

**PENGARUH SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM*  
*CELLS* TERHADAP EKSPRESI GEN SOD DAN IL-6 TIKUS  
MODEL DIABETES TIPE 1**

**TESIS**

untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat Sarjana S2



Disusun Oleh:

Ayuningtyas Utami

MBK 1914010150

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

**2022**


TESIS

**PENGARUH SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM  
CELLS TERHADAP EXPRESI GEN SOD DAN IL-6 TIKUS  
MODEL DIABETES TIPE 1**

Disusun oleh Ayuningtyas Utami


MBK 1914010150

akan dipertahankan didepan Tim  
Penguji Pada tanggal 6 September 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima




Menyetujui,  
Pembimbing

Pembimbing I



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


Pembimbing II



Dr. dr. Joko Wahyu W M.Kes  
NIK. 210198046

UNISSULA  
جامعة السلطان Agung الإسلامية  
Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan



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

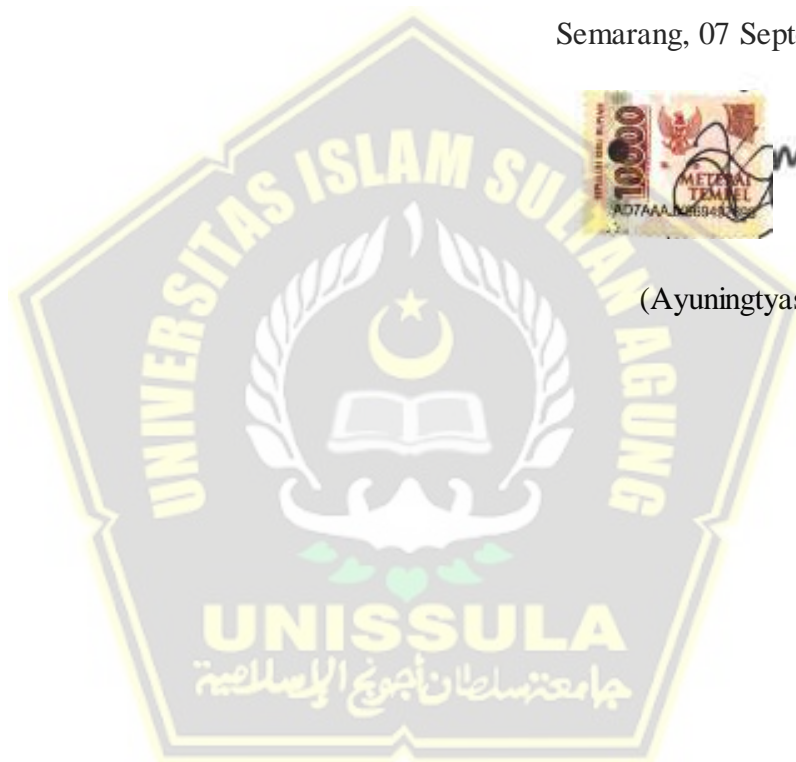
## PERNYATAAN

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

Semarang, 07 September 2022



(Ayuningtyas Utami)



## RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas

Nama : Ayuningtyas Utami  
Tempat, tanggal lahir : Semarang, 11 November 1986  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Perempuan

### B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Sudirman IV Cimahi : lulus tahun 1995
2. SMPN 01 Cimahi : lulus tahun 2001
3. SMAN 2 Cimahi : lulus tahun 2004
4. FK UNDIP : lulus tahun 2010
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019 – sekarang)

### C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2010-2011 : PT. Ungaran Sari Garment, Klinik Cavita Medika
2. Tahun 2011-2013 : PT. Itech Lafacos, Kusuma Klinik Grup
3. Tahun 2012- sekarang: Klinik Medika Utama
4. Tahun 2017-2018 : PT. Angkasa Pura II
5. Tahun 2018-Sekarang: Immoderma Skin Clinic

### D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua  
Ayah : Untung Purnomo  
Ibu : Upit Bardaniyah
2. Nama Anak : Benyazid Adskhan Syach  
Clarisha Isyana Tungadewi

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan atas berkat-Nya, sehingga proposal tesis dengan judul, **-PENGARUH SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI GEN SOD DAN IL-6 TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1**. ini dapat terselesaikan. Proposal tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam- dalamnya kepada:

1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Masgister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
3. Dr. dr.H Joko WW,M.Kes selaku dosen pembimbing II yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
4. Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp. A, dr. H. Hadi Sarosa, M.Kes, dan Dr. Hj. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen penguji I, II dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.

5. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
6. Seluruh keluarga Mandiri Karya Utama Grup yang selalu menyemangati dan selalu mensupport. Terimakasih atas dukungan kalian.
7. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran Unissula: Devi, Dina, Ariq, Ardi, Chandra, Ifan, Dayat, Santi, dan Nurul, dan Topik, kalian sudah seperti keluarga kedua saya... Terimakasih anak-anak asuh, akhirnya saya bisa mengakhiri pertandingan ini dengan baik berkat kalian.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, 7 September 2022



Ayuningtyas Utami



## ABSTRAK

### PENGARUH SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI GEN SOD DAN IL-6 TIKUS MODEL DIABETES TIPE-1

**Latar belakang:** Diabetes mellitus tipe 1 (DMT1) adalah penyakit autoimun yang di tandai dengan kerusakan sel beta Langerhans yang berkaitan dengan stress oksidatif dan hiperinflammasi. Sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (H-MSCs) mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi yang mampu menekan stress oksidatif dan inflammasi. Namun, peran H-MSCs terhadap ekspresi gen SOD dan IL-6 pada DMT1 hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian H-MSCs terhadap ekspresi SOD dan IL-6 pada tikus model DMT1 yang diinduksi STZ 60mg/kgBB.

**Metode:** Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *post test control group design*. Penelitian ini dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok sham, kelompok kontrol yaitu kelompok yang diberi induksi STZ 60mg/kgBB, kelompok yang mendapatkan terapi H-MSCs 0.5 ml (P1) dan kelompok yang mendapatkan terapi H-MSCs 1 ml (P2), sedangkan sham tidak menerima induksi. Pada kelompok P1 dan P2 diberi H-MSCs secara intraperitoneal pada hari ke 7, 14, dan 21. Pada hari ke 28 penelitian dilakukan terminasi dan di analisis ekspresi gen SOD dan IL-6 dengan qRT-PCR.

**Hasil:** Hasil penelitian ini menunjukkan rerata ekspresi gen SOD pada kelompok sham sebesar  $1.00 \pm 0.01$ ; kontrol:  $0.07 \pm 0.03$ , P1:  $1.50 \pm 0.72$ , P2:  $5.89 \pm 3.55$ , sedangkan rerata ekspresi gen IL-6 kelompok sham:  $1.00 \pm 0.02$ , kontrol:  $6.78 \pm 0.67$ , P1:  $1.88 \pm 0.88$  dan P2:  $1.24 \pm 0.17$ . Pada uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil  $p > 0,05$ . Hasil uji Anova  $p < 0,05$ . Sehingga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

**Kesimpulan:** Pemberian H-MSCs berpengaruh secara bermakna terhadap perbaikan sel  $\beta$ -pankreas pada DMT1 dengan menurunkan ekspresi gen IL-6 dan meningkatkan ekspresi gen SOD.

**Kata Kunci:** SOD, IL-6 H-MSCs, diabetes mellitus tipe 1

## ABSTRACT

**Background:** Type 1 diabetes mellitus (DMT1) is an autoimmune disease characterized by beta cell damage associated with oxidative stress and hyperinflammation. Hypoxic secretome mesenchymal stem cells (H-MSCs) contain soluble bioactive molecules such as growth factors and anti-inflammatory cytokines that can prevent suppression of oxidative stress and inflammation. However, the role of H-MSCs on SOD and IL-6 gene expression in DMT1 remains unclear. This study aims to determine the effect of H-MSC on the expression of SOD and IL-6 in the skin of DMT1 rat model induced by STZ 60mg/kgBW.

**Methods:** Experimental research with post test control group. Sham, the control group, 0.5 ml H-MSCs (P1) and 1 ml H-MSCs (P2) were each given 60mg/kgBW STZ induction, while the shams did not receive induction. P1 and P2 were administered H-MSCs intraperitoneally on days 7, 14, and 21. On day 28, the SOD and IL-6 genes were terminated and expressed by qRT-PCR.

**Results:** Analysis of SOD gene expression increased ( $5.89\pm 3.55$ ) and decreased IL-6 ( $1.24\pm 0.17$ ) in the 1 ml H-MSCs treatment group along with the increase in concentration compared to the control group, SOD ( $0.07\pm 0.03$ ) and IL-6 ( $6.78\pm 0.67$ ).

**Conclusion:** The administration of H-MSCs have a significant effect on the regeneration of  $\beta$ -pancreatic cells in DMT1.

**Keywords:** SOD, IL-6 H-MSCs, type 1 diabetes mellitus



## DAFTAR ISI

USULAN SKRIPSI.....	ii
PRAKATA.....	iii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN .....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
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
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Superoxide Dismutase (SOD).....	9
2.1.1 Definisi.....	9
2.1.2 Mekanisme Antioksidan SOD.....	9
2.2 Interleukin-6 (IL-6).....	10
2.2.1 Definisi.....	10
2.2.2 Peran IL-6 pada Proses Inflamasi Diabetes Mellitus .....	11
2.3 Diabetes Mellitus .....	13
2.3.1 Definisi.....	13
2.3.2 Klasifikasi.....	14
2.4 Diabetes Tipe 1.....	16
2.4.1 Definisi.....	16
2.4.2 Etiologi.....	16

2.4.3	Patofisiologi.....	17
2.5	Streptozotocin (STZ) .....	18
2.6	Mesenchymal Stem Cells (MSCs) .....	18
2.6.1	Definisi.....	18
2.6.2	Sumber MSCs .....	19
2.6.3	Karakteristik MSCs .....	19
2.6.4	Peran MSCs.....	20
2.7	Hipoksia.....	21
2.7.1	Definisi.....	21
2.7.2	Mekanisme Fisiologi Seluler .....	22
2.8	Sekretom Mesenchymal Stem Cell .....	23
2.8.1	Definisi.....	23
2.8.2	Komposisi.....	24
2.9	Pengaruh H-MSCs terhadap ekspresi SOD dan IL-6 pada DMT1 .....	24
<b>BAB 3</b>	<b>KERANGKA TEORI,KERANGKA KONSEP,HIPOTESIS .....</b>	<b>26</b>
3.1	Kerangka Teori.....	26
3.2	Kerangka Konsep .....	28
3.3	Hipotesis .....	28
<b>BAB 4</b>	<b>METODE PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
4.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....	29
4.2	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	30
4.2.1	Variabel Penelitian .....	30
4.2.2	Definisi Operasional.....	30
4.3	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	31
4.3.1	Subyek Penelitian.....	31
4.3.2	Sampel Penelitian.....	32
4.3.3	Cara Pengambilan Sampel Penelitian .....	32
4.3.4	Besar Sampel .....	33
4.4	Alat dan Bahan .....	33
4.5	Cara Penelitian .....	35
4.5.1	Perolehan Ethical Clearance .....	35

4.5.2	Prosedur Isolasi .....	35
4.5.3	Validasi Sel MSCs dengan pembacaan CD90,CD29,CD45 dan CD31 dengan Flow Cytometry.....	36
4.5.4	Proses Hipoksia .....	37
4.5.5	Pembuatan Tikus Model DMT1 .....	38
4.5.6	Terminasi dan Pengambilan Jaringan.....	40
4.5.7	Pemeriksaan Histopatologi Jaringan Pankreas .....	41
4.5.8	Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA.....	42
4.5.9	Pembacaan Ekspresi SOD dan IL-6 dengan Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	43
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian .....	45
4.6.1	Tempat Penelitian .....	45
4.6.2	Waktu Penelitian.....	45
4.7	Analisa Data.....	45
4.8	Alur Penelitian .....	46
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>47</b>
5.1	Hasil Penelitian .....	47
5.1.1	Isolasi Hypoxic Secretome Mesenchymal Stem Cell (H- MSCs) .....	47
5.1.2	Efek Pemberian H-MSCs pada Ekspresi Gen SOD pada Tikus Model DMT1.....	53
5.1.3	Efek Pemberian H-MSCs pada Ekspresi Gen IL-6 pada Tikus Model DMT1 .....	55
5.2	Pembahasan Penelitian .....	58
5.3	Keterbatasan Penelitian.....	62
<b>BAB 6</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>63</b>
6.1	Kesimpulan.....	63
6.2	Saran.....	63
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>64</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>74</b>

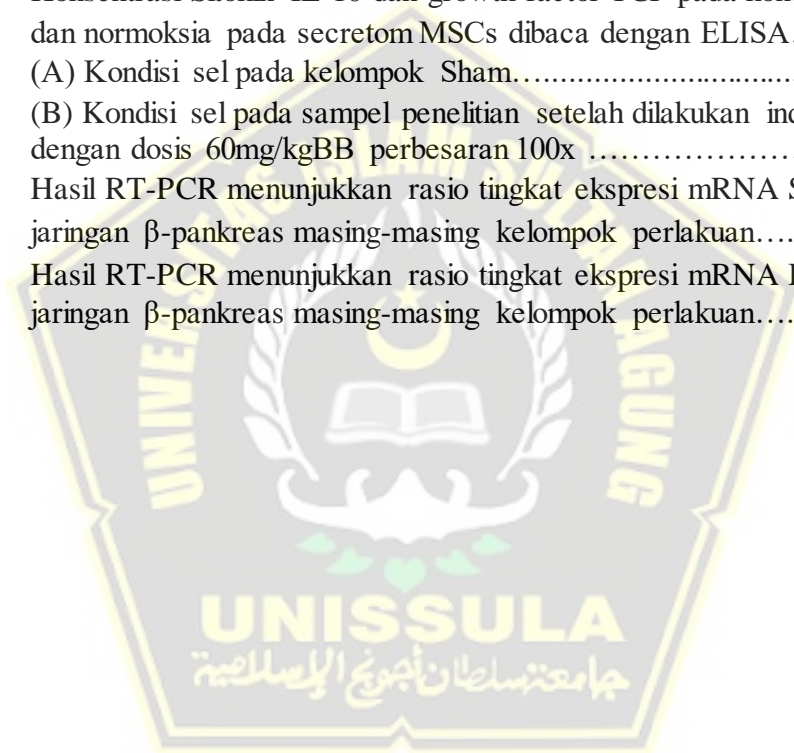
## DAFTAR SINGKATAN

ADA	: American Diabetes Association
AGE	: Advanced Glycation end Products
AIRE	: Autoimmune Regulator
AMP	: Antimicrobial Peptide
AT	: Adepocyte Tissue
ATP	: Adenosine Triphosphate
AP	: Activator Protein
BM	: Bone Marrow
BSC	: Biosafety Cabinet
CD	: Cluster of Differentiation
CTLA-4	: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonat
DM	: Diabetes Mellitus
DMT1	: Diabetes Mellitus Tipe 1
DMT2	: Diabetes Mellitus Tipe 2
ER	: Endoplasmic Reticulum
EZH2	: Enhancer Zeste Homolog 2
ERBB3	: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FPG	: Fasting Plasma Glucose
FoxP3	: Forkhead box P3
GAD	: Glutamic Acid Decarboxylase
GDM	: Gestational Diabetes Mellitus
GDS	: Gula Darah Sewaktu
GLP	: Glucagon-Like Peptide
GPx	: Glutathione Peroksidase
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
HIF	: Hypoxia Inducible Factor
HIP14	: Huntingtin-Interacting Protein 14
HNF-1a	: Hepatocyte Nuclear Factor-1a
HLA	: Human Leukocyte Antigen
H-MSCs	: Hypoxia Mesenchymal Stem Cells
HYMAI	: Hydatiform Mole Associated and Imprinted Transcript
IAA	: Insulin Autoantibodies
IA2	: Islet Antigen 2
IFN	: Interferon
IFIH1	: Interferon Induced With Helicase C Domain 1

IL	: Interleukin
KCNJ11	: Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11
MODY	: Maturity-Onset Diabetes of The Young
MSC	: Mesenchymal Stemcell
NAD	: Nikotinamida Adenin Dinukleotida
NK	: Natural Killer
NRF	: Nuclear Related Factor
ODD	: Oxygen-Dependent Degeneration
OGTT	: Oral Glucose Tolerance Test
PDGF	: Plateled Derived Growth Factor
PIGF	: Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein
PTPN22	: Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22
RER	: Rouch Endoplasmic Reticulum
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT-PCR	: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SCCR	: Stem Cell & Cancer Research
SOD	: Superoxide Dismutase
STAT3	: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SRP	: Signal Recognition Protein
STZ	: Streptozotocin
TCA	: Tricarboxylic Acid Cycle
TFF	: Tangential Flow Filtration
TGF	: Transforming Growth Factor
TGN	: Trans-Golgi Network
TNF	: Tumour Necrosis Factor
UCB	: Umbilical Cord Blood
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeats
VHL	: Von Hippel-Lindau
ZAC	: Zinc Finger Protein Regulating Apoptosis and Cycle Arrest
ZDF	: Zucker Diabetic Fatty Rats

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Mekanisme Keseimbangan Redoks .....	10
Gambar 2.2.	Jalur pesinyalan utama yang terlibat dalam diabetes melitus .....	13
Gambar 2.3.	Sumber mesenchymal stem cell (MSCs) .....	19
Gambar 2.4.	Kemampuan diferensiasi dari MSCs .....	20
Gambar 2.5	Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs .....	22
Gambar 3.1.	Kerangka Teori .....	27
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep.....	28
Gambar 4.1.	Rancangan penelitian .....	29
Gambar 4.2.	Alur penelitian .....	46
Gambar 5.2.	Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD3...	49
Gambar 5.3.	Konsentrasi Sitokin IL-10 dan growth factor TGF pada kondisi hipoksida dan normoksia pada secretom MSCs dibaca dengan ELISA.....	50
Gambar 5.4.	(A) Kondisi sel pada kelompok Sham.....	51
	(B) Kondisi sel pada sampel penelitian setelah dilakukan induksi STZ dengan dosis 60mg/kgBB perbesaran 100x .....	51
Gambar 5.5.	Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA SOD pada jaringan $\beta$ -pankreas masing-masing kelompok perlakuan.....	54
Gambar 5.6.	Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA IL-6 pada jaringan $\beta$ -pankreas masing-masing kelompok perlakuan.....	56





**DAFTAR TABEL**

Tabel 1.1	Originalitas Penelitian .....	5
Tabel 4.1.	Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i> .....	37
Tabel 5.1.	Efek Pemberian H-MSCs pada ekspresi gen SOD pada tikus model DMT	53
Tabel 5.2.	Uji <i>Post-hoc</i> LSD ekspresi MRNA SOD antar kelompok perlakuan .....	54
Tabel 5.3.	Uji <i>Post-hoc</i> LSD ekspresi MRNA IL-6 antar kelompok perlakuan .....	57



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearens</i> .....	74
Lampiran 2.	Analisis Statistika.....	75
Lampiran 3.	Hasil qRT-PCR.....	80
Lampiran 4.	Hasil Pengukuran GDS Tikus .....	81
Lampiran 5.	Dokumentasi Penelitian.....	82



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Diabetes mellitus tipe 1 (DMT1) adalah penyakit autoimun yang ditandai dengan kerusakan sel beta yang berkaitan dengan infiltrasi seluler dan respon inflamasi pada islets Langerhans<sup>1,2</sup>. Kegagalan aktivitas sel-sel imun yang menyebabkan kerusakan sel beta pankreas secara permanen berakibat hiperglikemia<sup>3-5</sup> sehingga penderita DMT1 membutuhkan terapi pengganti insulin seumur hidup<sup>6</sup>. Kondisi hiperglikemia menyebabkan peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan inflamasi<sup>7</sup>. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) terbukti melindungi sel dari stress oksidatif dengan mengeliminasi ROS melalui konversi anion menjadi hidrogen peroksida<sup>8,9</sup>. Peningkatan kadar ROS juga berkaitan dengan aktivasi sel-sel imun adaptif melalui pelepasan sitokin proinflamasi seperti *interleukin-6* (IL-6), *interleukin-1* (IL-1), dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) yang terlibat dalam DMT1<sup>10</sup>. Keberhasilan mengatur ekspresi sitokin-sitokin inflamasi dan menekan kadar ROS dapat memperbaiki patogenesis DMT1<sup>11</sup>.

Insidensi DMT1 semakin meningkat sejak tahun 2001 hingga 2020 dengan angka kejadian sekitar 15 kasus per 100.000 penduduk dunia<sup>12</sup>. Peningkatan kasus tertinggi terjadi pada anak-anak di bawah usia 15 tahun dengan puncak prevalensi terjadi pada usia di bawah 5 tahun dengan angka kematian dini mencapai 3-18% dari total kasus<sup>13</sup>. Prevalensi DMT1

di Indonesia meningkat tujuh kali lipat selama 10 tahun, dari 3,88 per 100 juta penduduk pada tahun 2010 menjadi 28,19 per 100 juta penduduk pada tahun 2020. Prevalensi nyata DMT1 pada anak diprediksi lebih tinggi karena tingginya angka *underdiagnosis* dan *misdiagnosis* pada tahun 2008-2020<sup>14</sup>. Kasus *underdiagnosis* dan *misdiagnosis* menyebabkan penderitaan DMT1 harus menggunakan terapi insulin seumur hidup dengan berbagai komplikasi lain yang terjadi<sup>6</sup>.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa pada DMT1 terjadi autoreaktif sel T dengan produksi ROS dan sitokin proinflamasi berlebihan yang berakibat kerusakan hingga kematian sel  $\beta$ -pankreas di islet Langerhans dan hilangnya sekresi insulin<sup>9</sup>. Kombinasi pelepasan berbagai sitokin proinflamasi yang diproduksi makrofag dan sel T CD4+ menyebabkan aktivasi *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) sehingga menghambat *cytochrome c oxidase*, *NADH dehydrogenase*, penghambatan *cycle enzyme aconitase* (TCA) mengakibatkan kematian sel  $\beta$ -pankreas<sup>15,16</sup>. Sitokin proinflamasi IL-6 juga merangsang respon imun selama inflamasi dengan membentuk kompleks IL-6R/gp130/STAT3 untuk diferensiasi sel T helper 17 (Th17), menghambat perkembangan sel T regulator (Treg) dan resistensi efektor T (Teff) yang menyebabkan hiperresponsif sistem imun<sup>17</sup>.

Secretom *hypoxia mesenchymal stem cells* (H-MSCs) lebih banyak mensekresikan *soluble molecule* dibandingkan normoksia, seperti sitokin *interleukin-10* (IL-10) dan *growth factor* seperti *transforming growth*

*factor-β* (TGF-β), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), dan *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)<sup>18,19</sup> yang dapat meningkatkan islet pankreas melalui penekanan kerusakan inflamasi dan penolakan antigen yang dimediasi kekebalan. Disisi lain, secretom MSCs dapat memperbaiki sel β-pankreas dengan merangsang proliferasi dan angiogenesis melalui peningkatan fosforilasi Akt dan Erk<sup>20,21</sup>. *Conditioned medium* MSCs dapat memperbaiki kondisi kerusakan endothel, inflamasi dan stress oksidatif pada tikus model *old diabetes* melalui penurunan kadar IL-6, TNF-α, ROS dan peningkatan eNOS<sup>22</sup>. IL-10 yang dilepaskan MSCs dapat mendownregulasi produksi sitokin inflamasi dan menghambat aktivasi sel T yang terkait dengan respon imun DMT1<sup>10</sup>. Modulasi IL-10 dan TGF-β dapat menekan frekuensi sel Th17 pada pasien DM<sup>23,24</sup>. Kontrol inflamasi pada DMT1 terbukti dapat menurunkan kadar gula darah. Berdasarkan hal tersebut, H-MSCs memiliki potensi dalam memperbaiki kondisi DMT1.

Efektivitas H-MSCs terhadap ekspresi SOD dan kadar sitokin inflamasi IL-6 pada DMT1 masih belum jelas. Adanya kemungkinan potensi H-MSCs sebagai agen alternatif untuk terapi DMT1, maka dalam penelitian ini akan diinvestigasi pengaruh H-MSCs pada dosis 0,5 cc dan 1 cc yang diberikan 7 hari sekali terhadap ekspresi SOD dan kadar IL-6 pada tikus model DMT1 yang di induksi streptozocin (STZ).

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah:  
"Apakah terdapat pengaruh pemberian H-MSCs terhadap ekspresi SOD dan kadar IL-6 pada tikus model diabetes mellitus type 1?"

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian H-MSCs terhadap ekspresi SOD dan kadar IL-6 pada tikus model diabetes mellitus type 1.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh peningkatan ekspresi SOD pada pada tikus model diabetes mellitus type 1 yang diinduksi streptozocin setelah pemberian H-MSCs pada dosis (P1) 0.5 cc dan (P2) 1 cc dibandingkan dengan kontrol.
2. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi IL-6 pada pada tikus model diabetes mellitus type 1 yang diinduksi streptozocin setelah pemberian H-MSCs pada dosis (P1) 0.5 cc dan (P2) 1 cc dibandingkan dengan kontrol.

## 1.4. Manfaat penelitian

### 1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian H-MSCs dalam dunia kedokteran sebagai agen regeneratif yang



berpengaruh terhadap penurunan kadar gula darah dan perbaikan DMT1.

#### 1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran H-MSCs dalam mengontrol DMT1. Selain itu penelitian ini dapat memberikan sumber informasi dan acuan bagi pembaca mengenai penelitian secara *in vivo* tentang pengaruh sekretom dari H-MSCs terhadap ekspresi gen SOD dan IL-6 tikus model diabetes tipe 1.

#### 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 <sup>25</sup>	<i>Transcriptional profiling reveals intrinsic mRNA alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients</i>	Eksperimen tal, Studi Klinik	MSCs dari <i>bone marrow</i> meneregulasi molekul immunomodulator y seperti VCAM-1, CXCL 12, HGF, CCL2, serta mengaktivasi jalur JAKSTAT pada pasien DMT1.
Jonathan Ribor, Guavri Caliaperoumal, Joseph Paquet, Catherine Boisson-Vidal,	<i>Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties</i>	<i>In Vitro</i> , Eksperiment al	Secretom MSCs memiliki efek angiogenik pada <i>sel Zucker diabetic fatty rats (ZDF)</i>

Herve Petite, Fani Anagnostou, 2017 <sup>26</sup>			<i>Diabetes type 2.</i>
Katarzyna Kornicka, jenny Houston, Krzysztof Marycz, 2018 <sup>27</sup>	<i>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</i>	Eksprimenta l, Studi klinik	Pemberian MSCs dapat menurunkan produksi ROS pada pasien DMT2.
Songyan Yu, Yu Cheng, Linxi Zhang, Yaqi Yin, Jing Xue, Bing Li, Zhengyuan Gong, Jieqing Gao, Yiming Mu, 2019 <sup>28</sup>	<i>Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects, improves long- term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats</i>	<i>In vivo,</i> Eksperiment al	Pemberian MSCs menurunkan ekpresi sitokin proinflamasi IL-6, IL1B, dan TNF-a serta meningkatkan 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 <sup>29</sup>	<i>Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two- dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes</i>	<i>In Vivo,</i> Eksperiment al	<i>Conditioned medium</i> dari <i>adipose tissue- derived stem cells</i> terbukti menurunkan produksi insulin dan PDX-1 pada tikus model DMT1 di induksi streptozocin.
Agung Putra,	<i>The Role of</i>	<i>In Vivo,</i>	Pemberian MSCs

Zakariya Hadi	<i>Mesenchymal Stem</i>	Eksperimen	menurunkan
Suwiryo, Adi	<i>Cells in Regulating</i>	al	kadar gula darah
Muradi Muhar,	<i>PDGF and VEGF</i>		tikus model
Agus	<i>during Pancreatic Islet</i>		diabetes melalui
Widyatmoko,	<i>Cells Regeneration in</i>		regulasi PDGF
Fifin Luthfia	<i>Diabetic Animal Model</i>		dan VEGF.
Rahmi, 2021 <sup>30</sup>			

Penelitian sebelumnya menggunakan MSCs dari *bone marrow* untuk meregulasi molekul immunomodulator seperti VCAM-1, CXCL 12, HGF, CCL2, serta mengaktifasi jalur JAKSTAT pada pasien DMT<sup>125</sup>. Penelitian lain juga menggunakan Secretom MSCs tanpa prekondisi hipoksia dengan mengamatai efek angiogenik pada sel *Zucker diabetic fatty rats (ZDF) diabetes type 2*<sup>26</sup>. Penelitian tentang MSCs yang dapat terbukti menurunkan produksi ROS pada pasien DMT<sup>27</sup>. Penelitian pemberian MSCs dapat menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6, IL-1B, dan TNF-a serta meningkatkan ekspresi IL-10 pada tikus model DMT<sup>28</sup>. Penelitian menggunakan *conditioned medium* dari *adipose tissue-derived stem cells* yang dapat menurunkan produksi insulin dan PDX-1 pada tikus model DMT1 di induksi streptozocin<sup>29</sup>. Serta penelitian lain juga menggunakan pemberian MSCs dapat menurunkan kadar gula darah tikus model DM melalui regulasi PDGF dan VEGF<sup>30</sup>. Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan secretom hipoksik MSCs yang di filtrasi dengan *tangential flow filtration (TFF)* sehingga diperoleh sekretom dengan ukuran dan kandungan tertentu, pada penelitian ini pemberian sekretom di berikan secara intraperitoneal dengan dosis 0.5 cc dan 1 cc, dibandingkan pada kontrol dengan mengukur

ekspresi gen SOD dan kadar IL-6 pada tikus model DMT1 yang di induksi STZ.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. *Superoxide Dismutase (SOD)*

##### 2.1.1. Definisi

SOD adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis dismutasi (atau partisipasi) superoksida ( $O_2^-$ ) radikal menjadi molekul oksigen biasa ( $O_2$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Superoksida diproduksi sebagai produk sampingan dari metabolisme oksigen dan, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Hidrogen peroksida juga merusak dan didegradasi oleh enzim lain seperti katalase. Dengan demikian, SOD merupakan pertahanan antioksidan penting di semua sel hidup yang terpapar oksigen radikal<sup>23</sup>.

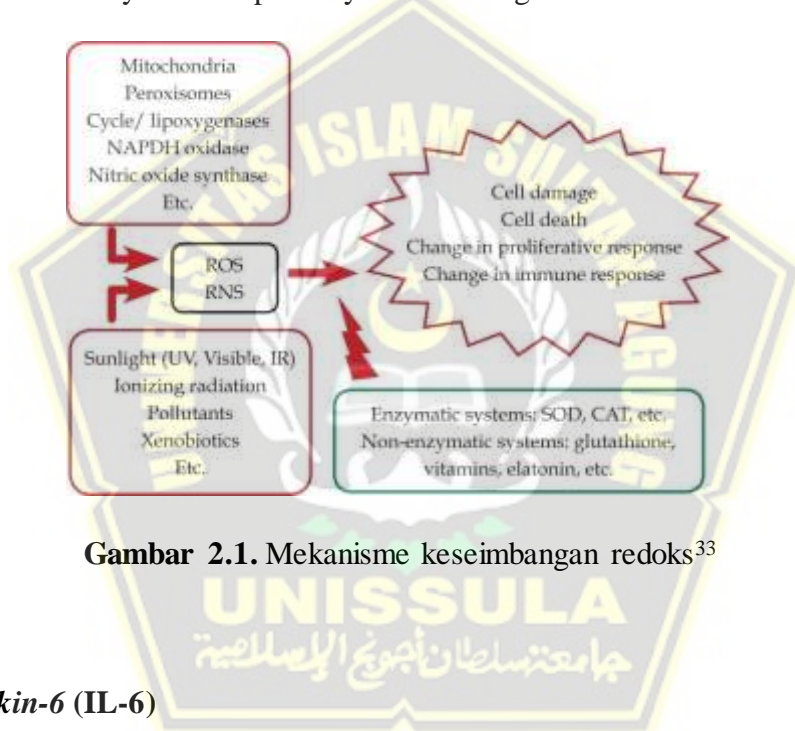
##### 2.1.2. Mekanisme Antioksidan SOD

ROS adalah radikal hidroksil ( $HO\cdot$ ) dan superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ), radikal peroksil dan alkoxy ( $RO_2\cdot$  dan  $RO\cdot$ ), oksigen singlet ( $^1O_2$ )<sup>3-5</sup>, serta hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan peroksida organik ( $ROOH$ ). ROS menyebabkan kerusakan molekul seperti lipid, asam amino dan DNA, ROS juga dapat mengaktifkan respons seluler enzimatik dan non-enzimatik, dengan potensi untuk memodifikasi proses lain yang akhirnya mengganggu ekspresi gen<sup>31</sup>.

Antioksidan adalah zat yang bergabung untuk menetralkan spesies oksigen reaktif yang mencegah kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan. Sistem antioksidan terdiri dari zat enzimatik dan non-enzimatik. Di antara



antioksidan enzimatis, *glutathione peroksidase* (GPx), katalase (CAT) dan *superoksida dismutase* (SOD)<sup>32</sup>. Di antara beberapa mekanisme antioksidan, SOD memainkan peran sentral dalam berbagai molekul reaktif yang dinetralkan. Meskipun masih belum ada korelasi langsung, model hewan menunjukkan bahwa kurangnya SOD menyebabkan perubahan degeneratif dengan berkurangnya sel viable pada pankreas<sup>33</sup>. Sebuah klinis juga mempelajari sistem antioksidan endogen pada pasien dengan diabetes mellitus menunjukkan konsumsi yang signifikan dari SOD dan glutathione peroksidase menyebabkan pecahnya keseimbangan redoks<sup>34</sup>.



**Gambar 2.1.** Mekanisme keseimbangan redoks<sup>33</sup>

## 2.2. Interleukin-6 (IL-6)

### 2.2.1. Definisi

IL-6 adalah interleukin yang bertindak sebagai sitokin pro-inflamasi dan miokin anti-inflamasi. Osteoblas mensekresi IL-6 untuk merangsang pembentukan osteoklas. Sel otot polos di tunika media banyak pembuluh darah juga memproduksi IL-6 sebagai sitokin pro-inflamasi.



Peran IL-6 sebagai miokin anti-inflamasi dimediasi melalui efek penghambatannya pada TNF-alpha dan IL-1 dan aktivasi IL-1ra dan IL-10<sup>35</sup>.

### 2.2.2. Peran IL-6 pada Proses Inflamasi Diabetes Mellitus

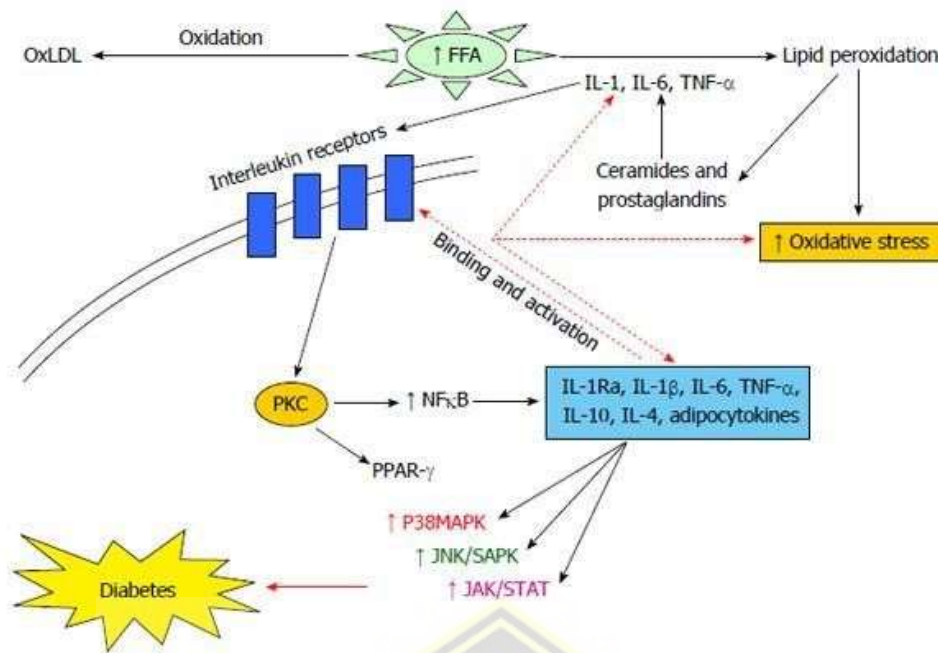
Konsentrasi IL-6 meningkat selama inflamasi, dan tidak tergantung pada etnis. Konsentrasi IL-6 yang cukup tinggi pada diabetes mellitus memainkan peran penting dalam gangguan fungsional, termasuk gerak rendah, fungsi kognitif dan mental, dan depresi. Tingkat yang sangat tinggi dari sitokin ini bahkan dapat memprediksi peningkatan kematian pada individu dengan DMT1. Di sisi lain, tingkat IL-6 yang rendah mewakili "inflamasi" yang lebih rendah<sup>36</sup>.

DMT1 adalah suatu kondisi yang memungkinkan atau menyebabkan munculnya beberapa penyakit komplikasi lain. Bahkan jaringan tua yang sehat, tanpa penyakit yang tampak secara klinis, memberikan beberapa fitur molekuler yang mengkhawatirkan. Fibroblast menunjukkan kemiripan yang luar biasa dengan kanker terkait fibroblas (CAFs), termasuk ekspresi tinggi mRNA encoding IL-6<sup>35</sup>.

DMT1 dapat menghasilkan peningkatan jumlah ROS, yang menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan, yang mengakibatkan stres oksidatif<sup>37</sup>. Peningkatan produksi ROS menyebabkan stress oksidatif, dan dapat memulai peradangan dan aktivasi sitokin pro-inflamasi, seperti *interleukin-2* (IL-2), IL-6, dan TNF- $\alpha$ , melibatkan beberapa jalur NF-kB, *hypoxia-inducible factor 1-alpha*

(HIF-1a), *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf-2), dan *activator protein 1* (AP-1)<sup>36,38</sup>. Sirtuins, suatu *histone deacetylase* yang bergantung pada nikotinamida adenin dinukleotida (NAD(+)), juga mendapat perhatian karena kemampuannya untuk meningkatkan umur karena dapat menunda penuaan seluler dan mendorong perbaikan kerusakan DNA. Telah ditunjukkan bahwa SIRT1, anggota keluarga Sirtuins, memiliki efek anti-inflamasi dengan menghambat pensinyalan NF- $\kappa$ B<sup>31</sup>.

Berbagai stresor termasuk DMT1 dapat mengaktifkan respon kerusakan DNA yang dapat memulai penghentian siklus sel melalui jalur p53/p21 yang melibatkan kaskade P38/MAPK dan jalur NF- $\kappa$ B. DMT1 dapat mempercepat penuaan sel dengan mensekresi faktor-faktor fenotipe sekretori terkait penuaan (SASP), termasuk IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, dan MMPs. Faktor SASP yang disekresikan dari sel tua bertanggung jawab atas peradangan kronis, yang mengakibatkan kematian sel pankreas. Gambar 2.2 menjelaskan jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam diabetes akibar stress oksidatif<sup>39,40</sup>.



**Gambar 2.2.** Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam diabetes mellitus akibat aktivasi reseptor inflamasi<sup>41</sup>

## 2.3. Diabetes Mellitus

### 2.3.1. Definisi

Diabetes Mellitus (DM) adalah suatu penyakit metabolik yang diakibatkan oleh karena disfungsi kerja insulin, destruksi beta pankreas dalam sekresi insulin, ataupun keduanya yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia). Hiperglikemia kronis yang diakibatkan oleh diabetes dikaitkan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ, terutama pembuluh darah, mata, ginjal, jantung, dan saraf<sup>42</sup>. DM merupakan penyakit dengan kelainan pengaturan kadar glukosa darah dengan potensi terjadinya hiperglikemia. Penyakit ini

diklasifikasikan dalam berbagai sub-tipe seperti *maturity-onset diabetes of the young (MODY)*, diabetes neonatal, diabetes gestasional, diabetes tipe 1, diabetes tipe 2, dan diabetes diinduksi steroid. Namun dari seluruh jenis sub-tipe diabetes, DM tipe 1 dan 2 adalah yang utama <sup>43</sup>.

### 2.3.2. Klasifikasi

Klasifikasi yang hingga kini paling diterima yaitu klasifikasi menurut *American Diabetes Association* <sup>44</sup> :

- I. Diabetes tipe 1 (kerusakan sel- $\beta$ , biasanya menyebabkan defisiensi insulin absolut) :
  - a. Dimediasi kekebalan
  - b. Idiopatik
- II. Diabetes tipe 2 (dapat berkisar dari resistensi insulin yang didominasi dengan defisiensi insulin relatif hingga defek sekresi yang didominasi oleh resistensi insulin)
- III. Diabetes mellitus gestasional
- IV. Jenis khusus lainnya
  - A. Cacat genetik fungsi sel- $\beta$  :

MODY 3 (Kromosom 12, HNF-1a), MODY 1 (Kromosom 20, HNF-4a), MODY 2 (Kromosom 7, glukokinase), Bentuk MODY lain yang sangat langka (misalnya, MODY 4: Kromosom 13, faktor promotor insulin-1; MODY 6: Kromosom 2, NeuroD1; MODY 7: Kromosom 9, karboksil ester lipase), Diabetes neonatal transien (paling sering cacat pencetakan ZAC / HYAMI pada 6q24),

Diabetes neonatal permanen (paling umum gen KCNJ11 yang mengkode subunit Kir6.2 dari saluran KATP sel- $\beta$ ), DNA mitokondria.

B. Cacat genetik dalam kerja insulin :

Resistensi insulin tipe A., Leprechaunisme, Sindrom Rabson-Mendenhall, Diabetes lipoatrofik.

C. Penyakit pankreas eksokrin :

Pankreatitis, Trauma / pankreatektomi, Neoplasia, Fibrosis kistik, Hemochromatosis, Pankreatopati fibrokalkulus.

D. Endokrinopati :

Akromegali, Sindrom Cushing, Glukagonoma, Feokromositoma, Hipertiroidisme, Somatostatinoma, Aldosteronoma.

E. Diinduksi obat atau bahan kimia :

Vacor, Pentamidin, Asam nikotinat, Glukokortikoid, Hormon tiroid, Diazoksida,  $\beta$ -Agonis adrenergic, Tiazid, Dilantin,  $\gamma$ -Interferon.

F. Infeksi :

Rubella bawaan, Sitomegalovirus, Lainnya.

G. Bentuk diabetes dimediasi kekebalan yang jarang :

*Stiff-man syndrome* , antibodi reseptor anti-insulin.

H. Sindrom genetik lainnya terkadang berhubungan dengan diabetes :

Sindrom Down, Sindrom Klinefelter, Sindrom Turner, Sindrom Wolfram, Ataksia Friedreich, Huntington chorea, Sindrom



Laurence-Moon-Biedl, Distrofi miotonik, Porphyria, Sindrom Prader-Willi.

## 2.4. Diabetes Tipe 1

### 2.4.1. Definisi

Diabetes Tipe 1 atau juga dikenal Diabetes Mellitus Tipe 1 (DMT1) merupakan penyakit dengan ciri defisiensi kadar insulin. Diabetes ini dibedakan menjadi :

1. Diabetes dimediasi sistem imun. Wujud dari diabetes ini dulunya disebut juga dengan istilah diabetes onset remaja ataupun diabetes bergantung pada insulin, yang diakibatkan oleh karena kerusakan sel-sel pankreas secara autoimun. Autoantibodi terhadap islet, autoantibodi terhadap insulin, autoantibodi untuk *tyrosine phosphatases* IA-2 dan IA-2b dan autoantibodi untuk GAD (GAD65) adalah marker dari kelainan imunitas pada diabetes tipe 1.
2. Diabetes idiopatik. Bentuk dari tipe ini adalah diabetes yang tidak diketahui pasti penyebabnya. Beberapa orang dapat mengalami kadar rendah insulin dalam darah yang meningkatkan kerentanannya terhadap ketoasidosis tanpa ditemukannya bukti kelainan kekebalan (autoimunitas) seperti pada diabetes tipe 1<sup>45</sup>.

### 2.4.2. Etiologi

Diabetes tipe 1 biasanya hadir pada individu tanpa riwayat keluarga. Hanya 10-15% pasien yang memiliki kerabat tingkat pertama atau



kedua dengan penyakit ini. Risiko seumur hidup untuk mengembangkan DMT1 meningkat secara signifikan pada kerabat pasien, sekitar 6% pada anak-anak mereka, 5% saudara kandung dan 50% anak kembar monozigot menunjukkan penyakit ini dibandingkan dengan prevalensi 0,4% dari populasi umum. Lebih dari 50 lokus risiko genetik DMT1 telah diidentifikasi oleh studi asosiasi genom dan meta-analisis (Paschou et al., 2018): HLA, CTLA-4, Insulin-VNTR, dan Gen-gen lain yang berpengaruh (FoxP3, PTPN22, AIRE, STAT3, HIP14, ERBB3, IFIH1).

Adanya autoantibodi pankreas yang bersirkulasi menunjukkan bahwa individu tersebut berisiko atau telah mengalami DMT1. Antibodi ini termasuk <sup>47</sup> :

1. antibodi sitoplasma sel pulau/islet *cell cytoplasmic antibodies* (ICA)
2. antibodi terhadap insulin/*insulin autoantibodies* (IAA)
3. asam glutamat dekarboksilase/*glutamic acid decarboxylase* (GAD65)
4. insulinoma-associated 2 (IA-2)
5. antibodi protein tirosin fosfatase dan
6. zinc transporter8 (ZnT8).

#### 2.4.3. Patofisiologi

Diabetes Mellitus tipe 1 dihasilkan dari penghancuran sel penghasil insulin di pankreas yang disebut sel beta oleh sistem imun adaptif. Proses ini didorong oleh interaksi yang tidak sepenuhnya dipahami antara genetika dan lingkungan dari seseorang. Faktor genetik yaitu, individu dengan ekspresi berlebih dari *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dari kelas HLA DR4, DQ8,

dan DQ2 yang meningkatkan kerentanannya terdapat pada sekitar 90% pasien DMT1) dan satu atau lebih faktor lingkungan menyebabkan pengenalan komponen sel beta sebagai autoantigen yang salah dikenali oleh sistem kekebalan sebagai benda asing yang mengarah ke serangan autoimun

48.

## **2.5. Streptozotocin (STZ)**

Diabetes diinduksi menggunakan streptozotocin pada sebagian besar hewan laboratorium, seperti: marmot, tikus, tikus, kelinci, monyet dan anjing. Namun, spesies hewan yang berbeda, bahkan dalam famili yang sama, seringkali memiliki kepekaan berbeda terhadap STZ. Diyakini bahwa hewan pengerat, terutama tikus, paling sensitif terhadap STZ, sementara manusia dan ikan memiliki penolakan paling tinggi (Gvazava et al., 2018).

Diabetes yang disebabkan oleh suntikan STZ tunggal sering disebut sebagai diabetes tipe 1 yang disebabkan oleh kerusakan sebagian pankreas oleh STZ. Hiperglikemia kronis dan glukotoksisitas yang sesuai adalah mekanisme patogenik utama diabetes dan komplikasinya. Model hewan diabetes yang diinduksi streptozotocin (STZ) adalah platform yang berguna untuk memahami glukotoksisitas sel  $\beta$  pada diabetes<sup>50</sup>.

## **2.6. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)**

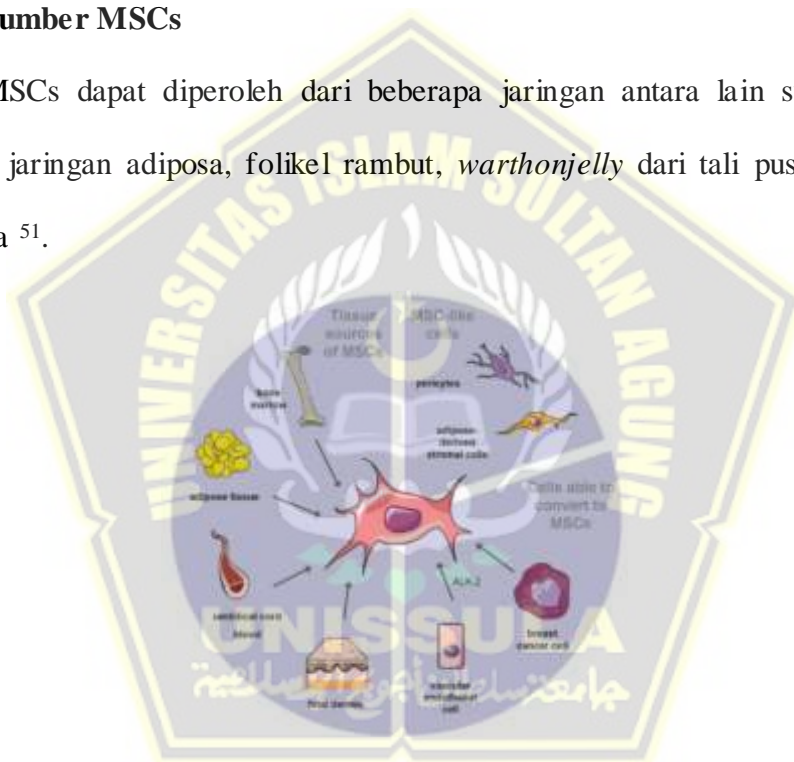
### **2.6.1. Definisi**

*Mesenchymal stem cells* (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti

osteosit, adipositas, dan neurosit. *Mesenchymal stem cell* dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adiposa, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat<sup>51</sup>. Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenik<sup>52</sup>.

### 2.6.2. Sumber MSCs

MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *Wharton jelly* dari tali pusat, dan plasenta<sup>51</sup>.

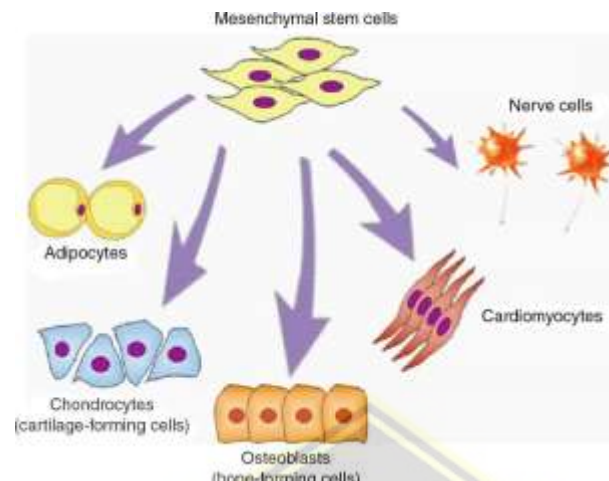


**Gambar 2.3.** Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs)<sup>53</sup>

### 2.6.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit<sup>54</sup>.

Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi sel<sup>55</sup>.



**Gambar 2.4.** Kemampuan diferensiasi dari MSCs<sup>56</sup>

#### 2.6.4. Peran MSCs

Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi

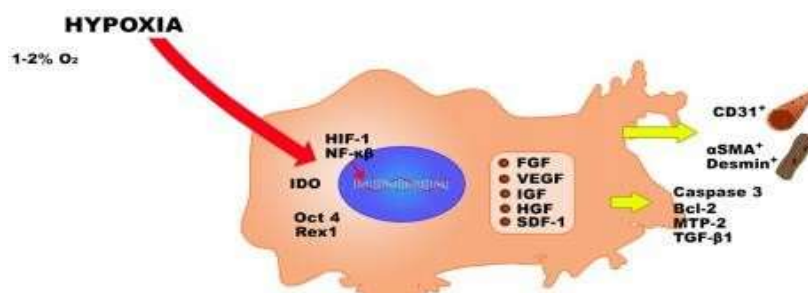
selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi <sup>57,58</sup>.

MSCs telah terbukti menunjukkan penghambatannya terhadap proliferasi sel-T yang diaktifkan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dan menginduksi dari proliferasi sel T-regulator. MSCs juga dikenal sebagai imunogenik lemah yang memberikan efek immunosupresif pada sel B, sel *Natural Killer* (NK), sel dendritik, dan neutrofil melalui berbagai mekanisme (Wada et al., 2013). MSC dapat bermigrasi ke lokasi peradangan untuk memberikan kemudian menahan efek imunomodulator dan anti-inflamasi yang kuat melalui interaksi sel-sel, antara MSC dan limfosit ataupun produksi faktor molekul terlarut (Zhao et al., 2016).

## 2.7.Hipoksia

### 2.7.1. Definisi

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, *self renewal*, dan pelekatan MSCs <sup>61</sup>. Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs (Gambar 2.5).





**Gambar 2.5.** Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS <sup>62</sup>

### 2.7.2. Mekanisme Fisiologi Seluler

Ketergantungan kuat pada oksigen untuk homeostasis metabolik dan kelangsungan hidup menyebabkan evolusi awal mekanisme molekuler yang memungkinkan sel, jaringan, dan organisme untuk beradaptasi dengan hipoksia. Respon adaptif ini terutama diatur oleh keluarga faktor transkripsi yang disebut *hypoxia-inducible factors* (HIFs) <sup>63</sup>.

HIF adalah heterodimer yang terdiri dari subunit protein HIF $\alpha$ , yang hanya diekspresikan selama hipoksia, dan subunit protein HIF1 $\beta$  yang diekspresikan secara konstitutif. Selama normoksia, subunit HIF $\alpha$  dihambat oleh kompleks VHL dan ditargetkan untuk degradasi proteasomal. Interaksi yang bergantung pada normoksia antara subunit HIF $\alpha$  dan kompleks VHL membutuhkan hidroksilasi dari dua residu prolin dalam domain *oxygen-dependent degradation* (ODD) dari HIF $\alpha$ . Reaksi hidroksilasi ini, yang dikatalisis oleh *HIF-regulating prolyl-4-hydroxylases*, digabungkan dengan dekarboksilasi oksidatif-ketoglutarat menjadi suksinat dan karbon dioksida (Lee et al., 2020).

Dalam hipoksia, bagaimanapun, subunit HIF- $\alpha$  lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerisasi dengan HIF-1 $\beta$  dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi peralihan dari metabolisme



bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik<sup>63</sup>. HIF-1 $\alpha$  diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 $\alpha$  dan HIF-3 $\alpha$  diekspresikan pada jaringan yang lebih terbatas dan pada tahap perkembangan, seperti paru-paru janin atau endotel vaskular yang berkembang. Dalam merefleksikan pola ekspresi jaringan spesifik mereka, HIF-1 $\alpha$  memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respons terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 $\alpha$  dan HIF-3 $\alpha$  memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen<sup>65</sup>.

## **2.8. Sekretom Mesenchymal Stem Cell**

### **2.8.1. Definisi**

Sekretom merupakan sekret dari MSCs. Sekretom MSCs kaya akan faktor terlarut, termasuk di dalamnya yaitu terdapat sitokin, kemokin, molekul imunomodulator, dan faktor pertumbuhan. Sekretom dengan kandungan molekul-molekulnya dapat memperbaiki jaringan yang rusak dengan memodulasi dan mendorong pembentukan jaringan baru<sup>67</sup>.

### 2.8.2. Komposisi

Komposisi dari sekretom MSCs telah diteliti untuk diidentifikasi molekul mana saja yang menjadi kunci dan bertanggung jawab atas potensi terapeutik dari MSCs, dimana tujuan akhirnya adalah substitusi dari terapi berbasis sel (MSCs) menjadi terapi tanpa sel untuk mencapai efek yang diharapkan. Molekul faktor utama yang terdeteksi dalam sekretom MSC <sup>67</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.

### 2.9. Pengaruh H-MSCs terhadap ekspresi SOD dan IL-6 pada DMT1

MSCs mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang mendukung regenerasi sel  $\beta$ -pankreas, antara lain seperti sitokin antiinflamasi IL-10, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ 1), angiopoietin, IL-1, IL-6, dan IFN  $\gamma$  yang akan menginduksi proliferasi sel dan menekan produksi ROS. Kondisi hipoksia semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan *growth factor* <sup>54,61</sup> selanjutnya di sebut H-MSCs. Pada MSC yang berasal dari gingiva (G-MSc) hipoksia memodulasi profil sitokin, dengan merangsang produksi sitokin anti-inflamasi, seperti IL-10, menggeser profil sitokin ke arah mediator anti-inflamasi <sup>68</sup>.

Penyakit DM tipe 1, sitokin IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  yang disekresikan oleh makrofag dan sel T memiliki peran besar dalam proses kerusakan sel. Sitokin-sitokin tersebut adalah penginduksi utama stres sel  $\beta$  yang bertanggung jawab atas tingkat kematian sel  $\beta$  hewan pengerat dan manusia pada model eksperimental dari DMT1<sup>69</sup>.

Sekretom MSCs dapat memperbaiki sel  $\beta$ -pankreas dengan merangsang proliferasi dan angiogenesis melalui peningkatan fosforilasi Akt dan Erk<sup>20,21</sup>. IL-10 pada H-MSCs dapat memperbaiki kondisi kerusakan endotel, inflamasi dan stress oksidatif pada tikus model *old diabetes* melalui penurunan kadar IL-6, TNF- $\alpha$ , ROS dan peningkatan eNOS<sup>22</sup>. IL-10 dalam H-MSCs juga dapat mendownregulasi produksi sitokin inflamasi dan menghambat aktivasi sel T yang terkait dengan respon imun DMT1<sup>10</sup>. IL-10 dan TGF- $\beta$  juga merupakan inhibitor poten sitokin proinflamasi Th1 seperti IL-2 dan INF- $\gamma$ <sup>23</sup>. Hasil penelitian menunjukkan ditemukan bahwa dari berbagai sitokin antiinflamasi, IL-10 adalah kandidat sitokin yang memiliki efek paling signifikan dalam meningkatkan viabilitas sel islet yang diinduksi sitokin pro-apoptotik TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  dan menurunkan apoptosis yang terjadi, namun efek serupa tidak ditemukan pada sel yang diinduksi IL-1 $\beta$ . Secara keseluruhan sekretom dapat memberikan perbaikan sekresi insulin pada sel islet yang sebelumnya rusak<sup>70</sup>.

## BAB III

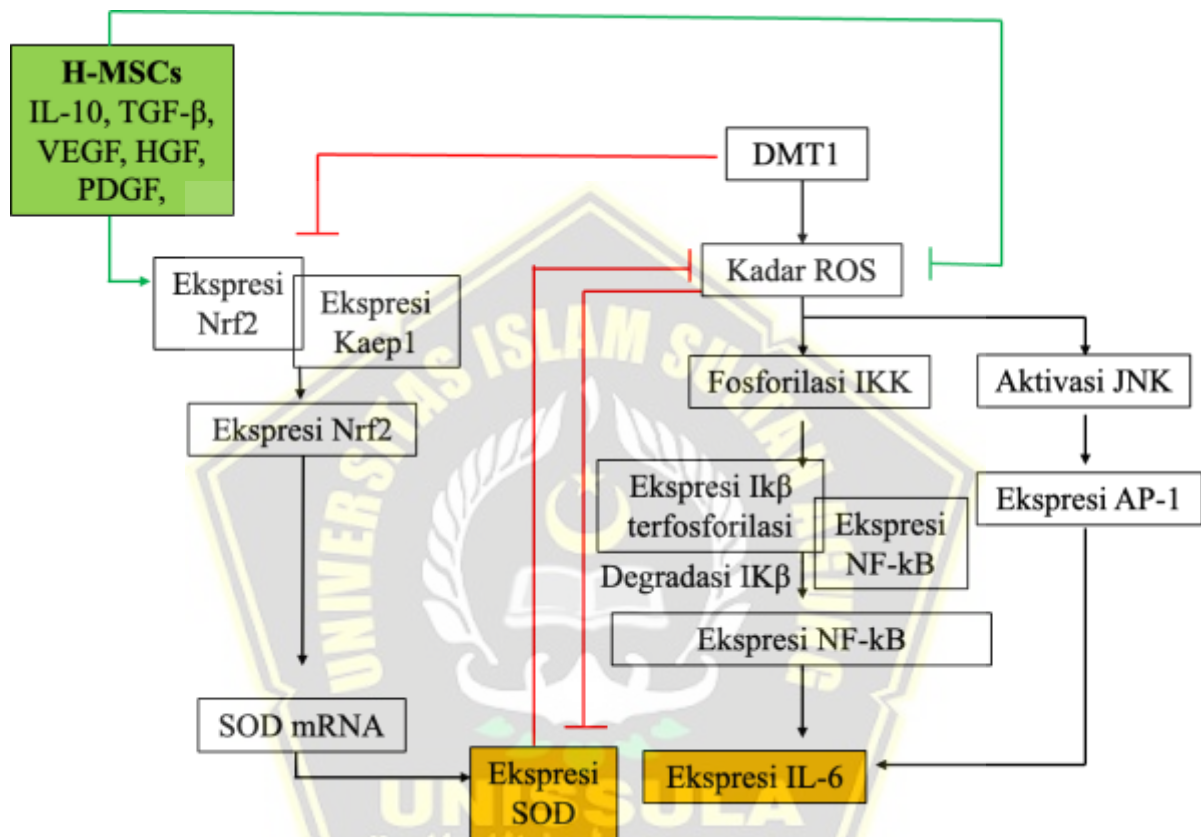
### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

#### 3.1. Kerangka Teori

Induksi STZ menginduksi stress oksidatif (ROS) yang 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- $\gamma$ <sup>17,71</sup>. Pelepasan sitokin tersebut menyebabkan inflamasi yang berdampak terhadap kerusakan islet Langerhans dan kematian pada sel  $\beta$ -pankreas. Kerusakan tersebut menyebabkan penghambatan sekresi insulin hingga resistensi insulin yang menyebabkan kondisi hiperglikemia. Disisi lain, peningkatan kadar ROS menyebabkan penghambatan ekspresi Nrf2 yang menyebabkan penurunan produksi enzim antioksidan seperti SOD<sup>72</sup>. ROS yang meningkat juga menyebabkan mengaktifkan jalur JNK dan meningkatkan ekspresi AP-1 sehingga menginduksi pelepasan faktor transkripsi seperti IL-6<sup>6</sup>.

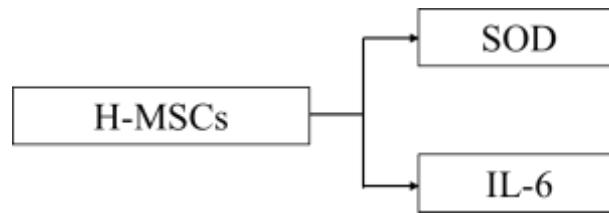
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal<sup>54</sup>. Sitokin-sitokin dan mediator–mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (H-MSCs). Pada penelitian ini sekretom diberikan secara

intraperitoneal. Komponen IL-10 pada H-MSCs menginduksi aktivitas enzim SOD sehingga akan menekan kadar ROS. IL-10 dan TGF- $\beta$  sebagai sitokin anti-inflamasi menghambat ekspresi sitokin inflamasi seperti IL-6 yang akhirnya menyebabkan proliferasi sel  $\beta$ -pankreas sehingga terjadi sekresi insulin dan kadar gula darah menurun<sup>8,26,29</sup>.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

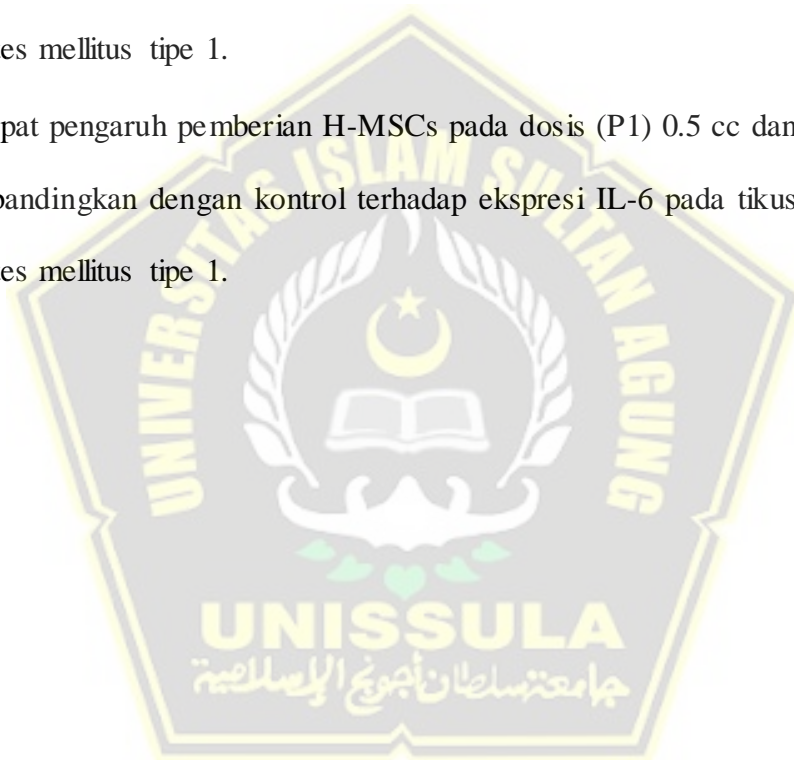
### 3.2. Kerangka Konsep



**Gambar 3.1.** Kerangka konsep

### 3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs pada dosis (P1) 0.5 cc dan (P2) 1 cc dibandingkan dengan kontrol terhadap ekspresi SOD pada tikus model diabetes mellitus tipe 1.
2. Terdapat pengaruh pemberian H-MSCs pada dosis (P1) 0.5 cc dan (P2) 1 cc dibandingkan dengan kontrol terhadap ekspresi IL-6 pada tikus model diabetes mellitus tipe 1.





## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan bobot badan 200-250 gram  $\pm$  10 gr (cv = 5%).

Perlakuan terdiri dari:

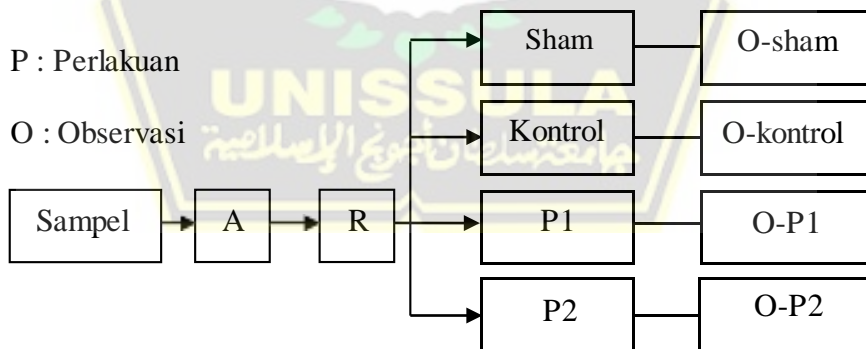
1. Kelompok: Sham (tidak diberi perlakuan),
2. Kelompok: Kontrol (DMT1 diinduksi STZ)
3. Kelompok: P1 (pemberian H-MSCs secara ip dosis 0.5 cc),
4. Kelompok: P2 (pemberian H-MSCs secara ip dosis 1 cc),

A : Adaptasi

R : Randomisasi

P : Perlakuan

O : Observasi



**Gambar 4.1.** Gambar rancangan penelitian

## 4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 4.2.1. Variabel Penelitian

#### 4.2.1.1. Variabel bebas

Variabel bebas: H-MSCs dosis 0.5 cc dan 1 cc.

#### 4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel dependen: ekspresi SOD dan kadar IL-6.

### 4.2.2. Definisi Operasional

#### 4.2.2.1. Sekretom MSCs Hipoksia (H-MSCs)

Sekretom adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSCs. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs secara hipoksia. Kemudian dilakukan filtrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*. H-MSCs kemudian diinjeksikan secara intraperitoneal<sup>29</sup> kepada beberapa kelompok yaitu kelompok P1 di berikan H-MSCs 0.5 cc dan kelompok P2 di berikan H-MSCs 1 cc<sup>73</sup>.

Skala: Rasio

#### 4.2.2.2. Ekspresi SOD

Ekspresi SOD adalah ekspresi gen antioksidan yang memiliki peran dalam menurunkan level ROS akibat kondisi hiperglikemia. Sampel jaringan diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode

*reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

#### **4.2.2.3. Ekspresi IL-6**

Ekspresi IL-6 adalah ekspresi gen sitokin proinflamasi IL-6 dalam sampel jaringan sel pankreas yang di isolasi dari tikus galur wistar yang diukur konsentrasinya menggunakan metode qRT-PCR.

Skala: Rasio

### **4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian**

#### **4.3.1. Subyek Penelitian**

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House Integrated Biomedical Laboratory*, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Tikus model DMT1 terjadi setelah paparan STZ dosis 60mg/kgBB dan dikonfirmasi terjadi peningkatan kadar gula darah > 200 mg/dL pada hari ke-7 setelah induksi.

#### 4.3.2. Sampel Penelitian

##### 4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Tikus jantan putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Bobot badan 200-250 gram.

##### 4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

##### 4.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

1. Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.
2. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

#### 4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 4 perlakuan yaitu perlakuan Sham (tidak diberi perlakuan), Kontrol (hanya diberi induksi STZ), P1 (Pemberian H-MSCs secara ip dengan dosis 0.5 cc), dan P2 (Pemberian H-MSCs secara ip dengan dosis 1 cc).

#### 4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 6 ekor sampel per kelompok. Peneliti ini menggunakan 24 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 6 ekor sampel per kelompok.

Pada penelitian ini setiap kelompok diberi tambahan 1 ekor tikus. Kelompok sampel dalam penelitian disebar menjadi empat kelompok, maka besar sampel dapat dirumuskan:

Besar sampel = Jumlah kelompok penelitian x 6 ekor/kelompok = 4 x 6 ekor = 24 ekor tikus jantan galur *wistar*.

#### 4.4. Alat dan Bahan

##### 4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO<sub>2</sub>, dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Selain itu penelitian ini menggunakan untuk induksi STZ dan pemberian H-MSCs yaitu spuit 3 ml, jarum suntik 23-G, alat ukur glukosa digital, kandang tikus, tabung centrifuge 1,5ml, sentrifugator, alat qRT-PCR (Illumina) yang digunakan untuk analisis ekspresi gen SOD dan *ELISA reader* (Biorad) untuk analisis kadar IL-6.

#### 4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas 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, Xylasine. Makanan standard hewa pengerat (Harlan), Natrium sitray 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 ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke petri dish, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplet yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% C<sub>2</sub>.

7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplet baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

#### 4.5.3. Validasi sel MSCs dengan pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BD™ accutase™ *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi  $1 \times 10^7$  sel /ml di dalam BD Pharmingen™ Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline (PBS) buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi  $5 \times 10^6$  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  $\mu$ 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*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD29	5µl
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD90	5µl
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD45	5µl
4	APC <i>Mouse anti-human</i> CD31	5µl
5	Kosong	-
	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20µl
6	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20µl
7	hMSC <i>positive cocktail</i>	20µl
	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20µl

7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500µl *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. Proses Hipoksia

1. MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan *oxygen meter* ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.

4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator 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 H-MSCs yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis P1 dan P2.

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

1. Sekitar 5 hari sebelum percobaan dimulai, kandang dua sampai enam tikus jantan pada suhu  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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 sampai 1 g. Sebar hewan secara acak menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. (Jumlah tikus harus sama untuk setiap kelompok)
3. Pada percobaan hari 1, puasakan semua tikus selama 6 sampai 8 jam ,kemudian dilakukan pengecekan gula darah puasa 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 DM Tipe 1 tahap awal: Pada hari percobaan ke-7,14,21,28 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 >150 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  $>150$  mg/dl dan atau menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik pada tikus yang disuntik STZ dibandingkan dengan tikus sham.
11. Biasanya 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.
13. Tikus DMT1 yang telah terkonfirmasi di treatment H-MSCs pada hari ke 7, 14, dan 21 dengan dosis P1 diinjeksi H-MSCs  $0.5$  cc dan P2 H-MSCs  $1$  cc. Tikus sham tidak di berikan treatment apapun, sedangkan tikus control diberikan perlakuan STZ  $60\text{mg/kgBB}$ .

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

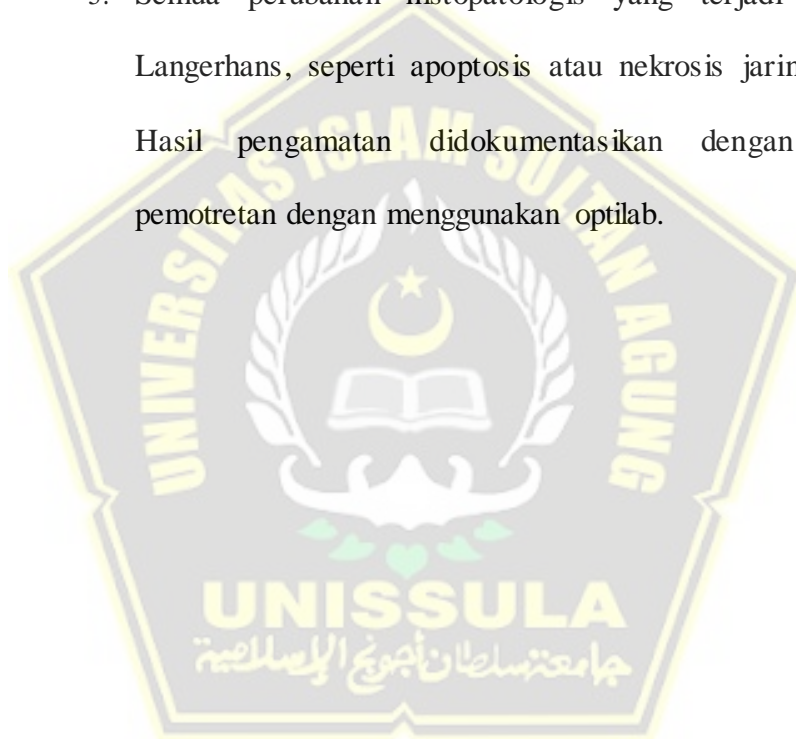
1. Terminasi tikus dengan menggunakan cocktail dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan  $10$  mL cocktail digunakan Ketamine  $50$  mg/kgBB, Xylazine  $10$  mg/kgBB dan Acepromazine  $2$  mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuskular.



2. Setelah tikus mati, dilakukan koleksi organ pankreas kemudian disimpan dalam *cryotube* yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  dalam RNA later.

#### 4.5.7. Pemeriksaan histopatologi jaringan pankreas

1. Sampel pancreas pada kelompok sham dan control di warnai dengan *hematoxylin* dan *eosin stain*.
2. Diamati secara morfologi
3. Semua perubahan histopatologis yang terjadi pada pulau Langerhans, seperti apoptosis atau nekrosis jaringan, dicatat. Hasil pengamatan didokumentasikan dengan melakukan pemotretan dengan menggunakan optilab.



#### 4.5.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel pankreas sebanyak 100 mg diambil dari RNA later kemudain dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
2. Potongan pangkreas ditumbuk menggunakan micropastle dan ditambahkan lagi RNAIso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
3. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
4. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (*fase liquid*), lapisan kedua berupa DNA (*fase semisolid*) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
5. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanolol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
6. Tabung eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.

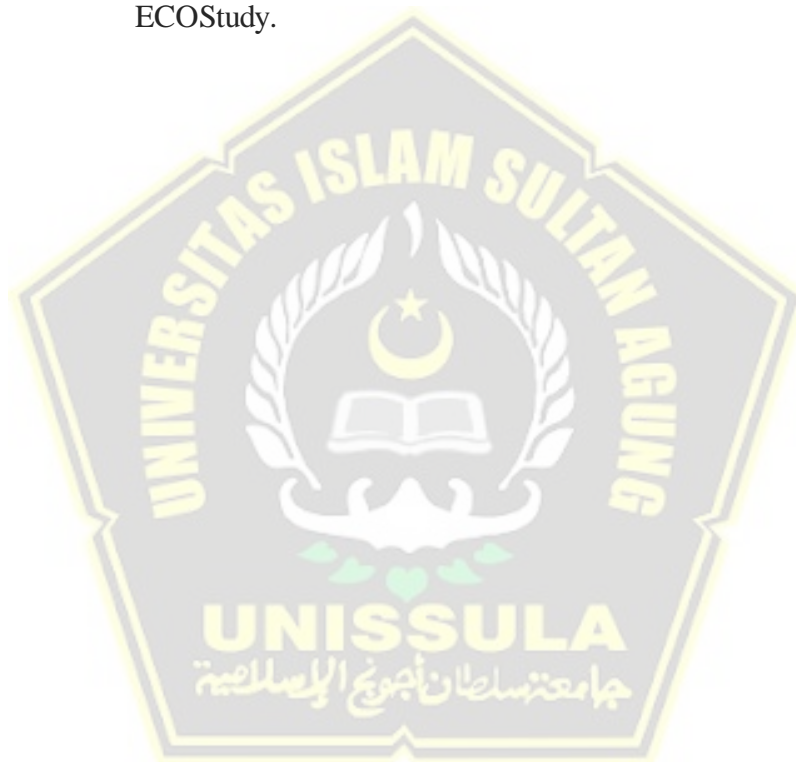
7. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan *diethyl pyrocarbonat* (DEPC) lalu bolak balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40C.
8. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50  $\mu\text{m}$ . Campuran diinkubasi pada suhu 55<sup>o</sup>C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80<sup>o</sup>C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
9. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1  $\mu\text{l}$  OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10  $\mu\text{l}$ , kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70<sup>o</sup>C.
10. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4  $\mu\text{l}$ , DEPC-Treated H<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{l}$ , ReverTraAce 1  $\mu\text{l}$ . Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 250C selama 5 menit, 42<sup>o</sup>C selama 50 menit dan 85<sup>o</sup>C selama 5 menit.

#### 4.5.9. Pembacaan ekspresi SOD dan IL-6 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi mRNA dari SOD dan Il-6 dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3  $\mu\text{l}$  cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and MgCl<sub>2</sub>) sebanyak 12,5  $\mu\text{l}$ ,

primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6  $\mu$ l untuk primer forward dan reverse dan 8,3  $\mu$ l Nuclease Free Water.

3. PCR produk kemudian dianalisis dengan qRT-PCR dan peningkatan CT SOD di kalkulasi terhadap gen house keeping  $\beta$ -actin.
4. Kuantifikasi qRT-PCR dengan menggunakan software ECOSTudy.



#### 4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

##### 4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

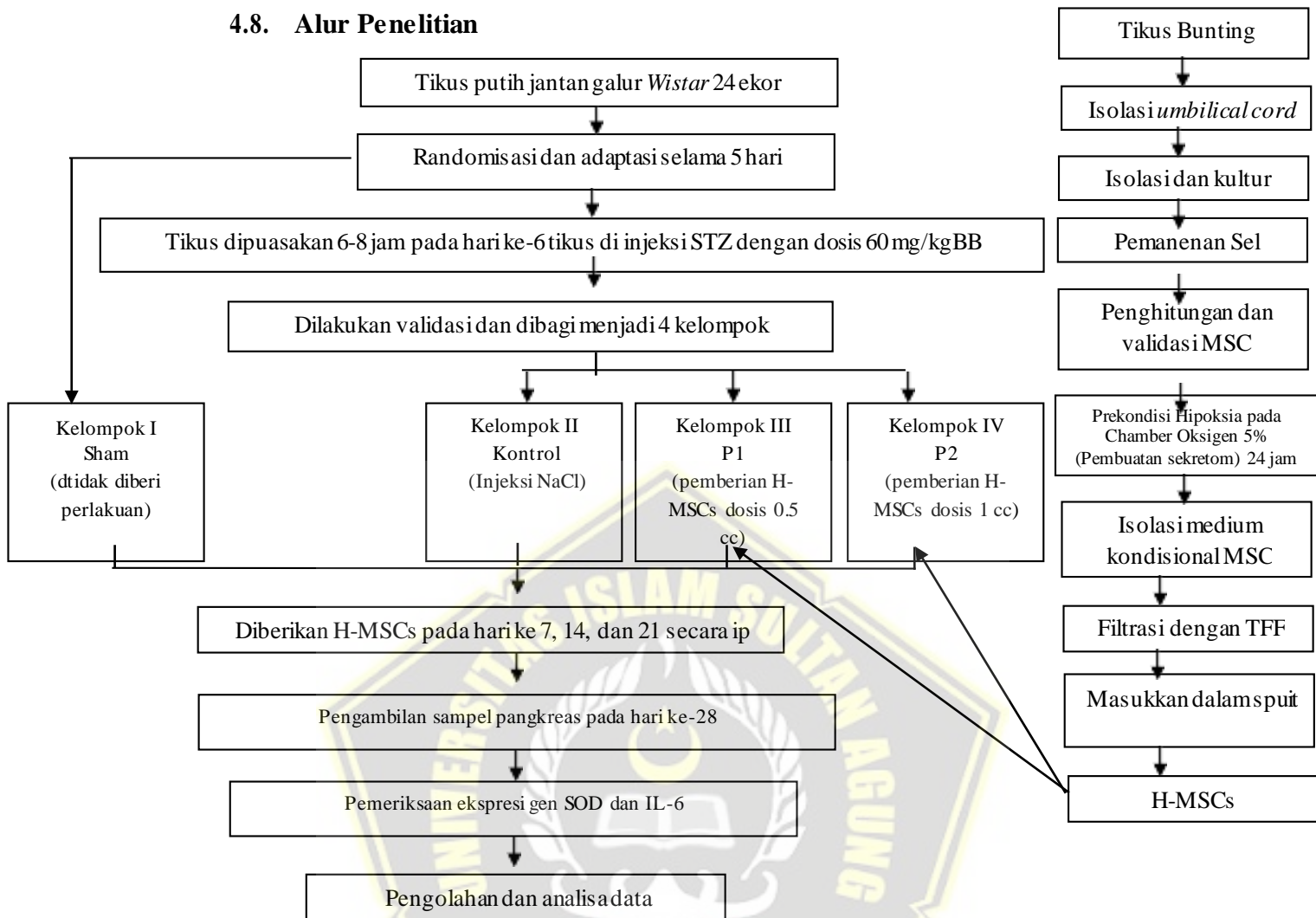
##### 4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari – Maret 2022.

#### 4.7. Analisa Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene*. Sebaran data normal dan varian data sama, selanjutnya dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. 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**

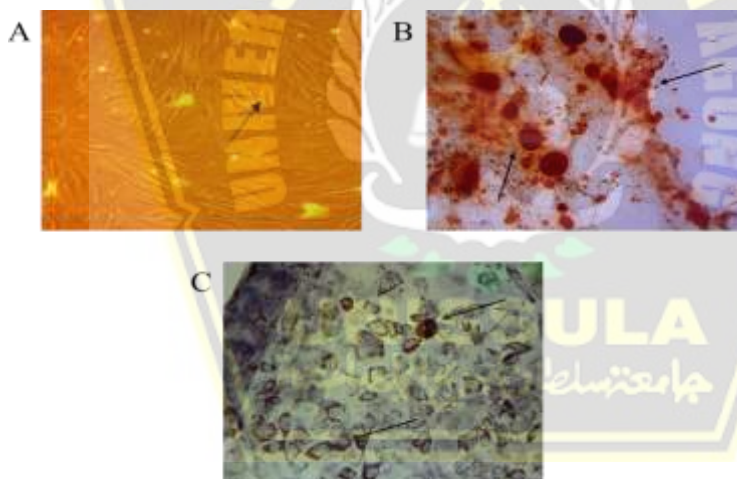
Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Februari 2022 hingga Maret 2022 di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 250-300 gram dan berumur 4-6 bulan yang di induksi STZ dosis 60 mg/kgBB tikus secara intraperitoneal. Dalam penelitian ini dikumpulkan sampel sebanyak 20 ekor dan tidak ada sampel yang dieklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol dan kelompok sham. Kelompok perlakuan pertama (P1) terdiri atas 5 hewan uji model DMT1 induksi STZ dengan pemberian H-MSCs dosis 0.5 cc dan kelompok kedua (P2) terdiri atas 5 hewan uji model DMT1 induksi STZ dengan pemberian H-MSCs dosis 1 cc. Kelompok kontrol terdiri dari 5 hewan uji model DMT1 induksi STZ yang mendapatkan NaCl, sedangkan kelompok sham adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

#### **5.1. Hasil Penelitian**

##### **5.1.1. Isolasi *Hypoxic Secretome Mesenchymal Stem Cell* (H-MSCs)**

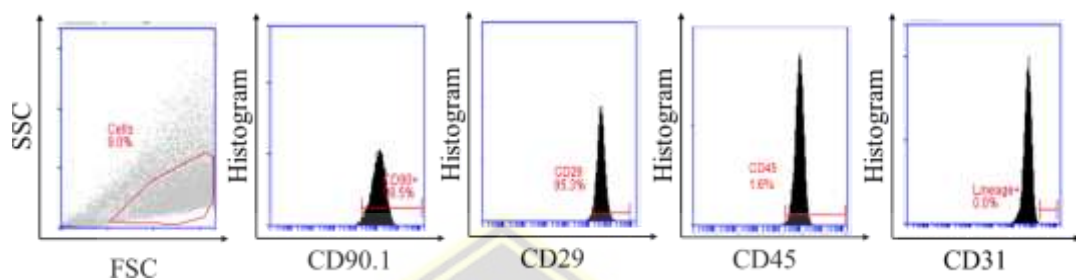
Isolasi MSCs dilaksanakan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, dengan standart steril. MSCs diisolasi dari *umbilical cord* tikus bunting

usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask steril T75 dengan medium komplet khusus. Kultur MSCs yang adherent dan konfluen lebih dari 80% setelah pasase ke-4 memiliki *morfologi spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis (Gambar 5.1- A). MSCs memiliki ciri khusus dapat berdiferensiasi menjadi sel osteosit, yang di tandai dengan endapan kalsium berwarna merah setelah pewaranaan dengan *Alizarin red dye* (Gambar 5.1-B). Tampak gambaran MSCs yang berdiferensiasi adipogenik ditunjukkan adanya desposisi lemak yang ditandai dengan warna merah menggunakan pewarnaan oil red O (Gambar 5.1-C). Dari hasil pengamatan ini sel hasil isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca yaitu dapat diferensiasi menjadi lineage yang baru serta memiliki kemampuan multipotensi.



**Gambar 5.1.** (A) Isolasi MSCs dengan konfluen 80% didapatkan gambaran sel berbentuk spindle-like (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Diferensiasi osteogenik menggunakan pewarnaan Alizarin Merah muncul pada populasi MSC pada perbesaran 100x. (C) Diferensiasi adipogenik menggunakan *Oil Red O* muncul pada populasi MSC pada perbesaran 100x.

Hasil isolasi sel MSCs juga divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan MSCs mampu mengekspresikan beberapa *surface marker* penanda MSCs. MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,50%), CD29 (95,30%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (0,00%) (Gambar 5.2).

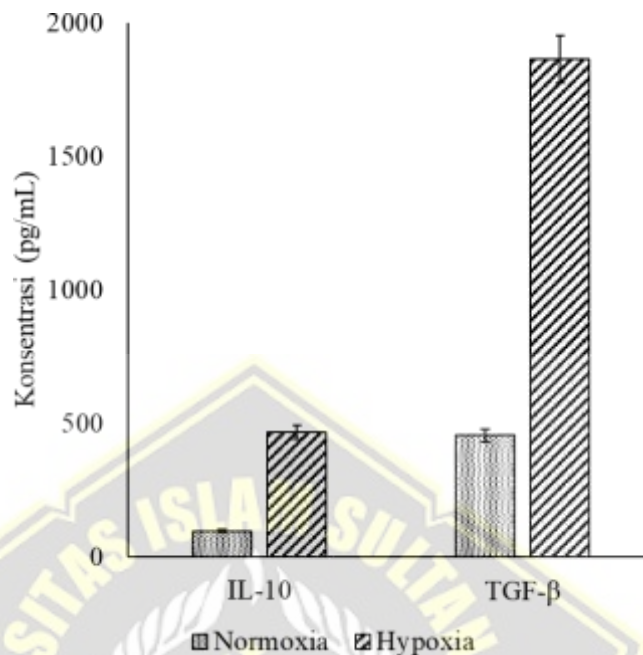


**Gambar 5.2.** Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31

Sel MSCs diprekondisi hipoksia selama 24 jam dalam chamber hipoksia, selanjutnya medium kultur MSCs yang mengandung secretome dikoleksi dan dilakukan filtrasi menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) hingga diperoleh molekul dengan ukuran 10-50 kDa yang mengandung *interleukin-10* (IL-10) dan *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ). IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi yang menunjukkan fungsi dominan immunosupresif dan dapat dieksresikan MSC pada kondisi hipoksia, IL-10 memiliki ukuran ~18kDa monomer<sup>70</sup>.

Kondisi hipoksia menyebabkan peningkatan konsentrasi IL-10 hingga  $467 \pm 25.30$  pg/mL dibandingkan kondisi normoksia MSCs hanya mengekresikan IL-10 sebanyak  $96 \pm 5.50$  pg/mL. Hal tersebut juga terjadi pada konsentrasi TGF- $\beta$  yang mengalami peningkatan 3x lipat pada kondisi hipoksia  $1865 \pm 87$  pg/mL dibandingkan kondisi normoksia  $454 \pm 24$  pg/mL (Gambar 5.3).

Hal ini membuktikan bahwa prekondisi hipoksia secara signifikan meningkatkan sekresi sitokin anti-inflammasi dan *growth factor* <sup>76</sup>.

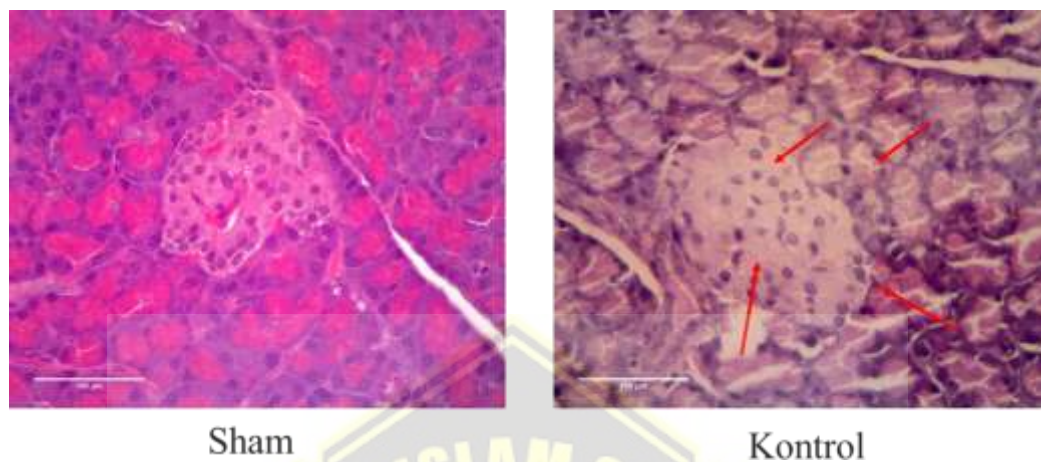


**Gambar 5.3.** Konsentrasi sitokin IL-10 dan growth factor TGF-β pada kondisi hipoksida dan normoksia pada secretom MSCs dibaca dengan ELISA. Data di representasikan dalam 3 kali ulangan  $\pm$  SD.

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. Pada penelitian ini ditemukan penurunan jumlah dan perbesaran sel  $\beta$ -pankreas tikus (Gambar 5.4).



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.





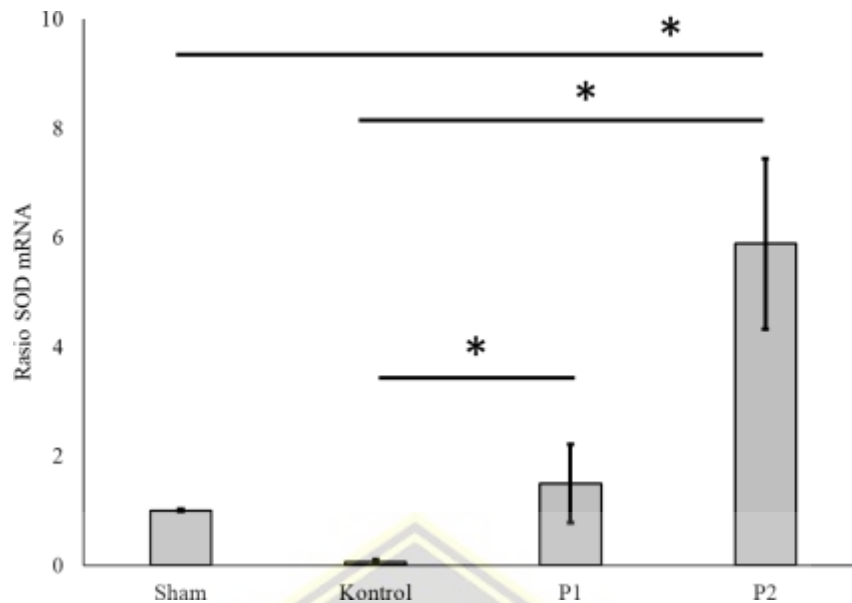
**Tabel 5.1.** Data hasil Penelitian Ekspresi Gen IL-6 dan SOD

Variabel	Kelompok				pvalue
	Sham n=5 Mean±SD	Kontrol n=5 Mean±SD	P1 n=5 Mean±SD	P2 n=5 Mean±SD	
Ekspresi gen IL-6	1.00±0.02	6.78±0.67	1.88±0.88	1.24±0.17	
<i>Saphiro wilk</i>	0.164	0.552	0.861	0.714	
<i>Levene test</i>					0.077
<i>One way Anova</i>					0.000
Ekspresi gen SOD	1.00±0.01	0.07±0.03	1.50±0.72	5.89±3.55	
<i>Saphiro wilk</i>	0.959	0.813	0.113	0.399	
<i>Levene test</i>					0.065
<i>One way Anova</i>					0.018

### 5.1.2. Efek Pemberian H-MSCs pada Ekspresi Gen SOD pada Tikus Model

#### DMT1

SOD adalah enzim yang berperan dalam mencegah pembentukan ROS sehingga tidak terjadi aktivasi jalur inflamasi. DMT1 dikaitkan dengan peningkatan aktivitas SOD, serta kadar tiol total, untuk mengkompensasi pembentukan ROS<sup>77</sup>. Penurunan ekspresi SOD berkaitan dengan keparahan kondisi DM yang menunjukkan semakin banyak kerusakan pada sel  $\beta$ -pankreas. Kondisi DMT1 menunjukkan penurunan signifikan ekspresi gen SOD. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan ekspresi gen SOD pada kelompok yang mendapat H-MSCs dosis 1 mL dibandingkan dengan dosis 0,5 mL (Gambar 5.5). Hal ini menunjukkan bahwa H-MSCs dapat mencegah stress oksidatif pada DMT1.



**Gambar 5.5.** Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA SOD pada jaringan  $\beta$ -pankreas masing-masing kelompok perlakuan. \* Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ( $p < 0.05$ ).

**Tabel 5.2.** Uji *Post-hoc* LSD ekspresi MRNA SOD antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sham	Kontrol	0.000	-2.4817	4.3481
	P1	0.745	-3.9143	2.9155
	P2	0.011	-8.3014	-1.4715
Kontrol	P1	0.002	-4.8475	1.9823
	P2	0.004	-9.2346	-2.4047
P1	P2	0.018	-7.8020	-0.9721

Uji *Post Hoc*: \* *mean difference significant*  $P < 0.05$

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian H-MSCs 0.5 ml ( $1.49 \pm 0.71$ ) dan 1 ml ( $5.88 \pm 1.55$ ) secara berturut-turut meningkatkan ekspresi gen SOD hingga 24.83 dan 98 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol

perlakuan STZ 60mg/kgBB ( $0.06 \pm 0.03$ ). Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi gen SOD dibandingkan kontrol, namun tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara P1 dibandingkan kelompok sham ( $1.00 \pm 0.04$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian H-MSCs 1mL mampu meningkatkan ekspresi gen SOD setara dengan kondisi sehat.

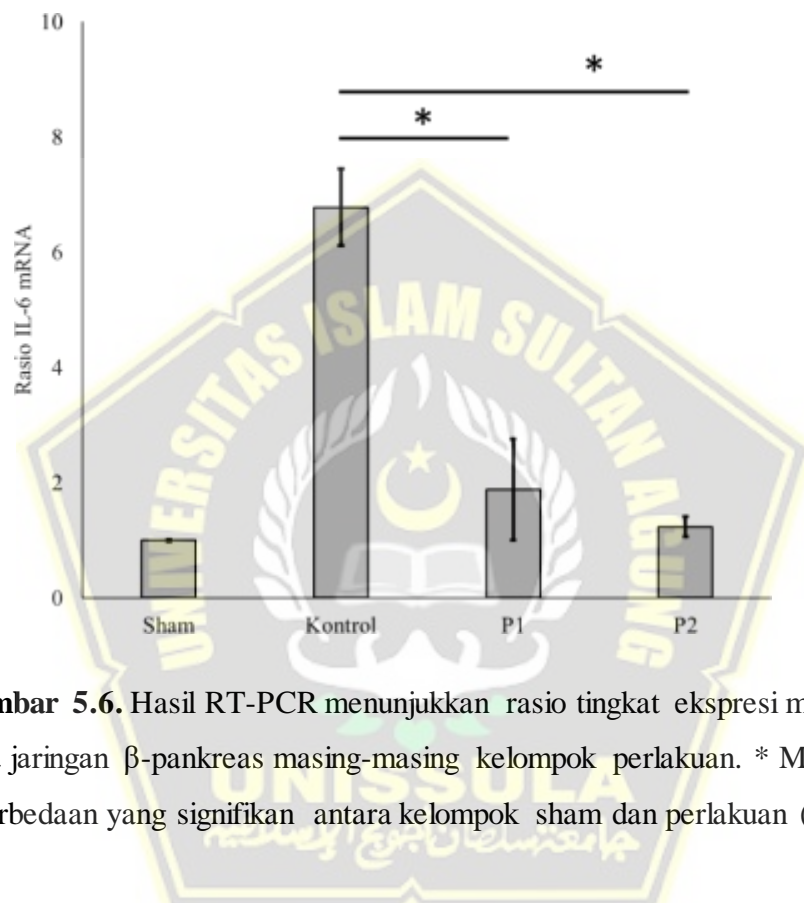
Data deskriptif ekspresi gen masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok  $p > 0,05$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One-way ANOVA*, dan dilanjutkan uji *Post-hoc* LSD. Uji beda *One-way ANOVA* didapatkan  $p < 0,05$ . Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.5 dan tabel 5.2. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan H-MSCs dengan kelompok kontrol.

### **5.1.3. Efek Pemberian H-MSCs pada Ekspresi Gen IL-6 pada Tikus Model**

#### **DMT1**

Interleukin-6 adalah sitokin proinflamasi yang ekspresinya dipengaruhi akibat peningkatan kadar stress oksidatif (ROS). IL-6 disekresikan oleh sel T dan makrofag untuk merangsang respon imun selama inflamasi dan infeksi. Sitokin ini terbukti terlibat dalam respon inflamasi yang terkait dengan keadaan resisten insulin pada DMT1<sup>17</sup>. Peningkatan ekspresi IL-6 berkaitan dengan keparahan

kondisi inflamasi yang menunjukkan semakin banyak kerusakan pada sel  $\beta$ -pankreas. Kondisi DMT1 menunjukkan peningkatan signifikan ekspresi gen IL-6. Pada pemberian H-MSCs ekspresi gen IL-6 sangat berkurang yang dipengaruhi dosis (Gambar 5.6). Hal ini menunjukkan bahwa H-MSCs dapat menurunkan kondisi inflamasi pada DMT1.



**Gambar 5.6.** Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA IL-6 pada jaringan  $\beta$ -pankreas masing-masing kelompok perlakuan. \* Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ( $p < 0.05$ ).

**Tabel 5.3.** Uji *Post-hoc* LSD ekspresi MRNA IL-6 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
Sham	Kontrol	0.000	-6.8350	-4.7248
	P1	0.090	-1.9378	0.1723
	P2	0.620	-1.2908	0.8193
Kontrol	P1	0.000	3.8420	5.9523
	P2	0.000	4.4890	6.5992

P1	P2	0.195	-0.4081	1.7020
Uji <i>Post Hoc</i> : * <i>mean difference significant</i> P < 0.05				

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian H-MSCs 0.5 ml (1.88±0.88) dan 1 ml (1.23±0.17) secara berturut-turut menurunkan ekspresi gen IL-6 hingga 3.6 dan 5.5 kali lipat lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol perlakuan STZ 60mg/kgBB (6.77±0.66). Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen IL-6 dibandingkan kontrol, namun tidak menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan kelompok sham (1.04±0.02). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian H-MSCs mampu menurunkan ekspresi gen IL-6 setara dengan kondisi sehat.

Data deskriptif ekspresi gen masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok  $p > 0,05$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One-way ANOVA*, dan dilanjutkan uji *Post-hoc* LSD. Uji beda *One-way ANOVA* didapatkan  $p < 0,05$ . Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.6 dan tabel 5.3. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan H-MSCs dengan kelompok kontrol.



## 5.2. Pembahasan Penelitian

DMT1 membutuhkan terapi insulin seumur hidup akibat kondisi hiperglikemia kronik dan kerusakan sel  $\beta$  langerhans yang dapat menimbulkan berbagai komplikasi jangka panjang dengan resiko kematian<sup>12</sup>. Kondisi hiperglikemia menyebabkan peningkatan kadar stress oksidatif (ROS) yang mengaktifkan jalur IKK/NF- $\kappa$ B dan JNK/AP-1 untuk menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-6<sup>17,71</sup>. Pelepasan sitokin tersebut menyebabkan inflamasi yang berdampak terhadap kerusakan islet langerhans dan kematian pada sel  $\beta$ -pankreas. Kerusakan tersebut menyebabkan penghambatan sekresi insulin hingga resistensi insulin yang menyebabkan kondisi hiperglikemia<sup>9</sup>. Disisi lain tingginya kadar ROS disebabkan produksi enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) yang sangat rendah<sup>8</sup>. Ketidakseimbangan antara produksi ROS dan sistem pertahanan antioksidan memainkan peran penting dalam patogenesis DMT1 dan komplikasinya. Konsentrasi ROS yang tinggi merusak sel dan meningkatkan resistensi insulin melalui berbagai mekanisme termasuk apoptosis sel beta dan gangguan jalur pensinyalan insulin<sup>32</sup>. Terapi DMT1 saat ini hanya berfokus pada penurunan kadar gula darah dengan memberikan insulin eksternal tanpa memperbaiki sel  $\beta$  langerhans<sup>43</sup>. Penelitian terkini membuktikan bahwa mengurangi inflamasi kronik dan menurunkan kadar ROS secara signifikan membantu dalam perbaikan sel  $\beta$  langerhans<sup>78,79</sup>. Hipoksik sekretom *Mesenchymal Stem Cells* (H-MSCs) mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi yang mampu memperbaiki dan menginduksi regenerasi jaringan<sup>80</sup>. H-MSCs mengandung senyawa seperti IL-10, IL-12, HGF, TGF- $\beta$ , VEGF, PDGF, dan FGF<sup>33,81,82</sup>. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi dosis H-MSCs secara intra periotenal



terhadap ekspresi gen SOD dan IL-6 yang berperan dalam DMT1. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar karena termasuk vertebrata mamalia dengan struktur organ dan jaringan mirip manusia. Hewan uji di induksi STZ dosis 60 mg/kgBB untuk membuat kondisi DMT1<sup>50</sup>.

Penelitian ini melakukan pengukuran ekspresi gen SOD, SOD adalah enzim yang mengatur keseimbangan ROS, memainkan peran kunci dalam perlindungan terhadap kerusakan seluler dan histologis yang dihasilkan oleh ROS<sup>83</sup>. Ekspresi berlebihan SOD terbukti mengatasi stres oksidatif, mengurangi ROS, dan meningkatkan enzim antioksidan terbukti dapat mencegah diabetes mellitus<sup>84</sup>. Produksi anion superoksida yang berlebihan yang diinduksi oleh hiperglikemia dapat merangsang protein kinase C, jalur heksosamin dan poliol, dan pembentukan *advanced glycation end products* (AGE) yang memperparah kondisi DMT1<sup>23</sup>. Pada penelitian ini didapatkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi gen SOD secara signifikan pada perlakuan dosis H-MSCs 100 $\mu$ L dan 200 $\mu$ L. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa regulasi *nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2* (Nrf2) tergantung dengan *kelch-like ECH-associated protein 1* (keep-1), pada kondisi stress oksidatif tinggi Nrf2 terdisosiasi dari keep-1 dan bertanslokasi ke nucleus. Pada nucleus Nrf2 berdimerisasi dengan Maf dan berikatan dengan gen ARE seperti HO-1. HO-1 yang diregulasi mengkatalisis heme menjadi CO yang akan mengaktifasi jalur Nf-kB untuk menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi dan mencegah pembentukan enzim antioksidan<sup>85</sup>. Ekspresi sitokin proinflamasi yang berlebihan menyebabkan kerusakan sel  $\beta$ -pankreas. IL-10 pada H-MSCs dapat menghambat pelepasan Nrf2 dari keep-1<sup>86</sup>

sehingga dapat meningkatkan ekspresi SOD. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa secretom MSCs meningkatkan aktivitas glutathione (GSH) dan SOD sehingga mengurangi stress oksidatif pada tikus model Alzheimer's disease<sup>87</sup>.

Penelitian ini terjadi fenomena yang sama dengan penelitian sebelumnya bahwa kandungan IL-10 yang lebih banyak pada dosis H-MSCs 1 ml menunjukkan peningkatan ekspresi gen SOD hingga  $5.88 \pm 1.55$  pada sel pankreas yang lebih besar dibandingkan dosis 0.5 ml H-MSCs ( $1.49 \pm 0.71$ ). Penelitian ini lebih lanjut menunjukkan efek penghambatan sitokin pro inflammasi IL-6 akibat pemberian H-MSCs.

Ekspresi IL-6 berkorelasi dengan aktivasi jalur inflamasi. Peningkatan ekspresi berlebihan sitokin IL-6 dapat menyebabkan kondisi hiperinflammasi yang menginduksi terjadinya prolonginflammasi yang berkorelasi dengan kerusakan sel  $\beta$ -pankreas<sup>11,17</sup>. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa konsentrasi IL-6 secara signifikan meningkat pada pasien DMT1 di bandingkan kontrol sehat, yang mendukung bahwa peran sitokin proinflamasi ini berkaitan dengan pathogenesis DMT1<sup>88</sup>. Interaksi IL-6/IL-6R (reseptor) menyebabkan dimerisasi gp130 yang mengaktifkan JAK family kinases dan selanjutnya menyebabkan fosforilasi protein STAT1 dan STAT3. Fosforilasi protein STAT ini menginduksi transkripsi gen-gen proinflamasi yang lainnya yang dapat memperparah kerusakan sel  $\beta$ -pankreas<sup>25</sup>. Disisi lain kompleks IL-6R/gp130/STAT3 menginduksi diferensiasi sel T helper 17 (Th17), menghambat T regulator (Treg) dan resistensi efektor T (Teff) sehingga menyebabkan

ketidakseimbangan sistem imun pada DMT1<sup>17</sup>. Ekspresi tinggi IL-6 menyebabkan kegagalan dalam mengatur homeostatis glukosa dengan merangsang sel  $\beta$ -pankreas untuk memproduksi *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), sehingga meningkatkan sekresi insulin<sup>89</sup>.

Pada penelitian ini pemberian H-MSCs secara signifikan dan tergantung dosis menurunkan ekspresi gen IL-6. Pada pemberian dosis H-MSCs 1 ml dapat menurunkan ekspresi gen IL-6 ( $1.88 \pm 0.88$ ) hingga tidak berbeda signifikan dengan kelompok H-MSCs 0.5 ml ( $1.23 \pm 0.17$ ) dan berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian H-MSCs dapat mencegah hiperglikemia melalui downregulasi ekspresi sitokin proinflamasi IL-6. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa kandungan IL-10 pada sekret MSCs secara efektif menekan IL-6 dan mempercepat fase inflamasi<sup>90</sup>. Penelitian lain melaporkan bahwa terapi IL-10 memperlambat perkembangan DMT1 melalui regulasi sel immune innate dan adaptive<sup>91</sup>. IL-10 dan TGF- $\beta$  pada H-MSCs sebagai sitokin anti-inflamsi dan *growth factor* akan menghambat ekspresi sitokin inflamasi seperti IL-6 yang akhirnya akan menyebabkan proliferasi sel  $\beta$ -pankreas sehingga terjadi sekresi insulin dan kadar gula darah menurun<sup>8,26,29</sup>.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa H-MSCs memiliki aktivitas anti diabetes mellitus tipe 1 pada model DMT1 yang diinduksi STZ melalui pencegahan stress oksidatif sel dengan meningkatkan ekspresi gen SOD dan mencegah inflamasi melalui penurunan ekspresi gen IL-6. Hal ini menunjukkan bahwa H-MSCs memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi yang tertarget pada DMT1.

### 5.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak mengeksplorasi efek pemberian H-MSCs terhadap kadar ROS intraseluler yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor penyebab kerusakan sel  $\beta$ -pankreas pada DMT1. Aktivasi ROS dapat mengaktifasi berbagai faktor transkripsi NF-kB dan jalur lainnya seperti MAPK, JNK yang juga tidak di amati pada penelitian ini. Penelitian ini juga tidak mengamati berbagai penanda pada jalur regenerasi dan proliferasi sel  $\beta$ -pankreas.



## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Ekspresi gen SOD pada kelompok H-MSCs dosis 0.5 ml dan 1 ml lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol pada jaringan  $\beta$ -pankreas tikus model DMT1 yang diinduksi STZ 60 mg/kgBB.
2. Ekspresi gen IL-6 pada kelompok H-MSCs dosis 0.5 ml dan 1 ml lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol pada jaringan  $\beta$ -pankreas tikus model DMT1 yang diinduksi STZ 60 mg/kgBB.

#### 6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan pemberian H-MSCs pada tikus model DMT1.
2. Perlu pengamatan aktivasi jalur NF-kB, MAPK, dan JNK setelah dilakukan pemberian H-MSCs pada tikus model DMT1.
3. Perlu pengamatan penanda pada jalur regenerasi dan proliferasi sel  $\beta$ -pankreas pada tikus model DMT1.
4. Perlu pengamatan lain, apakah ada faktor lingkungan yang mempengaruhi hasil.

**DAFTAR PUSTAKA**

- 1 Alnek K, Kisand K, Heilman K, Peet A, Varik K, Uiho R. Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *PLoS One* 2015; **10**: 1–16.
- 2 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.
- 3 Ngaski A. Correlation of Antioxidants Enzymes Activity with Fasting Blood Glucose in Diabetic Patients in Sokoto, Nigeria. *J Adv Med Med Res* 2018; **25**: 1–6.
- 4 Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the  $\beta$ -cell (do not blame the immune system?). *Nat Rev Endocrinol* 2021; **17**: 150–161.
- 5 Zóka A, Muzes G, Somogyi A, Varga T, Szémán B, Al-Aissa Z *et al.* Altered immune regulation in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol* 2013; **2013**. doi:10.1155/2013/254874.
- 6 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.
- 7 Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I. The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes* 2015; **39**: 44–49.
- 8 Ngoye Briggs O, Brown H, Elechi-amadi K, Ezeiruaku F, Nduka N. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Levels in Patients with Long Standing Type 2 Diabetes in Port Harcourt, Rivers State, Nigeria. *Int J Sci Res* 2016; **5**: 1282–1288.
- 9 Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2014; **1840**: 2709–



- 2729.
- 10 Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2013; **1281**: 16–35.
  - 11 Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze MK. Serum IL-1 $\beta$ , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm* 2006; **2006**: 1–6.
  - 12 Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Fard HH, Ghojzadeh M. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: A systematic review and meta-analysis. *Heal Promot Perspect* 2020; **10**: 98–115.
  - 13 Secrest AM, Washington RE, Orchard TJ. Mortality in Type 1 Diabetes. *Diabetes Am* 2018; : 1–16.
  - 14 Pulungan AB, Fadiana G, Annisa D. Type 1 diabetes mellitus in children: Experience in Indonesia. *Clin Pediatr Endocrinol* 2021; **30**: 11–18.
  - 15 Chen J, Stimpson SE, Fernandez-Bueno GA, Mathews CE. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Type 1 Diabetes. *Antioxidants Redox Signal* 2018; **29**: 1361–1372.
  - 16 Piganelli JD, Delmastro MM. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol* 2011; **2011**. doi:10.1155/2011/593863.
  - 17 Gomes KB. IL-6 and type 1 diabetes mellitus: T cell responses and increase in IL-6 receptor surface expression. *Ann Transl Med* 2017; **5**: 16–18.
  - 18 Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res* 2014; **1**: 1–21.
  - 19 Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji HL *et al*. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; **7**. doi:10.1038/cddis.2015.327.
  - 20 Katuchova J, Harvanova D, Spakova T, Kalanin R, Farkas D, Durny P *et al*. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus.

- Endocr Pathol* 2015; **26**: 95–103.
- 21 Gao X, Song L, Shen K, Wang H, Qian M, Niu W *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Mol Cell Endocrinol* 2014; **388**: 41–50.
  - 22 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.
  - 23 Astari L, Cahyono H, Widjajanto E. Correlation of Interleukin-10, Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) Levels with HbA1c in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus. *J Trop Life Sci* 2017; **7**: 286–292.
  - 24 Kumar NP, Moideen K, George PJ, Dolla C, Kumaran P, Babu S. Coincident diabetes mellitus modulates Th1-, Th2-, and Th17-cell responses in latent tuberculosis in an IL-10- and TGF- $\beta$ -dependent manner. *Eur J Immunol* 2016; **46**: 390–399.
  - 25 De Lima KA, De Oliveira GLV, Yaochite JNU, Pinheiro DG, De Azevedo JTC, Silva WA *et al.* Transcriptional profiling reveals intrinsic mRNA alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients. *Stem Cell Res Ther* 2016; **7**: 1–17.
  - 26 Ribot J, Caliperoumal G, Paquet J, Boisson-vidal C, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J Cell Mol Med* 2017; **21**: 349–363.
  - 27 Kornicka K, Houston J, Marycz K. 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. *Stem Cell Rev Reports* 2018; **14**: 337–345.
  - 28 Yu S, Cheng Y, Zhang L, Yin Y, Xue J, Li B *et al.* Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects,

- improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 1–18.
- 29 Dias I, Pinheiro D, Ribeiro Silva K, Stumbo AC, Thole A, Cortez E *et al.* Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. *Curr Res Pharmacol Drug Discov* 2021; **2**: 100069.
- 30 Putra A, Suwiryo ZH, Muhar AM, Widyatmoko A, Rahmi FL. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Regulating PDGF and VEGF during Pancreatic Islet Cells Regeneration in Diabetic Animal Model. *Folia Med (Plovdiv)* 2021; **63**: 875–883.
- 31 Wölfle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 32 Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord* 2019; **18**: 437–443.
- 33 Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; **92**: 356–362.
- 34 Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol* 2016; **15**: 160–173.
- 35 Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L *et al.* Interleukin-6: Molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–25.
- 36 Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 $\beta$ -ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules* 2016; **21**: 1–14.

- 37 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich spatholobus suberectus stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 38 Cooper S, Bowden G. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; **7**: 325–334.
- 39 Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev* 2014; **13**: 65–74.
- 40 Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22083974.
- 41 Banerjee M. Genetic polymorphisms of cytokine genes in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2014; **5**: 493.
- 42 Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; **33**. doi:10.2337/dc10-S062.
- 43 Sapra A, Bhandari P. *Diabetes Mellitus*. StatPearls Publishing, 2021.
- 44 Care D, Suppl SS. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes : Standards of Medical Care in Diabetes d 2021. 2021; **44**: 15–33.
- 45 Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014; **37**: 81–90.
- 46 Paschou SA, Papadopoulou-marketou N, Chrousos GP, Kanaka-gantenbein C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. 2018; : 38–46.
- 47 Speight J, Pouwer F. Diabetes mellitus, type 1. In: *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine: Third Edition*. Cambridge University Press, 2019, pp 477–480.
- 48 Giwa AM, Ahmed R, Omidian Z, Majety N, Karakus KE, Omer SM *et al*. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to

- environment. *World J Diabetes* 2020; **11**: 13–25.
- 49 Gvazava IG, Rogovaya OS, Borisov MA, Vorotelyak EA, Vasiliev A V. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and rodent experimental models. *Acta Naturae* 2018; **10**: 24–33.
- 50 Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* 2015; **8**: 181–188.
- 51 Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C *et al*. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; **12**: 218–226.
- 52 Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D Syst* 2018. <https://resources.rndsystems.com/images/site/wp-msc-13763.pdf> <https://www.rndsystems.com/resources/articles/markers-and-methods-verify-mesenchymal-stem-cell-identity-potency-and-quality>.
- 53 Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focus Tumor Microenviron Stem cells Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.
- 54 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
- 55 Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10.
- 56 Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
- 57 Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports* 2016; **2**: 168–173.
- 58 Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci* 2018; **19**.

doi:10.3390/ijms19092783.

- 59 Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol 2000* 2013; **63**: 198–216.
- 60 Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J. Cell. Immunother.* 2016; **2**: 3–20.
- 61 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.
- 62 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.
- 63 Fabian Z. The Signaling Nature of Cellular Metabolism: The Hypoxia Signaling. In: *Cell Signalling - Thermodynamics and Molecular Control*. IntechOpen, 2019 doi:10.5772/intechopen.79952.
- 64 Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; **21**: 268–283.
- 65 Chen PS, Chiu WT, Hsu PL, Lin SC, Peng IC, Wang CY *et al.* Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J Biomed Sci* 2020; **27**: 1–19.
- 66 Benavides-Castellanos 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.
- 67 Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol* 2018; **9**: 1–17.



- 68 Jiang CM, Liu J, Zhao JY, Xiao L, An S, Gou YC *et al.* Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2015; **94**: 69–77.
- 69 Vincenz L, Szegezdi E, Jager R, Holohan C, O'Brien T, Samali A. Cytokine-Induced  $\beta$ -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. In: *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. InTech, 2011 doi:10.5772/22765.
- 70 Al-Azzawi B, Mcguigan DH, Manderson Koivula FN, Elttayef A, Dale TP, Yang Y *et al.* The Open Stem Cell Journal The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. 2020; **6**: 1–12.
- 71 Zhou Q, Xu H, Yu W, Li E, Wang M. Anti-inflammatory effect of an apigenin-maillard reaction product in macrophages and macrophage-endothelial cocultures. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**. doi:10.1155/2019/9026456.
- 72 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.
- 73 Munoz-Perez E, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Mesenchymal stromal cell secretome for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: Latest trends in isolation, content optimization and delivery avenues. *Pharmaceutics* 2021; **13**. doi:10.3390/pharmaceutics13111802.
- 74 Ueha S, Shand FHW, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol* 2012; **3**: 1–6.
- 75 Rong X, Li J, Yang Y, Shi L, Jiang T. Human fetal skin-derived stem cell secretome enhances radiation-induced skin injury therapeutic effects by promoting angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 1–11.
- 76 Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Sa'dyah NAC, Tjipta A, Chodidjah C. The

- Role of Hypoxic Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing. *Indones J Cancer Chemoprevention* 2020; **11**: 134.
- 77 Tavares AM, Silva JH, de Oliveira Bensusan C, Ferreira ACF, de Lima Matos LP, de Araujo e Souza KL *et al.* Altered superoxide dismutase-1 activity and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2019; **14**: 1–10.
- 78 Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review-Article. *Cell Death Dis* 2018; **9**. doi:10.1038/s41419-017-0135-z.
- 79 Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S *et al.* The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *Eur Cardiol Rev* 2019; **14**: 50–59.
- 80 Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* 2019; **8**: 467.
- 81 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.
- 82 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.
- 83 Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomarkers* 2013; **2013**: 1–8.
- 84 Wang C, Li S, Shang DJ, Wang XL, You ZL, Li HB. Antihyperglycemic and neuroprotective effects of one novel Cu-Zn SOD mimetic. *Bioorganic Med Chem Lett* 2011; **21**: 4320–4324.

- 85 Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2017; **1863**:585–597.
- 86 Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* 2020; **25**: 1–31.
- 87 Angeloni C, Gatti M, Prata C, Hrelia S, Maraldi T. Role of mesenchymal stem cells in counteracting oxidative stress—related neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–28.
- 88 Siewko K, MacIulewski R, Zielinska-Maciulewska A, Poplawska-Kita A, Szumowski P, Wawrusiewicz-Kurylonek N *et al.* Interleukin-6 and Interleukin-15 as Possible Biomarkers of the Risk of Autoimmune Diabetes Development. *Biomed Res Int* 2019; **2019**:7–9.
- 89 Xia J, Liu W, Hu B, Tian Z, Yang Y. IL-15 promotes regulatory T cell function and protects against diabetes development in NK-depleted NOD mice. *Clin Immunol* 2010; **134**: 130–139.
- 90 Sungkar T, Putra A, Lindarto D, Sembiring RJ. Intravenous Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Regulates Hyaluronic Acid and Interleukin-10 Secretion Producing Low-grade Liver Fibrosis in Experimental Rat. *Med Arch (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)* 2020; **74**: 177–182.
- 91 Huang J, Tan Q, Tai N, Pearson JA, Li Y, Chao C *et al.* IL-10 Deficiency Accelerates Type 1 Diabetes Development via Modulation of Innate and Adaptive Immune Cells and Gut Microbiota in BDC2.5 NOD Mice. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–13.