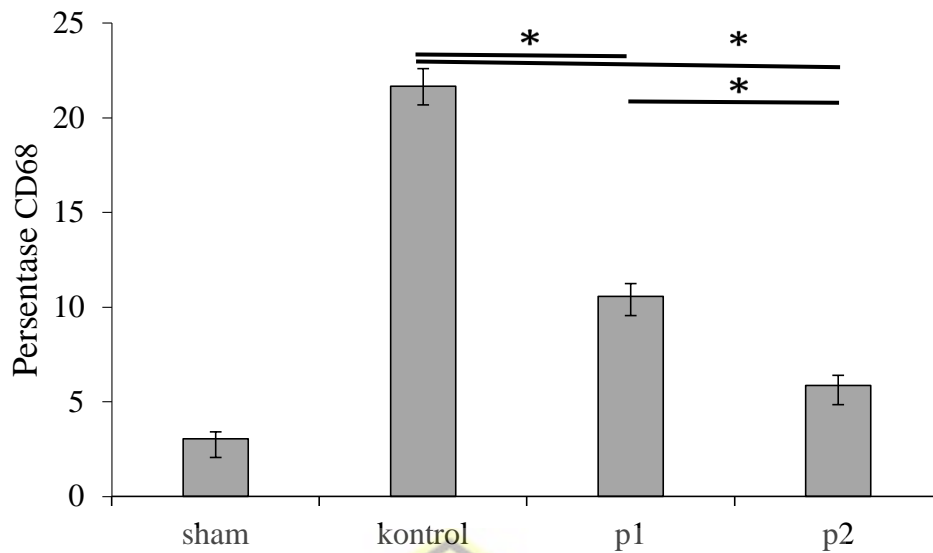
Variabel	Kelompok				pvalue
	Tikus Sehat n=3 Mean±SD	Kontrol negatif n=3 Mean±SD	P1 n=3 Mean±SD	P2 n=3 Mean±SD	
Ekspresi protein CD68	3.067%	21.670%	10.598%	5.854%	
<i>Saphiro wilk</i>	0.716	0.497	0.583	0.457	
<i>Levene test</i>					0.181
<i>One way Anova</i>					0.000

Hasil uji beda antar kelompok menggunakan uji *One-way* ANOVA mendapatkan nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ) sehingga dapat diinterpretasikan bahwa terdapat perbedaan ekspresi CD68 yang signifikan antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna, dilakukan uji *post Hoc* yang disajikan dalam bentuk tabel 5.2 dan grafik pada gambar 5.5. Hasil uji *post Hoc* antar kelompok menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi CD68 antar kelompok ( $p=0.000$ ).

**Tabel 5.2. Uji Post Hoc Ekspresi CD 68**

Kelompok	Kelompok Perbandingan	P value
Tikus Sehat	Kontrol Negatif*	0.000
	P1*	0.000
	P2*	0.009
Kontrol Negatif	P1*	0.000
	P2*	0.000
P1	P2*	0.000

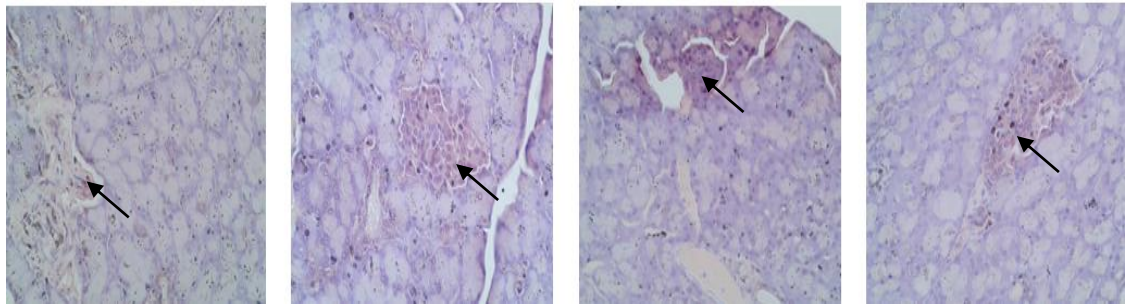
\* menandakan perbedaan signifikan dengan nilai  $p<0.05$



**Gambar 5.5.** Ekspresi CD68 Insulin pada kelompok; tikus sehat : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol negatif : subyek induksi diabetes tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek induksi diabetes yang diberikan perlakuan injeksi sekretom *Hypoxia-MS*C 0,5 cc, P2 : subyek induksi diabetes yang diberi perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia-MS*C 1 cc

#### 5.1.4. Ekspresi CD163 pada Tikus Model DMT1 Setelah Pemberian SH-MSCs

Ekspresi CD163 diperiksa dengan metode IHC dan dinyatakan sebagai persentase luasnya jaringan pankreas yang mengekspresikan CD163 (terpulas berwarna coklat) terhadap luas jaringan pankreas keseluruhan. (Gambar 5.5)



(A)

(B)

(C)

(D)

**Gambar 5.6.** Gambaran Histologi pankreas tikus yang mengekspresikan CD163 dengan pewarnaan HE pada pembesaran 40x; (A) preparat tikus sehat, (B) preparat kontrol negatif, (C) preparat P1 dan (D) preparat P2

Gambar 5.5 menunjukkan perbedaan ekspresi CD163 pada setiap kelompok. Peningkatan CD163 paling tinggi pada kelompok tikus tikus sehat dengan rerata ( $\pm$ SD) adalah  $22\% \pm 0,5\%$ , diikuti kelompok P2 dengan rerata ( $\pm$ SD) adalah  $20\% \pm 2,2\%$  dan kelompok P1 yaitu  $15\% \pm 1,3\%$ . Persentase terekspresinya CD163 paling rendah terdapat pada kelompok kontrol negatif dengan rerata ( $\pm$ SD) adalah  $3\% \pm 0,5\%$ . Jumlah CD163 yang meningkat pada kelompok P1 dan diikuti kelompok P2 menandakan semakin banyak dosis yang diberikan maka semakin meningkat terekspresinya protein CD163 pada penelitian ini.

Data hasil uji deskriptif kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai  $p > 0,05$  pada semua kelompok. Hal tersebut dapat diartikan bahwa data berdistribusi normal dan homogen sehingga syarat uji parametrik *One-way ANOVA* terpenuhi.

**Tabel 5.3. Hasil uji Normalitas, Homogenitas dan uji *One-way Anova* terhadap Ekspresi Protein CD163 antar kelompok**

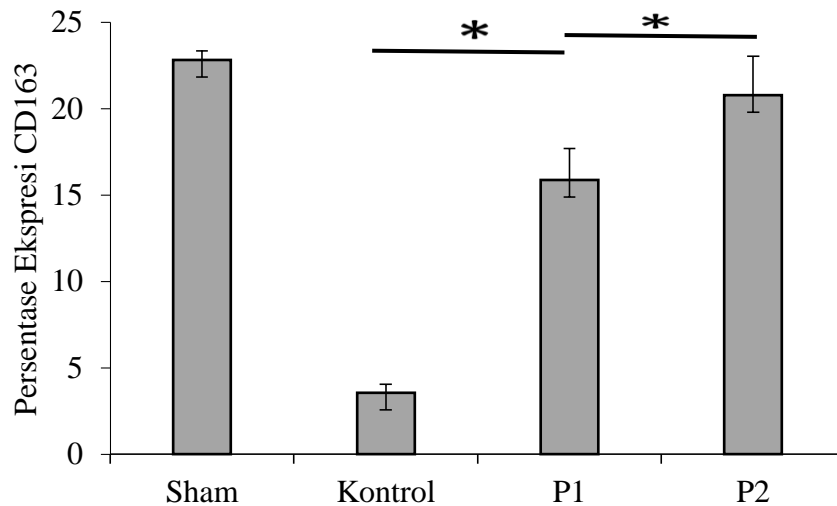
Variabel	Kelompok				pvalue
	Tikus Sehat n=3 Mean±SD	Kontrol negatif n=3 Mean±SD	P1 n=3 Mean±SD	P2 n=3 Mean±SD	
Ekspresi protein CD163	22.839%	3.560%	15.819%	20.802%	
<i>Saphiro wilk</i>	0.902	0.167	0.169	0.156	
<i>Levene test</i>					0.130
<i>One way Anova</i>					0.000

Hasil uji beda antar kelompok menggunakan uji *One-way ANOVA* mendapatkan nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) sehingga dapat diinterpretasikan bahwa terdapat perbedaan ekspresi CD163 yang signifikan antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna, dilakukan uji *post Hoc* yang disajikan dalam bentuk tabel 5.4 dan grafik pada gambar 5.7. Hasil uji *post Hoc* antar kelompok menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi CD163 antar kelompok ( $p=0.000$ ).

**Tabel 5.4. Uji *Post Hoc* Ekspresi CD 163**

Kelompok	Kelompok Perbandingan	P value
Tikus Sehat	Kontrol negatif	0.000
	P1	0.004
	P2	0.346
Kontrol negatif	P1	0.000
	P2	0.000
P1	P2	0.030

\* menandakan perbedaan signifikan dengan nilai  $p < 0.05$



**Gambar 5.7.** Ekspresi CD163 Insulin pada kelompok; tikus sehat : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, Kontrol : subyek induksi diabetes tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek induksi diabetes yang diberikan perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia-MSC* 0,5 cc, P2 : subyek induksi diabetes yang diberi perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia-MSC* 1 cc

## 5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

DMT1 merupakan penyakit metabolik autoimun yang membutuhkan terapi pengganti insulin seumur hidup. Kondisi hiperglikemi kronis pada pasien DMT1 dapat menimbulkan komplikasi jangka panjang berupa kelainan jaringan vaskular, retinopati diabetikum, gagal ginjal kronis, neuropati yang berisiko terjadinya ulkus *gangren* dan peningkatan risiko terjadi kematian dini.<sup>57</sup> Kadar ROS dan kondisi hiperglikemi pasien DMT1 dapat mengubah kode genetik yang berdampak pada polarisasi dan modulasi sel makrofag. Polarisasi makrofag M1 yang memproduksi sitokin proinflamasi (IL-6 dan TNF- $\alpha$ ) dapat mengganggu respon angiogenik, fungsi makrofag, proses penyembuhan sel- $\beta$  pankreas dan timbulnya komplikasi mikrovaskular. IL-6 dan TNF- $\alpha$  ditemukan pada sel pankreas pasien DMT1 yang mempengaruhi ekspresi gen pro-apoptosis dan secara tidak langsung



mengaktifkan sistem imun dan sel inflamasi di pulau langerhans pankreas. Kadar sitokin proinflamasi yang tinggi pada pasien DM menyebabkan terganggunya reaksi kaskade inflamasi, hiperinflamasi dan resistensi insulin.

58

SH-MSCs mengandung *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10, IL-12, HGF, TGF- $\beta$ , VEGF, PDGF, dan FGF yang mampu mempercepat perbaikan dan regenerasi jaringan, modifikasi respon imun, anti-apoptosis, kemampuan bertahan hidup, metabolisme sel, proliferasi sel, diferensiasi sel, hematopoiesis, myogenesis, angiogenesis, pertumbuhan rambut, penyembuhan luka, perlindungan terhadap ginjal, dan fungsi lain yang masih dapat dieksplorasi.<sup>59,60,61,62</sup> Pengkondisian hipoksia pada MSCs menunjukkan potensi regenerasi jaringan yang rusak lebih baik dibanding dengan MSCs normoksia. Kondisi MSCs hipoksia diduga dapat mengekspresikan molekul *Heat Shock Protein* (HSP) jauh lebih tinggi sehingga mampu melakukan *folding protein* untuk mengoptimalkan fungsi protein intraseluler.<sup>63</sup> Hasil isolasi MSCs pada penelitian ini dapat mengekspresikan beberapa *surface marker* seperti CD90 (99,80%), CD29 (94,20%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%).<sup>55</sup> Hasil ini sesuai dengan karakteristik dari MSC yang dapat dipergunakan berdasarkan ISCT.<sup>56</sup>

Konfirmasi kondisi tikus pada penelitian ini didapatkan hasil berupa penurunan jumlah dan perbesaran sel  $\beta$ -pankreas tikus dan juga didapatkan perubahan struktur pulau Langerhans. Hal tersebut menandakan terjadinya

perubahan morfologi sel pankreas tikus sesuai dengan hasil penelitian *Dinullah, et.al, (2017)* dimana ditemukan terbentuknya rongga atau ruang intraseluler baik di daerah endokrin (pulau langerhans) maupun di daerah eksokrin (sel-sel asinar) pada tikus yang diberi STZ.<sup>76</sup> Hasil rerata pemeriksaan GDS pada tikus juga mengalami peningkatan pada kelompok Kontrol negatif, P1 dan P2 pada hari ke 7 dibandingkan dengan hasil GDS sebelum dilakukan penyuntikan STZ. Peningkatan kadar gula darah tikus pada penelitian ini dikarenakan destruksi sel  $\beta$  pankreas sehingga insulin diproduksi lebih sedikit. Hal ini sesuai dengan *Erwin, et.al (2017)* yang menjelaskan bahwa kerusakan sel  $\beta$  pankreas akibat pemberian STZ secara intraperitoneal dikarenakan terbentuknya radikal bebas sangat reaktif yang berdampak pada kerusakan membran sel, protein, dan DNA sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas.<sup>78</sup>

Hasil penelitian ini menjelaskan terdapat penurunan ekspresi protein CD68 secara signifikan ( $p < 0.05$ ) pada pemberian dosis SH-MSCs 0,5cc dan 1cc. Pemberian dosis berbeda pada penelitian ini bertujuan untuk melihat perbaikan yang terjadi pada pankreas tikus dengan perbandingan pemberian 0,5cc dan 1cc SH-MSCs. Hasil penelitian ini menjelaskan bahwa kandungan *growth factor* yang terkandung pada SH-MSCs dosis 1 cc adalah  $5\% \pm 0.5\%$  yang mampu menurunkan jumlah ekspresi CD68 pada tikus DMT1 lebih baik dibandingkan dengan kelompok yang diberikan SH-MSCs dosis 0,5 cc sebesar  $10\% \pm 0,6\%$  dan kelompok kontrol negatif sebesar  $21\% \pm 0.9\%$ . Hasil

uji *post Hoc* didapatkan ada beda bermakna antar persentase ekspresi CD68 pada setiap kelompok ( $p < 0.05$ ).

Peningkatan ekspresi CD68+ sebagai sel efektor melibatkan aktivitas Makrofag M1 secara klasik yang terus berperan melepaskan sitokin pro-inflamasi seperti IL-12, IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . Hal ini berpartisipasi dalam induksi Th1 sehingga meningkatkan proses inflamasi berkelanjutan pada sel  $\beta$  pankreas.<sup>64</sup> IL-10 yang terkandung dalam SH-MSCs memicu polarisasi makrofag M1 menjadi makrofag M2 yang bersifat anti inflamasi. IL-10 memainkan peran penting dalam memblokir produksi sitokin oleh makrofag yang teraktifasi. Penghambatan produksi IL-12 oleh IL-10 bertujuan untuk melemahkan perkembangan respon sel Th1.<sup>65</sup> Hasil dari penelitian ini dapat menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs dosis 1cc berpengaruh secara signifikan diikuti oleh dosis 0,5cc terhadap penurunan ekspresi CD68 pada tikus DMT1 yang diinduksi STZ, sehingga sesuai dengan hipotesis dalam penelitian ini. Temuan ini sesuai dengan penelitian Dong.et.al,2014 yang membuktikan bahwa MSCs dapat menekan makrofag M1 dengan cara meningkatkan kadar IL-10 dan penurunan TNF- $\alpha$ , IL-12, CD68 dan HLA kelas II. Penelitian lain menjelaskan bahwa adanya IL-10 menyebabkan penurunan produksi sitokin inflamasi dan mengakibatkan penurunan risiko radang usus kronis pada tikus yang dipapar bakteri.<sup>66</sup>

Makrofag M2 merupakan makrofag yang bersifat anti inflamasi dan dapat diinduksi oleh IL-4 dan IL-13 yang dihasilkan oleh sel Th2. M2 menghasilkan beberapa sitokin anti inflamasi seperti IL-10 dan IL-1RA.

Makrofag M2 merupakan fenotip makrofag yang tidak efektif dalam presentasi antigen, meskipun menunjukkan adanya peningkatan molekul MHC kelas II. Makrofag M2 menggunakan arginin sebagai substrat untuk arginase 1 (Arg1), kemudian mendegradasi arginin menjadi ornithin, yang merupakan prekursor poliamin, prolin, dan kolagen yang dibutuhkan untuk proses perbaikan jaringan. Poliamin terlibat dalam pertumbuhan sel dan pembelahan sel, sedangkan prolin merupakan komponen utama dari kolagen. Makrofag M2 lebih cenderung bersifat sebagai regulator dan pemulih daripada sebagai sel efektor.<sup>67</sup>

Makrofag M2 ditandai dengan peningkatan regulasi reseptor reuptake seperti CD163 dan CD206 dan memiliki efek immunosupresif melalui pelepasan sitokin anti inflamasi. Peningkatan CD163 sebagai marker makrofag M2 berperan dalam respons Th2 sebagai imunomodulator, deposisi matriks dan remodeling jaringan. Hal ini ditandai dengan tingginya ekspresi IL-10 yang penting dalam menyelesaikan proses fagositosis sehingga fungsi gangguan fagositosis menurun.<sup>68</sup> Peningkatan ekspresi kemokin CCL18 dan faktor remodeling jaringan XIII-A pada makrofag M2 menunjukkan kontribusi makrofag M2 dalam proses inflamasi dan remodeling jaringan. Penelitian ini menjelaskan bahwa terdapat peningkatan ekspresi protein CD163 secara signifikan pada pemberian dosis SH-MSCs 0,5cc dan 1cc ( $p < 0.05$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs dosis 1cc yang mampu meningkatkan ekspresi CD163 lebih baik dibandingkan dengan kelompok yang diberikan SH-MSCs dosisi 0,5 cc dan

kelompok kontrol negatif, berturut-turut sebesar  $22\% \pm 0,5\%$ ,  $15\% \pm 1,3\%$  dan  $3\% \pm 0,5\%$ . Ekspresi protein CD163 paling tinggi terdapat pada kelompok tikus tikus sehat (tanpa perlakuan) dengan rerata ( $\pm$ SD) adalah  $22\% \pm 0,5\%$ . Hasil uji *post Hoc* didapatkan ada beda bermakna antar persentase ekspresi CD163 pada setiap kelompok perlakuan ( $p < 0.05$ ). Pada penelitian ini, peningkatan ekspresi protein CD163 kelompok P2 yang diberi dosis 1 cc SH-MSCs hampir setara dengan kelompok tikus sehat sebagai kelompok tikus sehat. Terjadi peningkatan ekspresi CD163 pada kelompok P1 yang diinjeksi 0.5cc SH-MSCs dan kelompok P2 yang diinjeksi 1cc SH-MSCs menandakan terjadinya perbaikan pada sel- $\beta$  pankreas. Pemberian dosis 0.5cc SH-MSCs sudah memberikan hasil yang cukup baik terhadap peningkatan ekspresi CD163, hal ini menjelaskan bahwa pemberian dosis lebih sedikit SH-MSCs sudah dapat direkomendasikan sebagai terapi awal untuk perbaikan sel- $\beta$  pankreas yang mengalami inflamasi kronis pada pasien DMT1.<sup>69</sup> Pernyataan ini sesuai dengan Wang.*et.al*,2020 terhadap beberapa penelitian yang membuktikan bahwa peningkatan makrofag M2 pada proses inflamasi dapat membantu dalam proses penyembuhan penyakit seperti pada penyakit kardiovaskular, paru, pencernaan, ginjal, dan sistem saraf pusat.<sup>70</sup> Jamiyan.*et.al.*,(2020) juga menjelaskan bahwa akumulasi dan aktivasi makrofag M2 dapat menginduksi adaptasi lokal kekebalan sel melalui produksi CCL18, perekrutan sel T naif dan sel dendritik yang berperan menghentikan proses inflamasi yang berkelanjutan.<sup>71</sup>

SH-MSCs berperan mengeluarkan IL-10 yang mempercepat peningkatan makrofag M2. Proses ini memiliki banyak peran dalam menghambat sitokin proinflamasi baik melalui penghambat jalur *Nuclear factor kappa B* (NF-κB) kronik yang diinduksi TNF-α dan SOCS-3, maupun pembatalan transkripsi STAT-1 yang diinduksi IFN oleh STAT-3. IL-10 bekerja dengan meningkatkan fosforilasi STAT3 dan mengatur ekspresi SOCS-3 yang akan mencegah translokasi NF-κB.<sup>65</sup> Selain itu jalur persinyalan IL-10 yang dimediasi STAT3 juga menghentikan presentasi antigen HLA-DR yang diinduksi IFN tanpa bergantung pada jalur pensinyalan NF-κB klasik.<sup>72</sup> NF-κB adalah protein di sitoplasma sel yang terikat dalam bentuk inaktif yang berfungsi mengatur inflamasi, respons imun, penyembuhan luka, serta kematian dan fungsi sel. Adanya inhibisi sinyal NF-κB meningkatkan apoptosis miofibrolas pankreas melalui hambatan ekspresi *c-Jun N terminal Kinases* (c-JNK) sehingga terjadi regresi fibrosis.<sup>73</sup> Ketika proses regresi diinduksi oleh pemberian SH-MSCs, maka akan semakin menurunkan ekspresi dari NF-κB sehingga mempercepat polarisasi makrofag M1 menjadi M2.<sup>74</sup>

### 5.3 Keterbatasan Penelitian

1. Hewan coba yang mati pada penelitian ini kemungkinan akibat dosis STZ yang terlalu tinggi, mengingat dosis STZ yang diberikan pada penelitian ini adalah 60 mg/KgBB.

2. Pada penelitian ini tidak dilakukan penilaian ekspresi CD68 dan CD163 sebelum dilakuan pemberian SH-MSCs. Sehingga tidak dapat diketahui derajat kerusakan sel  $\beta$  pankreas setelah diinduksi STZ.
3. Peningkatan ekspresi faktor remodeling jaringan XIII-A pada makrofag M2 berkontribusi dalam percepatan proses inflamasi dan remodeling jaringan sehingga dapat mengukur perbaikan jaringan (regenerasi jaringan baru) yang terjadi akibat polarisasi makrofag. Pengukuran faktor remodeling jaringan XIII-A tidak dilakukan sehingga tidak dapat diketahui kontribusi makrofag M2 dalam proses remodeling jaringan (regenerasi jaringan baru) pada pemberian SH-MSCs.



## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan

**6.1.1.** Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap polarisasi sel makrofag melalui ekspresi protein CD68 dan CD163 pada tikus model DMT1

**6.1.2.** Pemberian SH-MSCs dosis 0.5 cc dan 1 cc intra peritoneal menurunkan ekspresi protein CD68 pada tikus model DMT1 dibandingkan dengan kontrol

**6.1.3.** Pemberian SH-MSCs dosis 0.5 cc dan 1 cc intra peritoneal meningkatkan ekspresi protein CD163 pada tikus model DMT1 dibandingkan dengan kontrol

#### 6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

**6.2.1.** Perlu penambahan jumlah sampel tikus untuk menghindari *lost of follow* penelitian selanjutnya.

**6.2.2.** Perlu pengukuran ekspresi CD68 dan CD163 sebelum dilakukan pemberian SH-MSCs pada tikus model DMT1.

**6.2.3.** Perlu pengukuran faktor remodeling jaringan XIII-A setelah dilakukan pemberian SH-MSCs pada tikus model DMT1.



## DAFTAR PUSTAKA

1. *IDF Diabetes Atlas 10th edition, 2021*. (n.d.). [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org)
2. Pediatri, S., Pulungan, A. B., Annisa, D., & Imada, S. (2019). Aman B. Pulungan dkk: Diabetes melitus tipe-1 pada anak: situasi di Indonesia dan tata laksana Diabetes Melitus Tipe-1 pada Anak : Situasi di Indonesia dan Tata Laksana. In *Sari Pediatri* (Vol. 20, Issue 6).
3. Mathew P, Thoppil D. Hypoglycemia. [Updated 2021 Jan 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534841/>
4. Mukhtar, D. (2012). *KEDOKTERAN MAKROFAG PADA JARINGAN ADIPOSA OBES SEBAGAI PENANDA TERJADINYA RESISTENSI INSULIN*.
5. Putra, A., Hadi Suwiryo, Z., Muhar, A. M., Widyatmoko, A., & Rahmi, F. L. (n.d.). The Role of Mesenchymal Stem Cells in Regulating PDGF and VEGF during Pancreatic Islet Cells Regeneration in Diabetic Animal Model. *Folia Medica*, 63(6), 875–883. <https://doi.org/10.3897/folmed.63.e57636>
6. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
7. Praktik Klinis, P. (n.d.). *IKATAN DOKTER ANAK INDONESIA 2017 Diagnosis dan Tata Laksana Diabetes Melitus Tipe-1 pada Anak dan Remaja*.
8. Fitria Nusantara, A., Kusyairi, A., Studi Sarjana Keperawatan, P., & Hafshawaty Pesantren Zainul Hasan, Stik. (2019). SUPPORT SYSTEM KELUARGA DALAM PENCEGAHAN KETOASIDOSIS DIABETIK PADA ANAK DENGAN DM TIPE 1. *Jurnal Ilmu Kesehatan*, 3(1).
9. Johannesson, B., Sui, L., Freytes, D. O., Creusot, R. J., & Egli, D. (2015). Toward beta cell replacement for diabetes. *The EMBO journal*, 34(7), 841–855. <https://doi.org/10.15252/embj.201490685>
10. Ezquer F., Ezquer M., Contador D., Ricca M., Simon V., Conget P. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. *Stem Cells*. 2012;30:1664–1674. doi: 10.1002/stem.1132.

11. Suski, Maciej, A. W. 'sniewska, K. K. 's, A. K., A. S., K. S., K. C., J. 'ozef M., R. O. (2019). *Decrease of the Pro-Inflammatory M1-like Response by Inhibition of Dipeptidyl Peptidases 8/9 in THP-1 Macrophages – Quantitative Proteomics of the Proteome and Secretome*, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.09.005>.
12. Scuteri, A., & Monfrini, M. (2018). Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Approach for Diabetes and Pancreatic Disorders. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2783. <https://doi.org/10.3390/ijms19092783>
13. Wang, D., Li, J., Zhang, Y., Zhang, M., Chen, J., Li, X., Hu, X., Jiang, S., Shi, S., & Sun, L. (2014). *Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study*. <http://arthritis-research.com/content/16/2/R79>
14. Shiddiqi, T., Arifin Adnan, Z., Nurudhin Sub Bagian Reumatologi, A., & Ilmu Penyakit Dalam, B. (2017). *Pengaruh Secretome Sel Punca Mesenkimal Terhadap Ekspresi Interleukin-1 $\beta$  dan Caspase-1* THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL SECRETOME TOWARD INTERLEUKIN-1 $\beta$  AND CASPASE-1 EXPRESSION (Vol. 9).
15. Waseem, M., Khan, I., Iqbal, H., Eijaz, S., Usman, S., Ahmed, N., ... Salim, A. (2016). *Hypoxic Preconditioning Improves the Therapeutic Potential of Aging Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Streptozotocin-Induced Type-1 Diabetic Mice*. *Cellular Reprogramming*, 18(5), 344–355. doi:10.1089/cell.2016.0002
16. Lotfinia, M., Lak, S., Ghahhari, N. M., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Tabrizi, B. S., & Kadivar, M. (2017). FULL LENGTH Iranian Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomedical Journal*, 21(1), 24–31. <https://doi.org/10.6091/21.1.24>
17. Al-Azzawi, B., Mcguigan, D. H., Manderson Koivula, F. N., Elttayef, A., Dale, T. P., Yang, Y., ... Forsyth, N. R. (2020). *The Open Stem Cell Journal The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism*. 6, 1–12. <https://doi.org/10.2174/1876893802006010001>
18. Srinivasan dan Ramarao, 2007, Animal Models in Type 2 Diabetes Research: An overview, *Indian J Med Res* 125, March 2007, pp 451-472.
19. Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+

- macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>
20. Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., & Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>
  21. Saqib, U., Sarkar, S., Suk, K., Mohammad, O., Baig, M. S., & Savai, R. (2018). Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 25, pp. 17937–17950). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>
  22. Haslinda, Y., Sa'adi, A., Hendarto, H., & Hoesin, F. (n.d.). M1 M2 macrophage expression in menstrual blood flakes of women with endometriosis. In *Majalah Obstetri & Ginekologi* (Vol. 24, Issue 2).
  23. Hyosuk Kim, S. Y. W. G. K. Y. Y. I. C. K. and S. H. K. (2019). Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. *Biomedical Research Institute Korea Institute of Science and Technology (KIST) Seoul 02792, Republic of Kore.*
  24. van Dalen, F. J., van Stevendaal, M. H. M. E., Fennemann, F. L., Verdoes, M., & Ilina, O. (2019). Molecular repolarisation of tumour-associated macrophages. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24010009>
  25. Virana Putri, N., Sari Puspita Rasyid, R., Murti, K., Studi Sarjana Kedokteran, P., Patologi Anatomi, B., & Histologi Fakultas Kedokteran, B. (n.d.). *Sinta-3 Maj Patol Indones 2021* (Vol. 30, Issue 2).
  26. Bosco, M. C. (2019). Macrophage polarization: Reaching across the aisle? In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 143, Issue 4, pp. 1348–1350). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.995>
  27. Castellanos, Benavides MP, Garzón-Orjuela N, Linero I. Effectiveness of mesenchymal stem cell-conditioned medium in bone regeneration in animal and human models: a systematic review and meta-analysis. *Cell Regen* 2020; **9**: 1–22.
  28. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014; **12**: 1–14

29. Ferreira-Hermosillo A, Molina-Ayala M, Ramírez-Rentería C, Vargas G, Gonzalez B, Isibasi A *et al.* Inflammatory cytokine profile associated with metabolic syndrome in adult patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Res* 2015; **2015**. doi:10.1155/2015/972073.
30. Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4597. <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>
31. Moreira, A., Kahlenberg, S., & Hornsby, P. (2017). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes. *Journal of molecular endocrinology*, 59(3), R109–R120. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0117>
32. Akil, A. A. S., Yassin, E., Al-Maraghi, A., Aliyev, E., Al-Malki, K., & Fakhro, K. A. (2021). Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02778-6>
33. DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. In *The Lancet* (Vol. 391, Issue 10138, pp. 2449–2462). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
34. Afdal., Rini.,E.,A. (2012). *Neglected-Noncompliant Type 1 Diabetes Mellitus with Complications*. <http://jurnal.fk.unand.ac.id>
35. American Diabetes Associatio (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(SUPPL.1), 81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
36. Solis-Herrera C, Triplitt C, Reasner C, et al. Classification of Diabetes Mellitus. [Updated 2018 Feb 24]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279119/>
37. *Ikatan Dokter Anak Indonesia.,2017,Konsensus Nasional Pengelolaan Diabetes Mellitus Tipe 1 UKK Endkrinologi Anak dan Remaja, IDA, WORLD DIABETES FOUNDATION 2015.*
38. Aji, H.,2011. *Gambaran Klinis dan Laboratoris Diabetes Melitus Tipe-1 pada Anak Clinical and Laboratories Features in Children with Type-1 Diabetes Mellitus*,FKUniversitas Brawijaya, Malang.
39. Dercoli. E., 2019,*Diabetes Militus Tipe 2*,Buku Ajaran Universitas Andalas, Padang. ISBN No.978-602-1332-25-2

40. PERKENI. (2015). Konsensus Pengendalian dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia 2015. Perkeni, 78. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
41. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. 2018. Hari Diabetes Sedunia tahun 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, Jakarta. 10 hal
42. Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanak-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine connections*, 7(1), R38–R46. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
43. Nurmawati T. Studi Respon Fisiologis dan Kadar Gula Darah pada Tikus Putih ( *Rattus Norvegicus* ) yang Terpapar STREPTOZOTOCIN ( STZ ) ( The Study of Physiological Response and White Rats ( *Rattus norvegicus* ) Blood Glucose Levels Exposed by Streptozotocin ). 2017;3:244–7.
44. Sithole HL. A review of the use of Streptozotocin ( STZ ) in the induction of diabetes in rats and subsequent ocular tissue changes. 2009;68(2):82–8.
45. Saputra NT, Suartha IN, Dharmayudha AAGO. Agen Diabetagonik Streptozotocin untuk Membuat Tikus Putih Jantan Diabetes Mellitus. *Bul Vet Udayana*. 2018;10(2):116.
46. Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., O'Brien, T., & Samali, A. (2011). Cytokine-Induced  $\beta$ -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. In *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. <https://doi.org/10.5772/22765>
47. Motawea SM, Noreldin RI, Naguib YM. Potential therapeutic effects of endothelial cells trans-differentiated from Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells on altered vascular functions in aged diabetic rat model. *Diabetol Metab Syndr* 2020; **12**: 1–13.
48. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013; **64**: 384–396.
49. Janež A, Guja C, Mitrakou A, Lalic N, Tankova T, Czupryniak L *et al*. Insulin Therapy in Adults with Type 1 Diabetes Mellitus: a Narrative Review. *Diabetes Ther* 2020; **11**: 387–409.
50. Dias, I., Pinheiro, D., Ribeiro Silva, K., Stumbo, A. C., Thole, A., Cortez, E., de Carvalho, L., & Carvalho, S. N. (2021). Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. *Current Research in*

*Pharmacology and Drug Discovery*, 2, 100069.  
<https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100069>

51. Hanafiah, K.A., 1995, Rancangan percobaan teori dan aplikasi, Raja Grafindo Persada, Jakarta Utara
52. He, Q., Ye, Z., Zhou, Y., & Tan, W. S. (2018). Comparative study of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and adipose tissue. *Turkish Journal of Biology*, 42(6), 477–489. <https://doi.org/10.3906/biy-1802-52>
53. Saputra, N. T., Suartha, I. N., & Dharmayudha, A. A. G. O. (2018). Agen Diabetagonik Streptozotocin untuk Membuat Tikus Putih Jantan Diabetes Mellitus. *Buletin Veteriner Udayana*, 116. <https://doi.org/10.24843/bulvet.2018.v10.i02.p02>
54. Robert, A.W., Marcon, B.H., Dallagiovanna, B. and Shigunov, P. Adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis of human mesenchymal stem/stromal cells: a comparative transcriptome approach. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:561.
55. Caroti, C.M., Ahn, H., Salazar, H.F., Joseph, G., Sankar, S.B., Willett, N.J., Wood, L.B., Taylor, W.R. and Lyle, A.N. A Novel Technique for Accelerated Culture of Murine Mesenchymal Stem Cells that Allows for Sustained
56. Dominici, M., le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
57. Lucier & Weinstock, 2021, Diabetes Mellitus Type 1, PubMed, [National Library of Medicine](#)
58. Nyoman, W., 2015, *Peningkatan produksi radikal bebas pada kasus diabetes melitus*, Jurnal FK Udayana, Bali
59. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 2018; **217**. doi:10.1083/jcb.201708007.
60. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; **174**: 299–306.
61. Tran C, Damaser MS. Stem cells as drug delivery methods: Application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;82:1–11.

62. Xiao Y., Li X., Hao H., Cui Y., Chen M, Liu L, et.al., 2013, Secretome of Mesenchymal stem cell. China
63. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M *et al.* Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; **7**: 305–310.
64. Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. v. (2017). CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, *97*(1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
65. Hovsepian, E., Penas, F., Siffo, S., Mirkin, G. A., & Goren, N. B. (2013). IL-10 inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079445>
66. Lang, R., Rutschman, R. L., Greaves, D. R., & Murray, P. J. (2002). Autocrine Deactivation of Macrophages in Transgenic Mice Constitutively Overexpressing IL-10 Under Control of the Human CD68 Promoter. *The Journal of Immunology*, *168*(7), 3402–3411. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3402>
67. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
68. Zelinka-Khobzey, M. M., Tarasenko, K. v., Mamontova, T. v., & Shlykova, O. A. (2021). CHARACTERISTICS OF CD68+ AND CD163+ EXPRESSION IN PLACENTA OF WOMEN WITH PREECLAMPSIA AND OBESITY. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, *74*(9 cz 1), 2152–2158. <https://doi.org/10.36740/wlek202109122>
69. DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. In *The Lancet* (Vol. 391, Issue 10138, pp. 2449–2462). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
70. Wang, J., Xia, J., Huang, R., Hu, Y., Fan, J., Shu, Q., & Xu, J. (2020). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alter disease outcomes via endorsement of macrophage polarization. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01937-8>

71. Jamiyan, T., Kuroda, H., Yamaguchi, R., Abe, A., & Hayashi, M. (n.d.). *CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast*. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02855-z/Published>
72. Chan et al. (2016). The influence of satisfaction and promotability on the relation between career adaptability and turnover intentions. *Journal of Vocational Behavior*, 92, 167–175
73. Zhang, X., Zhao, Y., Zhu, X., Guo, Y., Yang, Y., Jiang, Y., & Liu, B. (2019). Active vitamin D regulates macrophage M1/M2 phenotypes via the STAT-1-TREM-1 pathway in diabetic nephropathy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 6917–6926. <https://doi.org/10.1002/jcp.27450>
74. Gu, W., Song, L., Li, X. M., Wang, D., Guo, X. J., & Xu, W. G. (2015). Mesenchymal stem cells alleviate airway inflammation and emphysema in COPD through down-regulation of cyclooxygenase-2 via p38 and ERK MAPK pathways. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08733>
75. Ida Ayu Adhistania Pidada, Ni Luh Eka Setiasih, dan Ida Bagus Oka Winaya. Daun Kelor Memperbaiki Histopatologi Hati Tikus Putih Yang Mengalami Diabetes Melitus. *Buletin Veteriner Udayana*. 2018; 10(1): 50-56. eISSN: 2477-2712
76. Dinullah, N.A., Salim, M.N., Hamdani. Pengaruh Ekstrak Daun Jamblang (*Syzygium cumini*) Terhadap Histopatologi Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptozotocin. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*. 2017; 1(4). <https://doi.org/10.21157/jim%20vet.v1i4.4463>
77. Husna, F., Suyatna, F. D., Arozal, W., & Purwaningsih, E. H. (2019). Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes Animal Model in Diabetes Research. *Mini Review Article Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 6(3), 131–141.
78. Erwin, E., Etriwati, E., Muttaqien M., Pangestiningih, T.W., Widyarini, S. Ekspresi Insulin Pada Pancreas Mencit (*Mus musculus*) Yang Diinduksi Dengan Streptozotocin Berulang. 2013; 7(1). <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.899>