

PENGARUH SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI GEN VEGF DAN PDX1 SEL β PANKREAS

(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DM Tipe 1)

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

Guna mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Danu Sandyarani

MBK. 19.14.01.0166

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

**PENGARUH SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS
TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI GEN VEGF DAN PDX1 SEL β
PANKREAS**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Jantan Galur Wistar
Model DM Tipe 1)**

disusun oleh :

Danu Sandyarani

MBK.1914010166

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada 7 Juli 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima,

Menyetujui, Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,


Dr.dr. Joko Wahyu W, M.kes
NIK 210198046


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK 210199050

Mengetahui,

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


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK 210199050

PERNYATAAN

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

Semarang, 7 Juli 2022
Yang menyatakan,

(Danu Sandyarani)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

| | |
|------------------------|---------------------------|
| Nama | : Danu Sandyarani |
| Tempat / tanggal lahir | : Pontianak, 16 Juli 1980 |
| Agama | : Islam |
| Jenis kelamin | : Perempuan |

B. Riwayat Pendidikan Formal

1. TK Teladan : Lulus tahun 1984
2. SDN Cipinang Cempedak 01 Jakarta : Lulus tahun 1992
3. SMPN 36 Jakarta : Lulus tahun 1995
4. SMAN 3 Semarang : Lulus tahun 1998
5. Fakultas Kedokteran UNISSULA : Lulus tahun 2009
6. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019 – sekarang

C. Riwayat Keluarga

| | |
|----------------------|------------------------------|
| Nama Orang Tua | |
| Ibu | : Herowati |
| Ayah | : Suryo Hariyanto |
| Nama Saudara Kandung | |
| Adik | : Haryo Novantoro |
| Nama Suami | : Andrian Meirawan Saputra |
| Nama Anak | |
| Anak 1 | : Elroy Tito Deandre |
| Anak 2 | : Prameswari Calysta Deandre |

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa, atas segala karunia dan ridho-Nya, sehingga tesis dengan judul “*Pengaruh Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells Terhadap Ekspresi Gen VEGF DAN PDX1 Sel β Pankreas (studi eksperimental in vivo pada tikus jantan galur wistar model DM tipe 1)*” ini dapat diselesaikan.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada :

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

4. Bapak Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.
5. Ibu Dr. dr. Chodidjah. M.Kes selaku penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
6. Ibu dr. Nur Anna Chalimah Sa'dyah, Sp.PD Finasim selaku penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
8. Seluruh tim laboratorium SCCR, yang telah memberikan arahan dan bimbingan dalam penyusunan tesis.
9. Kedua Orangtua Mayjen TNI (Purn). Suryo Hariyanto, S.IP, M.Sc dan Herowati yang selalu menghaturkan doa dan memberi dukungan.
10. Suami Andrian Meirawan Saputra, ST dan anak-anak Elroy Tito Deandre, Prameswari Calysta Deandre yang selalu menghaturkan doa dan memberi dukungan.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

Wassalamua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Semarang, Juni 2022

Danu Sandyarani



ABSTRAK

PENGARUH SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI GEN VEGF DAN PDX1 SEL β PANKREAS

Latar belakang: Diabetes mellitus tipe 1 (DMT1) adalah penyakit autoimun yang di tandai dengan kerusakan sel beta pankreas yang berkaitan dengan stress oksidatif dan hiperinflammasi yang menyebabkan penurunan ekspresi faktor transkripsi PDX1. Sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-hMSCs) mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi yang mampu menekan stress oksidatif dan inflamasi. Namun, peran S-hMSCs terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF dan PDX1 pada DMT1 hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian S-hMSC terhadap peningkatan ekspresi VEGF dan PDX1 pada pankreas tikus model DMT1 yang diinduksi STZ 60mg/kgBB.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test control group*. Jumlah sampel 20 ekor tikus jantan galur wistar dibagi menjadi 4 kelompok, terdiri dari : Kelompok Sham yang tidak mendapat perlakuan, Kontrol mendapat injeksi STZ: 60mg/kgBB intra peritoneal, P1: mendapat injeksi STZ dan S-hMSCs 0.5 cc dan P2 : mendapat injeksi STZ dan S-hMSCs 1 cc . Pemberian S-hMSCs secara intraperitoneal pada hari ke 7, 14, dan 21. Pada hari ke 28 dilakukan terminasi, diambil jaringan pankreas dan di analisis ekspresi gen VEGF dan PDX1 dengan qRT-PCR.

Hasil: Rerata ekspresi gen VEGF kelompok sham $1.00 \pm 0.01\%$, kontrol: $0.02 \pm 0.02\%$, P1: $5.60 \pm 3.02\%$, P2: $7.98 \pm 2.67\%$, sedangkan rerata ekspresi gen PDX1 kelompok Sham: $1.01 \pm 0.02\%$, kelompok kontrol: $1.30 \pm 0.42\%$, P1: $10.08 \pm 4.16\%$, P2: $23.64 \pm 7.14\%$. pada uji normalitan dan homogenitas didapatkan hasil $p > 0,05$. Hasil uji Anova $p < 0,05$

Kesimpulan: Terjadi peningkatan yang bermakna ekspresi gen VEGF dan PDX1 dengan pemberian S-hMSC pada tikus model DM tipe 1

Kata kunci: VEGF, PDX1, S-hMSCs, diabetes melitus tipe 1

ABSTRACT

THE EFFECT OF HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS ON VEGF AND PDX1 GENE EXPRESSION ON TYPE 1 DIABETES MELLITUS RAT MODELS

Background: Type 1 diabetes mellitus (DMT1) is an autoimmune disease characterized by beta cell damage associated with oxidative stress and hyperinflammation that causes a decrease in the expression of the transcription factor PDX1. Secretome hypoxic mesenchymal stem cells (S-hMSCs) 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 S-hMSCs in increasing VEGF and PDX1 gene expression in DMT1 is still unclear. The aim of this study was to determine the effect of S-hMSCs to increase the expression of VEGF and PDX1 in the pancreas of rat model DMT1 induced by STZ 60mg/kgBW.

Methods: Experimental research with post test control group. The total sample of 20 male rats of the wistar strain was divided into 4 groups, consisting of: The Sham group that did not receive treatment, the Kontrol got the STZ injection: 60mg/kgBB intra peritoneal, P1: got the injection of STZ and S-hMSCs 0.5 cc and P2: got the injection of STZ and S-hMSCs 1 cc. Intraperitoneal administration of S-hMSCs on days 7, 14, and 21. On the 28th day, termination was carried out, pancreas tissue was taken and analyzed the expression of the VEGF and PDX1 genes with qRT-PCR.

Results: The mean gene expression of VEGF genes of the sham group is $1.00 \pm 0.01\%$, control: $0.02 \pm 0.02\%$, P1: $5.60 \pm 3.02\%$, P2: $7.98 \pm 2.67\%$, while the average gene expression of PDX1 gene of the Sham group: $1.01 \pm 0.02\%$, control group: $1.30 \pm 0.42\%$, P1: $10.08 \pm 4.16\%$, P2: $23.64 \pm 7.14\%$. In normality and homogeneity tests obtained results of $p > 0.05$. Anova test result $p < 0.05$.

Conclusion: There was a meaningful increase in the expression of VEGF and PDX1 genes with S-hMSC in type 1 diabetes mellitus model mice

Keywords: VEGF, PDX1, S-hMSCs, type 1 diabetes mellitus

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| PERNYATAAN..... | iii |
| RIWAYAT HIDUP..... | iv |
| KATA PENGANTAR | v |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT | ix |
| DAFTAR ISI..... | x |
| DAFTAR GAMBAR | xvi |
| DAFTAR TABEL..... | xvii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xviii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3. Tujuan Umum | 5 |
| 1.3.1. Tujuan Umum..... | 5 |
| 1.3.2. Tujuan Khusus..... | 5 |
| 1.4. Manfaat Penelitian | 5 |
| 1.4.1. Manfaat Teoritis | 5 |
| 1.4.2. Manfaat Praktis..... | 5 |
| 1.5. Originalitas Penelitian | 6 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 8 |
| 2.1. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> | 8 |
| 2.2. <i>Pancreatic Duodenal Homeobox 1 (PDX1)</i> | 10 |
| 2.3. Diabetes Melitus Tipe 1 | 12 |
| 2.3.1. Definisi | 12 |
| 2.3.2. Etiologi | 12 |
| 2.3.3. Patofisiologi..... | 13 |
| 2.3.4. Gambaran Klinis..... | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.5. Pengelolaan DM tipe 1 | 18 |
| 2.4. Mesenchymal Stem Cell | 21 |
| 2.4.1. Definisi | 21 |
| 2.4.2. Fungsi | 22 |
| 2.4.3. Sumber..... | 23 |
| 2.4.4. Karakteristik | 24 |
| 2.4.5. Peran MSCs..... | 25 |
| 2.5. Hipoksia | 25 |
| 2.5.1. Definisi | 25 |
| 2.5.2. Mekanisme Fisiologi Seluler..... | 26 |
| 2.6. Sekretom | 27 |
| 2.6.1. Definisi | 27 |
| 2.6.2. Komposisi..... | 28 |
| 2.6.3. Modifikasi Pendorong <i>Sekret Mesenchymal Stem Cell</i> | 28 |
| 2.7. <i>Streptozotocin</i> | 29 |
| 2.8. Hubungan Sekretom hipoksia <i>Mesenchymal Stem Cells</i> terhadap Gen VEGF dan PDX1 | 29 |
| BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS..... | 32 |
| 3.1. Kerangka Teori..... | 32 |
| 3.2. Kerangka Konsep | 33 |
| 3.3. Hipotesis..... | 34 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | 35 |
| 4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian | 35 |
| 4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional | 36 |
| 4.2.1. Variabel Peneltian | 36 |
| 4.2.2. Defenisi Operasional | 37 |
| 4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian | 38 |
| 4.3.1. Subyek Penelitian | 38 |
| 4.3.2. Sampel Penelitian | 39 |
| 4.3.3. Besar Sampel | 39 |
| 4.3.4. Cara Pengambilan Sampel Penelitian..... | 40 |

| | | |
|---------------------------------|--|----|
| 4.4. | Alat dan Bahan..... | 40 |
| 4.4.1. | Alat | 40 |
| 4.4.2. | Bahan..... | 41 |
| 4.5. | Cara Penelitian | 41 |
| 4.5.1. | Perolehan <i>Ethical Clearance</i> | 41 |
| 4.5.2. | Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cells</i> dari <i>Umbilical Cord</i> | 42 |
| 4.5.3. | Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i> | 43 |
| 4.5.4. | Proses Hipoksia | 44 |
| 4.5.5. | Pembuatan Tikus Model DM Tipe 1 | 45 |
| 4.5.6. | Terminasi dan Pengambilan Jaringan..... | 47 |
| 4.5.7. | Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA..... | 48 |
| 4.5.8. | Pembacaan ekspresi gen VEGF dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) | 49 |
| 4.5.9. | Pembacaan ekspresi gen PDX1 dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) | 50 |
| 4.6. | Tempat dan Waktu Peneltian | 50 |
| 4.6.1. | Tempat Penelitian..... | 50 |
| 4.6.2. | Waktu Penelitian | 51 |
| 4.7. | Analisa Data | 51 |
| 4.8. | Alur Penelitian | 52 |
| BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN..... | | 53 |
| 5.1. | Hasil Penelitian | 54 |
| 5.1.1. | Isolasi <i>Secretome Mesenchymal Stem Cell</i> (MSC-Scr) dari <i>Umbilical Cord</i> | 54 |
| 5.1.2. | Validasi Tikus Model DM Tipe 1 | 55 |
| 5.1.3. | Pengaruh Pemberian S-hMSCs terhadap Ekspresi Gen VEGF pada Tikus Model DM Tipe 1 | 58 |
| 5.1.4. | Pengaruh Pemberian S-hMSCs terhadap Ekspresi Gen PDX1 pada Tikus Model DM Tipe 1 | 61 |

| | |
|--|----|
| 5.2. Pembahasan Hasil Penelitian | 64 |
| 5.3. Keterbatasan Peneliti..... | 69 |
| BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN | 71 |
| 6.1. Kesimpulan Penelitian | 71 |
| 6.2. Saran Penelitian..... | 71 |
| DAFTAR PUSTAKA | 72 |
| LAMPIRAN..... | 83 |



DAFTAR SINGKATAN

| | |
|-----------|---|
| CSII | : <i>Continous Subcutaneus Insulin Infusion</i> |
| DM | : <i>Diabetes Mellitus</i> |
| DMT1 | : <i>Diabetes Mellitus Tipe 1</i> |
| DNA | : <i>Deoxyribo Nucleic acid</i> |
| EGF | : <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| FGF | : <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| GAD | : <i>Glutamic Acid Decarboxylase 65 Autoantibodies</i> |
| HE | : <i>Hematoksilin-Eosin</i> |
| HLA | : <i>Human Leukocyte Antigen</i> |
| HIF | : <i>Hypoxia Inducible Factor</i> |
| hMSC | : <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> |
| HSP | : <i>Heat Shock Protein</i> |
| hTERT-MSC | : <i>human telomerase reverse transcriptase mesenchymal stem cell</i> |
| IAA | : <i>Insulin Autoantibodies</i> |
| IA2 | : <i>Islet Antigen 2</i> |
| IFN | : <i>Interferon</i> |
| IL | : <i>Interleukin</i> |
| JNK | : <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> |
| ODD | : <i>Oxygen-Dependent Degeneration</i> |
| PDGF | : <i>Platelet Derived Growth Factor</i> |
| PDX1 | : <i>Pancreatic Duodenale Homeobox-1</i> |
| PIGF | : <i>Placental Growth Factors</i> |
| ROS | : <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| S-hMSCs | : <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> |
| S-MSCs | : <i>Secretom Mesenchymal Stem Cells</i> |
| STAT3 | : <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> |
| STZ | : <i>Streptozotocin</i> |
| TGF | : <i>Transforming Growth Factor</i> |
| TFF | : <i>Tangential Flow Filtration</i> |

| | |
|------|--|
| TNF | : <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| VEGF | : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| VHL | : <i>Von Hippel–Lindau</i> |
| ZnT8 | : <i>β-cell- specific zinc transporter 8 autoantibodies</i> |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|--|----|
| Gambar 2.1. | Mekanisme VEGF-A pada DM ²⁶ | 9 |
| Gambar 2.2. | Histologi Pankreas Tikus | 10 |
| Gambar 2.3. | Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSCs) ⁵³ | 24 |
| Gambar 2.4. | Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁵⁶ | 24 |
| Gambar 2.5. | Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS ⁶² | 26 |
| Gambar 3.1. | Kerangka Teori | 33 |
| Gambar 3.2. | Kerangka Konsep..... | 33 |
| Gambar 4.1. | Gambar Rancangan Penelitian | 35 |
| Gambar 4.2. | Gambar Alur Penelitian | 52 |
| Gambar 5.1. | Hasil Validasi Isolasi Sel MSC | 54 |
| Gambar 5.2. | Analisa Flowcytometry Terhadap Ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31 | 55 |
| Gambar 5.3. | (A) Kondisi Sel pada Kelompok Sham. (B) Kondisi Sel pada Sampel Penelitian setelah Dilakukan Induksi STZ dengan Dosis 60mg/kgBB. Perbesaran 100x | 57 |
| Gambar 5.4. | Grafik Ekspresi VEGF pada semua kelompok | 60 |
| Gambar 5.5. | Grafik Ekspresi PDX1 pada semua kelompok..... | 63 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1.1. Originalitas Penelitian..... | 6 |
| Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i> | 44 |
| Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen VEGF dan PDX1 | 58 |
| Tabel 5.2. Uji Post-hoc LSD ekspresi VEGF | 60 |
| Tabel 5.3. Uji Post-hoc LSD Ekspresi PDX1 | 64 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i> | 83 |
| Lampiran 2. Analisis Statistik | 84 |
| Lampiran 3. Tabel Prosedur yang digunakan induksi STZ-NA pada tikus | 85 |
| Lampiran 4. Hasil Pengukuran GDS Tikus | 86 |
| Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian..... | 87 |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) tipe 1 adalah gangguan autoimun yang ditandai dengan kerusakan sel β pankreas dan menyebabkan resistensi dan atau defisiensi insulin¹. Hiperglikemia dan kegagalan aktivitas sel-sel imun merupakan karakteristik DM tipe 1 akibat kerusakan sel β pankreas secara permanen, sehingga penderita DM tipe 1 membutuhkan terapi insulin seumur hidup². Terapi insulin ini tidak memiliki kemampuan untuk meregenerasi perbaikan sel β pancreas³. Hiperglikemia kronis terjadi akibat peningkatan kronis *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan penurunan ekspresi gen *vascular endothelial growth factor* (VEGF), pengatur utama vaskulogenesis, angiogenesis, permeabilitas vascular, dan pembentukan fenestrasi edotel di pankreas⁴. Penekanan VEGF berada di bawah kontrol transkripsi *pancreatic duodenal homeobox-1* (PDX1) yang berakibat menekan pembentukan fenestrasi padat kapiler di islet⁵. Berkurangnya ekspresi VEGF akibat penekanan PDX1 menunjukkan intoleransi glukosa dengan berkurangnya jumlah granula yang mengandung insulin pada islet⁶. Induksi ekspresi VEGF terbukti dapat mempercepat regenerasi sel β pancreas dan meningkatkan produksi insulin⁷.

Insiden DM tipe 1 telah meningkat secara global sejak tahun 1950 dengan peningkatan rata-rata 3-4% selama tiga dekade terakhir⁵. Penyandang DM tipe-1 pada anak dan remaja di Indonesia tahun 2018

tercatat 1220 anak, dimana terjadi peningkatan sekitar tujuh kali lipat dari 3,88 menjadi 28,19 per 100 juta penduduk pada tahun 2000 dan 2010. Prevalensi DM tipe 1 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 2020⁸. Hal ini menyebabkan penderita DM tipe 1 harus menggunakan terapi insulin seumur hidup dengan berbagai komplikasi lain yang terjadi. Komplikasi jangka panjang pada DM tipe 1 membuat harapan hidup penderita DM tipe 1 sangat rendah dan meninggal di usia remaja³. Sekretom sebagai zat bioaktif yang terdiri dari IL-10, VEGF, PDGF, EGF dan FGF diharapkan dapat melindungi sel β pankreas dan membantu merangsang regenerasi sel islet lainnya.

Sekretom hipoksia *Mesenchymal Stem Cells* (S-hMSCs) merupakan *soluble molecule* bioaktif yang mengandung berbagai sitokin anti inflamasi seperti *interleukin-10* (IL-10), *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) dan *growth factor* seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF)⁹. MSC merupakan sel *multipotent* mirip fibroblas yang dikarakterisasi berdasarkan berbagai *surface marker* seperti ekspresi positif CD90, CD29 dan ekspresi CD31 dan CD45⁸. MSC diketahui mampu berperan sebagai imunomodulator, dimana dalam kondisi hipoksia MSC mampu berpolarisasi menjadi tipe sel anti inflamasi dan menghasilkan berbagai molekul antiinflamasi dan growth faktor yang dikenal sebagai S-hMSCs. Beberapa penelitian telah membahas manfaat

sekretom dalam meningkatkan viabilitas sel, proliferasi sel dan penurunan inflamasi sel. Penelitian Ribot et al membahas manfaat sekretom sebagai faktor angiogenesis memicu proliferasi pada sel β pankreas¹⁰. Regenerasi sel β pankreas akan memicu peningkatan ekspresi VEGF dan PDX1¹⁶.

Faktor transkripsi PDX1 mengandung *homeobox* dan berperan dalam perkembangan, diferensiasi jaringan dan pengaturan ekspresi berbagai gen spesifik pada sel beta pankreas, terutama insulin¹¹. Penelitian terdahulu melaporkan akumulasi kerusakan pankreas akibat autoimun akan mengaktifkan sinyal *c-Jun-NH₂-Terminal Kinase* (JNK) sehingga terjadi translokasi nuklear pada *forkhead box protein 01* (FOX01) dapat menyebabkan penurunan PDX1 yang berujung pada penurunan produksi insulin pada pasien DM tipe 1 disebabkan oleh kerusakan organ pankreas yang berdampak pada produksi insulin. Penelitian yang dilakukan oleh Gao et al (2018) menunjukkan bahwa kehilangan seluruh PDX1 pada tikus akan menyebabkan DM tipe 1, sementara kadar glukosa tetap normal apabila masih memiliki satu alel PDX1¹². Kerusakan sel β pankreas juga berdampak pada kerusakan endotel vascular jaringan pankreas. Salah satu molekul angiogenik yang berperan penting dalam perkembangan endotel adalah VEGF. Penelitian terdahulu menjelaskan bahwa Ekspresi VEGF pada DM tipe 1 yang berada pada islet sel β pankreas berkurang imunoreaktivitasnya akibat adanya gangguan transduksi sehingga respon minositik terganggu³.

Studi terbaru yang dilakukan Waseem et al (2016) menunjukkan bahwa sekretom yang dihasilkan oleh *hypoxia mesenchymal stem cells*

(hMSC) diketahui mengandung berbagai molekul bioaktif yang bermanfaat untuk meredakan inflamasi sekaligus meregenerasi sel β pankreas pada DM tipe 1, S-hMSC juga dapat memicu angiogenesis dan proliferasi pada sel β pankreas yang kurang optimal¹³.

Berbagai penelitian melaporkan bahwa S-MSC mampu menurunkan kadar molekul proinflamasi, seperti TNF- α , IFN γ , IL-1 dan IL-6 pada tikus model DM tipe 1¹². Penelitian lain juga melaporkan bahwa S-MSC mampu meningkatkan regenerasi sel β pankreas pada DM tipe 1 sekaligus memperbaiki ekspresi insulin dan kadar gula darah, melalui peningkatan ekspresi VEGF dan PDGF. Peningkatan regenerasi insulin dikaitkan dengan peningkatan ekspresi faktor transkripsi pengontrol ekspresi insulin, salah satunya adalah PDX1¹⁰. Namun, penelitian mengenai ekspresi gen VEGF dan PDX1 pada DM tipe 1 setelah pemberian S-MSCs masih belum dilakukan. Berdasarkan hal tersebut, peneliti melakukan analisis pengaruh sekretom dosis 500 μ L dan 1000 μ L terhadap ekspresi gen VEGF dan PDX1 pada jaringan pankreas tikus model DM tipe 1

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini “Apakah terdapat pengaruh sekretom hMSCs (S-hMSCs) terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF dan PDX1 sel β pankreas pada tikus model DM tipe 1?

1.3. Tujuan Umum

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh dari sekretom hMSCs terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF dan PDX1 sel β pankreas pada tikus model DM tipe 1.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh peningkatan ekspresi gen VEGF sel β pankreas dengan pemberian S-hMSCs pada dosis 0,5 cc dan 1 cc dibandingkan kontrol pada tikus model DM tipe 1.
2. Membuktikan pengaruh peningkatan ekspresi gen PDX1 sel β pankreas dengan pemberian S-hMSCs pada dosis 0,5 cc dan 1 cc dibandingkan kontrol pada tikus model DM tipe 1.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan sekretom *Hypoxia-MSCs* terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF dan PDX1 sel β pankreas tikus model DM tipe 1.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi dan acuan bagi pembaca mengenai penelitian secara *in vivo* tentang pengaruh sekretom dari *Hypoxia-*

MSCs terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF dan PDX1 sel β pankreas tikus model DM tipe 1.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

| Peneliti,tahun | Judul | metode | Hasil |
|---|---|-------------------------|---|
| Khatri R, Petry SF, Linn T. 2021 | Mesenchymal stem cells promote pancreatic β -cell regeneration through downregulation of FoxO1 pathway | hTERT-MSC in vivo | MSC meningkatkan ekspresi EGF, dan menghambat faktor pro inflamasi (IFN- γ dan TNF- α) serta peningkatan ekspresi Pdx1 |
| Dias I, Pinheiro D, Silva KR, Stumbo AC, Thole A, Cortez E, de Carvalho L, Carvalho SN. 2021 | Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocininduced type 1 diabetes | 2D dan 3D metode kultur | Adiposa stem cell menurunkan kadar gula darah dan meningkatkan ekspresi PDX1 pada tikus model DM tipe 1 |
| Dettmer R, Cirksena K, Munchhoff J, Kresse J, Diekmann U, Niwolik I, Buettner FFR and Naujok O. 2020 | FGF2 Inhibits Early Pancreatic Lineage Specification during Differentiation of Human Embryonic Stem Cells | PCR | Human pluripotent stem cell meningkatkan ekspresi gen Pdx1 |
| He Q, Song J, Cui C, Wang J, Hu H, Guo X, Yang M, Wang L, Yan F, Liang k, Liu Z, liu Fuqiang, Sun Z, Dong M, Hou X dan Chen L. 2021 | Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a reverses diabetic β -cell differentiation | In vitro | Peningkatan ekspresi gen Pdx1 setelah diberikan bone marrow MSC pada tikus model DM tipe 2 |
| Xu L, Xu C, Zhou S, Liu X, Wang J, Liu X, Suping Q, Xin Y, Gao Y, Zhu Y, Tang X. 2017 | PAX4 promotes PDX1- induces differentiation of mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells | In Vivo | Peningkatan ekspresi gen Pdx1 untuk meregulasi insulin dan stimulasi glukosa |

Penelitian Khatri et al (2020) menggunakan *human telomerase reverse transcriptase mesenchymal stem cell* (hTERT-MSC) untuk meregulasi ekspresi EGF, menghambat faktor pro inflamasi (IFN- γ dan TNF- α) dan mengaktifkan PDX1 sebagai faktor progenitor pankreas¹⁶. Penelitian Dias et al 2021 menggunakan adiposa stem cell dengan metode kultur two and three dimensional pada tikus model DM tipe 1 membuktikan adanya peningkatan ekspresi PDX1 dan menurunkan kadar glukosa¹⁷. Penelitian Dettmer et al (2020) menggunakan *human pluripotent stem cells* (hPSCs) dapat meningkatkan ekspresi PDX1 di fase awal¹⁸. Penelitian He et al (2021) menggunakan bone marrow stem cells, membuktikan adanya peningkatan VEGF dan ekspresi PDX1 pada tikus model DM tipe 2¹⁹. Penelitian Xu et al (2017) menggunakan PAX4 untuk merangsang MSC, sehingga meningkatkan PDX1 untuk meregulasi dan stimulasi glukosa²⁰. 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 secretom di berikan secara intravena dengan dosis 0.5 cc dan 1 cc, dibandingkan pada nukleus dengan mengukur ekspresi gen VEGF dan PDX1 sel β pankreas pada tikus model DM tipe 1 yang di induksi STZ.

BAB II

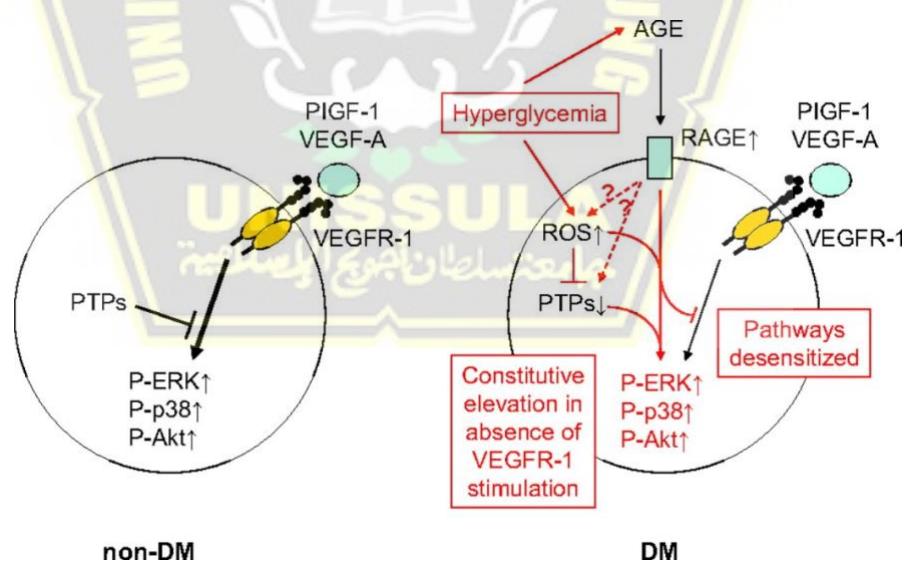
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan pengatur proses angiogenesis pada sel endotelial. Gen VEGF pada manusia terletak di kromosom 6p21.3 dan tersusun atas 8 ekson dan dipisahkan oleh 7 intron. Karakteristik utama gen VEGF diantaranya adalah sebagai faktor angiogenesis normal dan patologis, melindungi neuron motorik dari kerusakan⁶⁶.

VEGF mamalia terdapat lima bentuk: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan *placental growth factors* (PIGF). VEGF-A menjadi prototipe terletak di kromosom 6p21.3 menghasilkan empat isoform 121, 165, 189 dan 206 asam amino. Produksi VEGF dapat diinduksi dalam sel hipoksia dan akan menghasilkan *Hypoxia-Inducial Factor* (HIF). VEGF-A berikatan dengan reseptor VEGF memicu jalur tirosin kinase yang mengarah angiogenesis²⁰. VEGF merangsang respon seluler dengan mengikat reseptor tirosin kinase (VEGFR) pada permukaan sel menyebabkan dimerisasi dan teraktivasi melalui transfosforilasi walaupun dalam tempat, waktu dan luasan yang berbeda. Reseptor VEGF memiliki bagian ekstraseluler yang terdiri dari 7 domain yang serupa dengan immunoglobulin. VEGF mengikat VEGFR-1 dan VEGFR-2, NRP-1 dan NRP-2, tetapi VEGFR-2 sebagai reseptor utama yang menghubungkan semua respon seluler²¹.

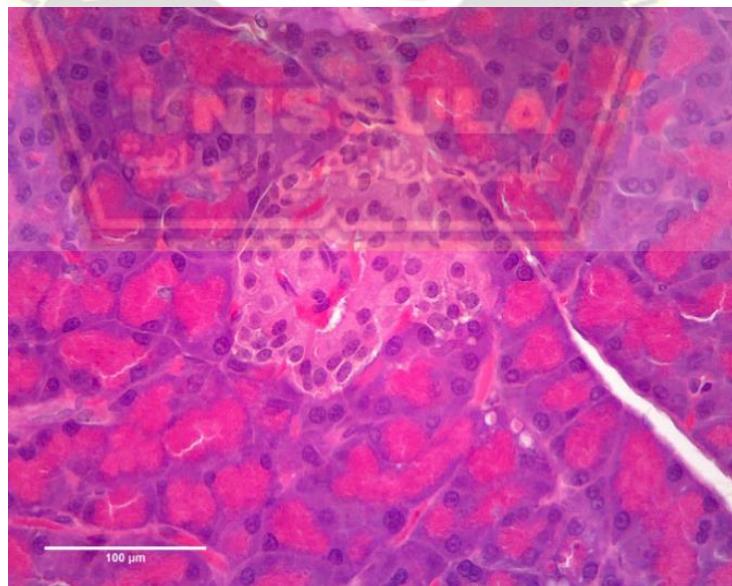
Penurunan fungsi VEGF-A pada DM tipe 1 karena adanya gangguan transduksi pada VEGFR-1 yang menyebabkan respon minositik terganggu. Hiperglikemia yang terjadi terlalu lama pada DM tipe 1 menyebabkan perubahan biokimia seluler dan menginduksi *reactive oxygen species* (ROS) dan membentuk *advanced glycation end products* (AGEs)²². Perubahan biokimia yang diinduksi glukosa akan berdampak buruk pada fungsi seluler dengan mengubah berbagai jalur transduksi sinyal²². Kemotaksis monosit VEGFR-1 dimediasi oleh P13K/Akt atau protein kinase P38 yang diaktifkan oleh mitogen diatur oleh *extracellular signal-regulated kinase* 1/2 (ERK1/2)²³. Pada pasien non DM Tirosin kinase VEGFR-1 mengaktivasi jalur ini, sedangkan inaktivasinya terjadi sebagai akibat dari penangkal fungsional oleh *protein tyrosine phosphatase* (PTP), sehingga terjadi keseimbangan antara tirosin kinase dan PTPs²⁴.



Gambar 2.1. Mekanisme VEGF-A pada DM²⁶

2.2. *Pancreatic Duodenal Homeobox 1 (PDX1)*

Kelenjar pankreas terdiri atas eksokrin dan endokrin. Kelenjar eksokrin yang terdiri dari asinar dan duktus bekerja memetabolisme nutrisi. Kelenjar endokrin pankreas tersebar diseluruh organ memiliki pulau langerhans berfungsi menghasilkan insulin. Kelenjar endokrin pankreas berfungsi untuk mengeluarkan enzim pencernaan dan bertanggung jawab homeostasis glukosa²⁷. Kelenjar pankreas terdiri atas : sel α (memproduksi glukagon), sel β (memproduksi insulin), sel δ (memproduksi somatostatin), sel PP (memproduksi polipeptida pankreas). Sel β pankreas bertanggung jawab atas transkripsi, sintesis, dan pelepasan hormone insulin sebagai respon terhadap glukosa²⁸. Gambaran histologi pankreas yang normal (gambar 2.2) menunjukkan keteraturan susunan sel-sel yang menyebar di pulau Langerhans dan tidak adanya ruang yang kosong ditengah pulau langerhans



Gambar 2.2. Histologi Pankreas Tikus

Pancreatic Duodenal Homeobox 1 (PDX1) merupakan faktor penting dalam regulasi ekspresi gen insulin, mengatur perkembangan, pematangan dan diferensiasi sel β^{28} . PDX1 terletak di lokus kromosom 13q12.1. Transkripsi protein akan mengaktifkan gen seperti insulin, nucleusase, somatostatin dan islet amyloid polipeptida yang akan mengatur metabolisme glukosa dan merupakan faktor transkripsi untuk perkembangan pankreas.²⁵

PDX1 pada embrio tikus terbentuk pada hari ke 8.5 di endoderm dorsal usus, ekspresi pada hari ke 9.5 akan menjadi bagian tunas pankreas bagian ventral dan dorsal. PDX1 yang tidak berkembang pada masa embrionik menyebabkan pankreas tidak berkembang menyebabkan hiperglikemia serta kematian perinatal. Kadar PDX1 di kelenjar endokrin pada manusia dewasa dipertahankan dalam jumlah yang tinggi berfungsi sebagai transkripsi insulin, sedangkan ekspresi rendah di kelenjar eksokrin²⁶.

PDX1 mengatur beberapa gen untuk mempertahankan fungsi sel pankreas mengendalikan kadar glukosa darah. Sachdeva et al menemukan PDX1 sebagai gen fungsional yang meregulasi metilasi utama pada DM tipe 1. Penelitian sebelumnya menemukan diabetes akan terjadi apabila PDX1 dihilangkan secara lengkap pada tikus, apabila masih membawa satu alel menunjukkan tingkat toleransi glukosa normal. Hal ini menunjukkan bahwa sel dewasa dapat hidup tanpa keberadaan PDX1²⁹.

ROS hasil dari proses inflamasi berkepanjangan pada pankreas DM tipe 1 akan menyebabkan peningkatan aktivasi second messenger *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) yang berdampak pada penurunan ekspresi PDX1 sehingga menurunkan produksi insulin²⁹.

2.3. Diabetes Melitus Tipe 1

2.3.1. Definisi

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme yang dapat disebabkan berbagai macam etiologi, disertai dengan adanya hiperglikemia kronis akibat gangguan sekresi insulin atau gangguan kerja insulin atau keduanya. Sedangkan DM tipe 1 adalah kelainan sistemik akibat terjadinya gangguan metabolisme glukosa yang ditandai oleh hiperglikemia kronik disebabkan karena kerusakan sel β pankreas baik oleh proses autoimun maupun idiopatik sehingga produksi insulin berkurang bahkan terhenti⁵.

2.3.2. Etiologi

Penderita DM tipe 1 biasanya tidak mempunyai riwayat keluarga dengan penyakit serupa. Faktor genetik dan lingkungan sangat berperan dalam terjadinya DM tipe-1. Faktor genetik dikaitkan dengan pola *Human Leucocyte Antigen* (HLA) tertentu, tetapi sistem HLA bukan merupakan faktor satu-satunya ataupun faktor dominan pada patogenesis DM tipe-1. Peran HLA sebagai suatu *susceptibility gene* atau faktor kerentanan. Faktor lingkungan

berinteraksi dengan faktor genetik menjadi pemicu autoimunitas. DM tipe 1 yang terjadi pada usia dini menunjukkan adanya paparan faktor lingkungan pada tahun pertama kehidupan seperti adanya infeksi enteroviral, perubahan komposisi mikrobioma usus karena konsumsi susu sapi,ereal atau gluten dini dan defisiensi vitamin D dapat mempengaruhi autoimunitas sel³¹.

Pada beberapa pasien dengan DM tipe 1 yang baru berkembang, hanya sebagian kecil sel yang tidak rusak. Pemberian insulin meningkatkan fungsi sel-sel yang tersisa, mengurangi kebutuhan akan insulin ekstrinsik. Periode ini dikenal sebagai periode bulan madu atau bulan madu dengan kontrol glikemik yang baik. Tahap ini biasanya dimulai dalam beberapa minggu setelah dimulainya pengobatan dan berlangsung hingga 36 bulan. Untuk beberapa pasien, itu bisa bertahan hingga 2 tahun⁵.

2.3.3. Patofisiologi

Diabetes melitus tipe 1 terjadi karena interaksi kompleks antara sel pankreas dan sistem imun bawaan dan adaptif. Beberapa infeksi virus dikaitkan dengan DM tipe 1, dan enterovirus adalah salah satu infeksi yang paling sering dikaitkan. Protein kapsid enterovirus utama VP1 dan RNA baru-baru ini telah terdeteksi di pulau pankreas manusia DM tipe 1, bersama dengan ekspresi berlebih dari kompleks gen histokompatibilitas kelas utama dan indeks infeksi virus lainnya. Satu kemungkinan adalah bahwa

beberapa orang dengan DM tipe 1 mungkin memiliki infeksi virus kronis atipikal yang mengarah pada perkembangan peradangan kronis dan autoimunitas¹.

2.3.4. Gambaran Klinis

Kebanyakan pasien dengan DM tipe 1 memiliki riwayat penyakit klinis akut. Gejala klasik seperti poliuria, polidipsia, nokturia, enuresis, penurunan berat badan yang cepat 2-6 minggu sebelum diagnosis, terkadang polifagia dan gangguan penglihatan. Diagnosa DM dapat ditegakkan dengan melakukan pemeriksaan dengan menggunakan darah vena³² :

- a. Gejala klasik dan GDP ≥ 126 mg/dL
- b. Gejala klasik dan GDS ≥ 200 mg/dL
- c. Gejala klasik dan GD 2 jam setelah TTGO ≥ 200 mg/dL
- d. Tanpa gejala klasik dan 2 kali pemeriksaan GDP ≥ 126 mg/dL
- e. Tanpa gejala klasik dan 2 kali pemeriksaan GDS ≥ 200 mg/dL
- f. Tanpa gejala klasik dan 2 kali pemeriksaan GD 2 jam setelah TTGO ≥ 200 mg/dL
- g. HbA1c $\geq 6,5\%$

Penundaan diagnosa sering terjadi pada diagnosis DM tipe 1. Pada beberapa anak, gejala ketoasidosis mungkin muncul sangat awal, tetapi pada anak lain, gejala tersebut mungkin muncul perlahan selama beberapa bulan. Akibat keterlambatan diagnosis, penderita DM tipe 1 dapat memasuki tahap ketoasidosis dan

berakibat fatal bagi penderita. Keterlambatan ini juga dapat terjadi karena pasien diduga mengalami asidosis atau bronkopneumonia dengan syok berat akibat gastroenteritis³².

DM tipe-1 dan 2 pada remaja *overweight* atau obesitas perlu ditelusuri riwayat keluarga lengkap, pengukuran autoantibodi *islet*, dan konsentrasi C-peptida plasma atau urin. Cho dkk melaporkan bahwa kadar C-peptida puasa dapat membantu klasifikasi tipe DM saat diagnosis pada anak dan remaja. Pemeriksaan autoantibodi pada anak dengan DM belum menjadi pemeriksaan yang rutin dilakukan karena ketersediaan pemeriksaan yang belum luas dan relatif mahal di Indonesia. Penanda serologi untuk autoimunitas terhadap sel β pankreas, antara lain, (1) *glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies* (GAD), (2) *Tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2* (IA2), (3) *insulin autoantibodies* (IAA), dan (4) β -cell-specific zinc transporter 8 autoantibodies (ZnT8). Hasil positif pada salah satu penanda serologi tersebut memastikan diagnosis DM tipe-1. Skrining DM tipe 1 pada anak asimtomatis dengan panel antibodi hanya direkomendasikan dalam penelitian dan jika memiliki anggota keluarga derajat pertama dengan DM tipe-1³³.

Karakteristik klinis saat diagnosa ditegakkan³² :

- a. Tidak terdapat kegawatan
 - 1) Enuresis (mengompol) pada anak yang sudah tidak mengompol dapat menyebabkan kesalahan diagnosis dengan infeksi saluran kemih.
 - 2) Kandidiasis vaginal, terutama pada anak perempuan prapubertas.
 - 3) Penurunan berat badan kronis atau gagal tumbuh.
 - 4) Iritabilitas dan penurunan prestasi di sekolah.
 - 5) Infeksi kulit berulang.
- b. Terdapat kegawatan (Ketoasidosis diabetik atau hiperglikemia hiperosmolar)
 - 1) Dehidrasi sedang sampai berat.
 - 2) Muntah berulang dan pada beberapa kasus nyeri perut (menyebabkan kesalahan diagnosis sebagai gastroenteritis).
 - 3) Tetap terjadi poliuri meskipun dehidrasi.
 - 4) Kehilangan berat badan oleh karena kehilangan cairan dan otot serta lemak.
 - 5) Pipi kemerahan karena ketoasidosis.
 - 6) Bau pernapasan aseton.
 - 7) Hiperventilasi pada ketoasidosis diabetik (pernapasan Kussmaul).

- 8) Gangguan sensorik (disorientasi, apatis sampai dengan koma)
 - 9) Syok (nadi cepat, sirkulasi perifer memburuk dengan sianosis perifer).
 - 10) Hipotensi (tanda paling terlambat dan jarang pada anak ketoasidosis diabetic)
- c. Kondisi yang menyebabkan keterlambatan diagnosis
- 1) Pada anak yang sangat muda dapat terjadi ketoasidosis yang berat karena defisiensi insulin terjadi secara cepat dan diagnosis tidak ditegakkan segera.
 - 2) Hiperventilasi pada ketoasidosis salah diagnosis sebagai pneumonia atau asma.
 - 3) Nyeri perut berhubungan dengan ketoasidosis dapat menyebabkan akut abdomen sehingga pasien dirujuk ke bedah.
 - 4) Poliuria dan enuresis salah diagnosis sebagai infeksi saluran kemih.
 - 5) Polidipsia diduga sebagai psikogenik
 - 6) Muntah salah diagnosis sebagai gastroenteritis atau sepsis.

Perjalanan alamiah DM tipe 1 ditandai dengan masa remisi (sebagian/total) yang dikenal dengan honeymoon period. Periode ini terjadi karena fungsi jaringan pankreas yang tersisa, seperti halnya pankreas mengeluarkan insulin yang tersisa. Periode ini berakhir

ketika pankreas kehabisan insulin yang tersisa³⁴. Secara klinis, jika pasien baru dengan DM tipe 1 sering mengalami serangan hipoglikemik dan perlu mengurangi kebutuhan insulin untuk menghindari hipoglikemia, ada atau tidak adanya periode ini harus dicurigai. Jika dosis insulin yang dibutuhkan mencapai <0,5 U/kg/hari, HbA1c <7%, pasien berada pada tahap “remisi parsial”. Periode ini dimulai dalam beberapa hari atau minggu setelah memulai terapi insulin dan berlangsung dari minggu ke tahun. Selama waktu ini, kadar gula darah stabil dalam kisaran normal meskipun pengaturan makanan dan olahraga berfluktuasi³⁶.

2.3.5. Pengelolaan DM tipe 1

Diabetes melitus tipe 1 tidak dapat disembuhkan, tetapi kualitas hidup pasien dapat dipertahankan secara optimal dengan kontrol metabolisme yang baik. Kontrol metabolik yang baik berusaha untuk menjaga kadar glikemik dalam atau mendekati tingkat normal tanpa menyebabkan hipoglikemia, mencegah komplikasi jangka panjang mikrovaskular dan makrovaskular. Meskipun masih dianggap sebagai kelemahan, parameter HbA1c merupakan parameter standar untuk pengendalian metabolik DM. Nilai HbA1c < 7% kontrol metabolik baik, HbA1c < 8% cukup dan > 8% dianggap buruk. Pada anak-anak, semakin rendah HbA1c, semakin tinggi risiko hipoglikemia, sehingga kriteria ini harus disesuaikan dengan usia³⁷.

Tata laksana DM tipe-1 adalah injeksi insulin, pemantauan gula darah, nutrisi, aktivitas fisik, serta edukasi⁵.

2.3.5.1. Insulin

Insulin diklasifikasikan menurut durasi kerjanya: cepat, pendek atau teratur, sedang dan panjang. Terapi insulin bersifat personal, menyesuaikan dengan usia, berat badan, durasi penyakit, tujuan kontrol glikemik, gaya hidup, dan komorbiditas¹.

Regimen yang direkomendasikan adalah bolus basal yang diberikan setidaknya dua kali sehari dengan pompa atau insulin subkutan menggunakan insulin basal dan insulin kerja cepat atau kerja pendek yang paling mirip dengan sekresi insulin fisiologis. penggunaan insulin normal). Hingga 50% dari total kebutuhan insulin (bila menggunakan insulin kerja cepat). Pada pasien yang menggunakan insulin normal, rasio insulin basal lebih rendah karena insulin normal juga memiliki efek basal. Dosis insulin yang tersisa disesuaikan dengan dosis sebelum makan dengan insulin kerja cepat atau reguler Rasio insulin terhadap karbohidrat dapat digunakan untuk menentukan dosis insulin kerja cepat. Ini dihitung menggunakan Persamaan 500 dan dibagi dengan total dosis

insulin harian. Hasilnya adalah berapa gram karbohidrat yang dapat ditutupi dengan satu unit insulin⁵.

Penyesuaian dosis insulin dapat ditentukan berdasarkan pola harian kadar glukosa darah. Saat memberikan insulin kerja cepat Glukosa darah diperiksa 12 jam setelah makan untuk menentukan efektivitas insulin. Peningkatan kadar glukosa darah sebelum sarapan memerlukan penyesuaian dosis insulin kerja menengah atau insulin kerja panjang sebelum makan malam atau sebelum tidur. Peningkatan glukosa darah postprandial membutuhkan peningkatan dosis insulin kerja cepat atau reguler. Dosis insulin harus ditentukan berdasarkan asupan makanan atau karbohidrat dan hasil tes GDS³⁸.

Dosis insulin yang dimodifikasi diberikan ketika kadar gula darah meningkat. Faktor sensitivitas insulin digunakan saat menghitung dosis yang dikoreksi. Ini menentukan tingkat gula darah yang dapat dikurangi dengan satu unit insulin. Dosis yang dikoreksi dihitung menggunakan formula insulin kerja cepat 1800 dibagi dengan total dosis insulin harian. Dosis koreksi insulin kerja pendek dihitung dengan menggunakan rumus 1500, yaitu 1500 dibagi dengan dosis insulin harian total. Dari perhitungan ini dengan total dosis insulin harian. Dosis

koreksi insulin kerja pendek dihitung dengan menggunakan rumus 1500, yaitu 1500 dibagi dengan dosis insulin harian total. Dari perhitungan ini akan diketahui berapa banyak gula darah yang dapat diturunkan dengan pemberian 1 IU insulin¹.

Saat ini, terapi pompa insulin (*Continous Subcutaneus Insulin Infusion* [CSII]) populer di negara maju. Dengan CSII, dosis bolus dapat disesuaikan dengan asupan makanan sedangkan dosis basal dapat diperbaiki atau bervariasi. Data pompa dapat diunduh untuk memantau pola dosis bolus. CSII meningkatkan ketidakstabilan glikemik, kadar HbA1C > 15, perkembangan hipoglikemia, dan kebutuhan insulin. Sayangnya, CSII belum tersebar luas di Indonesia. Berdasarkan data dari Registri UKK Endokrinologi IDAI pada Oktober 2018, pengguna secara konsisten menggunakan rejimen insulin CSII intensif tradisional. Mereka adalah 52,9%, 46,3% dan 0,7%³⁵.

2.4. *Mesenchymal Stem Cell*

2.4.1. Definisi

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel, termasuk sel adiposity, osteoblast, kondrosit, neuronal, miosit, β -pankreas. Memiliki dua karakteristik, yaitu pembaruan diri secara terus menerus (*self*

renewal) dan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel dewasa yang terspesialisasi⁴⁰.

Beberapa klasifikasi MSC:⁴¹

2.4.1.1. Berdasarkan plasitisitas

- Totipoten adalah sel yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel
- Pluripoten adalah sel-sel yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh, namun tidak dapat membentuk organisme baru
- Multipotent adalah sel yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dewasa

2.4.1.2. Berdasarkan Sumber Asal

- Sel punca embrionik
- Sel punca dewasa

2.4.2. Fungsi

2.4.2.1. Imunomodulator

MSC mampu meregulasi system imun dan mempercepat perbaikan jaringan yang mengalami kerusakan melalui mekanisme parakrin. MSC memberikan efek imunosupresif pada sel B, sel *Natural killer* (NK), sel dendritik dan netrofil⁴².

2.4.2.2. Kemampuan Diferensiasi

MSC mempunyai kemampuan untuk memperbarui diri dan mempertahankan multipotensi yang artinya dapat berdiferensiasi menjadi osteoblast, adiposity, kondrosit dan miosit⁴³.

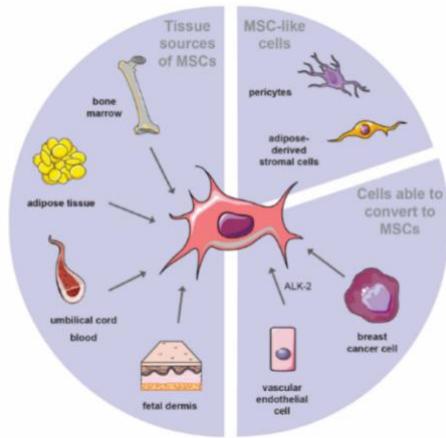
2.4.2.3. Antimikrobial

Efek antimikrobial MSC sangat kuat baik melalui mekanisme langsung atau tidak langsung, sebagian besar dimediasi oleh protein antimikroba (AMP). Sekresi AMP yang diekspresikan oleh MSC : cathelicidin LL-37, human defensins, hepcidin dan lipocalins⁴⁴.

2.4.3. Sumber

Sumber utama dari stem cell berasal dari embrio dan sumsum tulang, tetapi beberapa penelitian melaporkan berbagai jaringan yang mengandung MSC sebagai berikut⁴¹

- a. Jaringan *dental pulp*
- b. Jaringan adiposa
- c. Sel somatik (kulit)
- d. Jaringan plasenta
- e. Jaringan endometrial

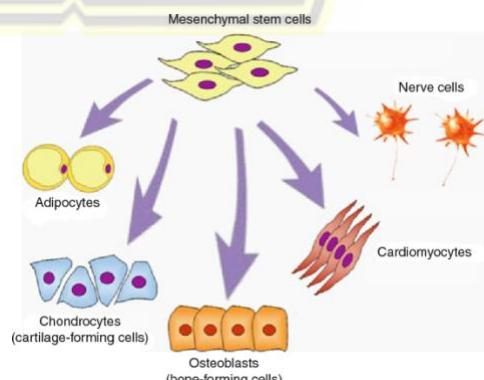


Gambar 2.3. Sumber mesenchymal stem cell (MSCs)⁵³

2.4.4. Karakteristik

MSC memiliki tiga karakteristik biologis yang memenuhi syarat sebagai terapi seluler⁴¹:

- Dapat mengekspresikan penanda permukaan sel tertentu seperti CD73, CD90 dan CD105 dan tidak memiliki ekspresi penanda lain termasuk molekul permukaan CD45, CD34, CD14, atau CD11b, CD79alpha atau CD19 dan HLA-DR;
- Mempunyai sifat perlekatan pada plastic kultur
- Memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit dan kondroblas dalam kondisi *in vitro*.



Gambar 2.4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs⁵⁶

2.4.5. Peran MSCs

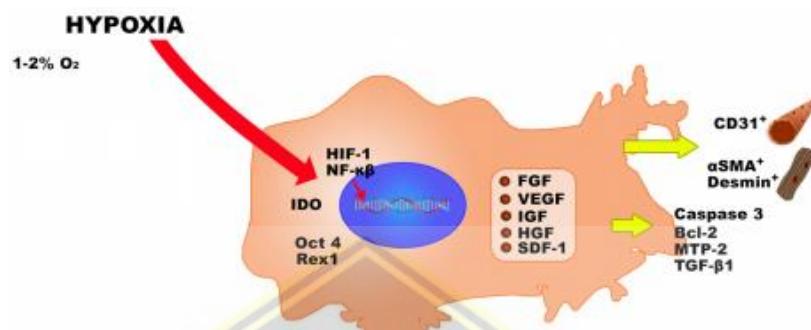
Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan 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^{57,58}.

2.5. Hipoksia

2.5.1. 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 pelekatkan MSCs⁴². Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs⁴³.



Gambar 2.5. Lingkungan hipoksia mengaktifasi MSCS⁶²

2.5.2. Mekanisme Fisiologi Seluler

Ketergantungan kuat pada oksigen untuk homeostasis metabolismik 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)⁴⁴.

HIF adalah heterodimer yang terdiri dari subunit protein HIF α , yang hanya diekspresikan selama hipoksia, dan subunit protein HIF1 β yang diekspresikan secara konstitutif. Selama normoksia, subunit HIF α dihambat oleh kompleks VHL dan ditargetkan untuk degradasi proteasomal. Interaksi yang bergantung pada normoksia antara subunit HIF α dan kompleks VHL membutuhkan hidroksilasi

dari dua residu prolin dalam domain *oxygen-dependent degradation* (ODD) dari HIF α . Reaksi hidroksilasi ini, yang dikatalisis oleh *HIF-regulating prolyl-4-hydroxylases*, digabungkan dengan dekarboksilasi oksidatif-ketoglutarat menjadi suksinat dan karbon dioksida⁴⁵.

Hipoksia terjadi apabila adanya subunit HIF- α lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerissasi dengan HIF-1 β dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi peralihan dari metabolisme bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik⁴⁴. HIF-1 α diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 α dan HIF-3 α 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 α memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respons terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 α dan HIF-3 α memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen⁴⁵.

2.6. Sekretom

2.6.1. Definisi

Sekretom merupakan zat yang dihasilkan MSC mengandung faktor parakrin larut yang bertanggung jawab untuk perkembangan jaringan, homeostasis, regenerasi. Sekretom mampu mengeluarkan

molekul neuroregulasi penting, seperti: faktor neurotropik yang diturunkan dari otak (BDNF), faktor pertumbuhan saraf (NGF), faktor pertumbuhan insulin 1 (IGF-1), faktor pertumbuhan hepatosit (HGF), faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), faktor pertumbuhan transformasi beta (TGF- β), faktor neurotropik turunan glial (GDNF), faktor pertumbuhan fibroblas 2 (FGF-2), faktor sel induk (SCF), faktor perangsang koloni granulosit (G-CSF) dan faktor turunan sel stroma (SDF-1) baik secara *in vitro* maupun *in vivo*⁴⁶.

2.6.2. Komposisi

Komposisi sekretom yang telah diteliti dan dapat digunakan untuk terapi tanpa sel : anti inflamasi (IL-4, IL-10, IL-3 dan TGF β), pro-inflamasi (IL2, IL12, IFNr, TNF α , IL1 α), chemokines (MCP1, IL-8, MIP1b), hemopoeitik (G-SCF dan GM-CSF), faktor pleitropik (IL-6)⁴⁷.

2.6.3. Modifikasi Pendorong Sekret Mesenchymal Stem Cell

Terdapat beberapa bukti yang menunjukkan bahwa modifikasi MSC dapat meningkatkan efek terapeutik sekretomnya. Berbagai rangsangan dan kondisi yang telah dikembangkan antara lain⁴⁸:

- a. Kultur sel dalam kondisi hipoksia, meningkatkan produksi faktor pertumbuhan dan molekul anti-inflamasi; rangsangan pro-

inflamasi, menginduksi sekresi lebih tinggi dari faktor - faktor yang berhubungan dengan imunitas;

- b. Kultur pada sistem tiga dimensi, yaitu kultur sferoid, meningkakan produksi faktor anti-inflamasi dan anti-tumor
- c. Rekayasa mikropartikel.

2.7. *Streptozotocin*

Streptozotocin didapatkan dari *Streptomyces achromogenes*. *Streptozotocin* memiliki struktur analog glukosa dengan penambahan N-asetil glikosamine dan bersifat toksik pada sel beta pankreas⁴⁹. *Streptozotocin* sering digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan coba⁵⁰.

Streptozotocin bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA), sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin oleh sel beta langerhans pankreas⁵².

2.8. Hubungan Sekretom hipoksia Mesenchymal Stem Cells terhadap Gen VEGF dan PDX1

Sekret dari *Mesenchymal Stem Cell*, yaitu sekretom mengandung berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin, sehingga dapat digunakan sebagai terapi alternatif yang baik untuk terapi berbasis *stem cell*.⁴⁷ MSC telah diketahui perannya dalam meningkatkan regenerasi jaringan yang terluka dengan kapasitasnya untuk berdiferensiasi menjadi beberapa jenis jaringan.

Penelitian terbaru telah melaporkan bahwa MSC yang dikondisikan dengan hipoksia meningkatkan kemampuan parakrin mereka⁵³.

Sitokin IL-1 β , TNF α dan IFN γ yang disekresikan oleh makrofag dan sel T memiliki peran besar dalam proses kerusakan sel pada DM Tipe 1. Sitokin-sitokin tersebut adalah penginduksi utama stres sel β yang bertanggung jawab atas tingkat kematian sel β hewan pengerat dan manusia pada model eksperimental dari DM Tipe 1⁵⁴.

Sekretom mengandung berbagai faktor anti-inflamasi yang diduga dapat memberikan efikasi pada sel islet DM tipe 1, diantaranya yaitu IL-10, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-CSF, IGF-1, dan HGF. IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang disekresi oleh sekretom yang dapat menurunkan sitokin pro-inflamasi (IL-6, TNF α , dan IL-1 β)^{16,55,67}.

Perlakuan prakondisi pada MSC dengan *pre-treatment* hipoksia meningkatkan efek imunomodulator MSC dengan meningkatkan sekresi sitokin dan faktor terlarut yang terkait dengan imunosupresi dari MSC⁵¹. Prokondisi Hipoksia meningkatkan sekresi VEGF, HGF, FGF, sekresi sel endotel yang akan menunjang proses angiogenesis⁵⁶.

Vaskularisasi jaringan pankreas dipengaruhi oleh ekspresi gen VEGF yang merupakan regulator dari proses vaskulogenesis, angiogenesis, permeabilitas pembuluh darah dan susunan sel endotelial pembuluh darah. Sel endothelial pembuluh darah pada β pankreas penderita DM berkurang jumlahnya disebabkan oleh resisten insulin. Sekretom memiliki faktor-

faktor pertumbuhan seperti VEGF, bFGF dan EGF akan meningkatkan angiogenesis dan regenerasi sel endotel sehingga ekspresi gen VEGF sel β pankreas akan meningkat⁸⁷⁻⁸⁸.

Faktor anti-inflamasi sekretom dapat mengaktifkan faktor spesifik pada sel progenitor pankreas seperti fosforilasi AKT dan PI3K akan merangsang peningkatan *forkhead-homeobox02* (FOX02) sehingga meningkatkan ekspresi PDX1. Secara keseluruhan sekretom merangsang proliferasi sel β pankreas sehingga ekspresi PDX1 meningkat seiring perbaikan sel islet yang sebelumnya rusak oleh karena proses autoimun⁶⁷.



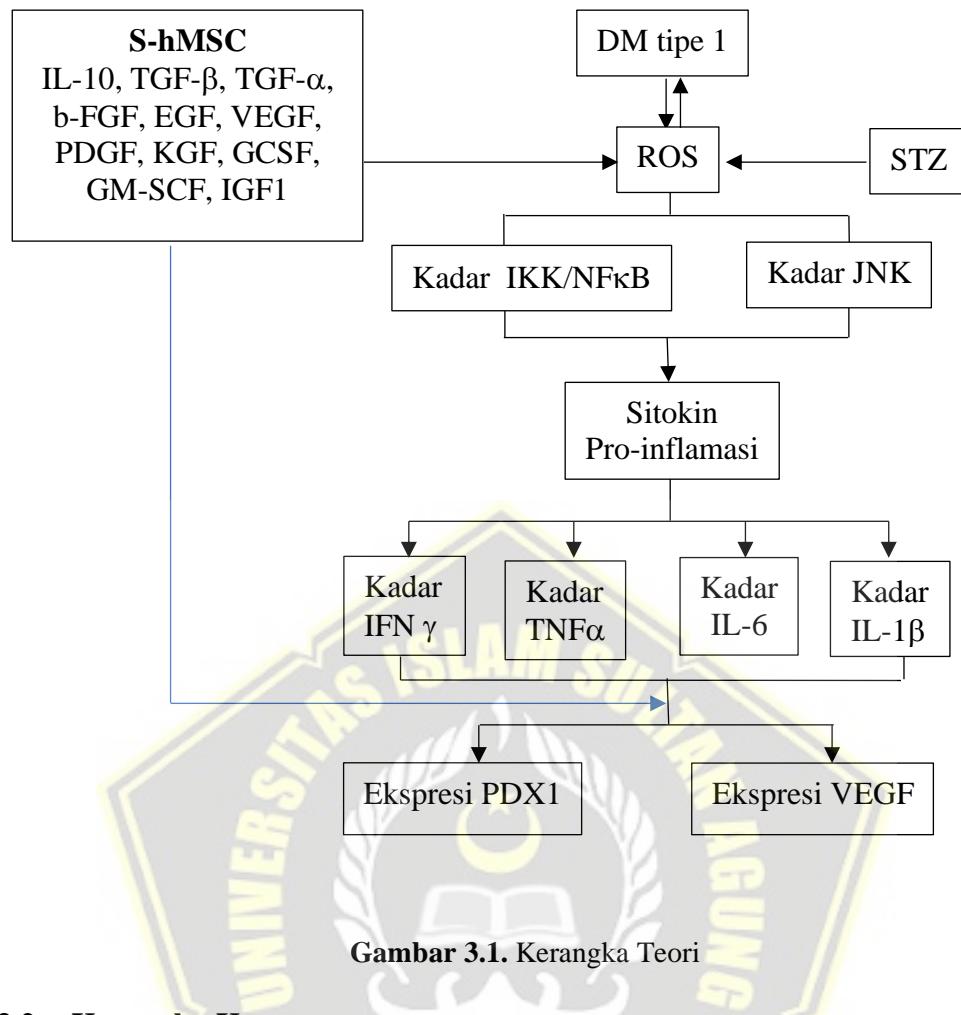
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

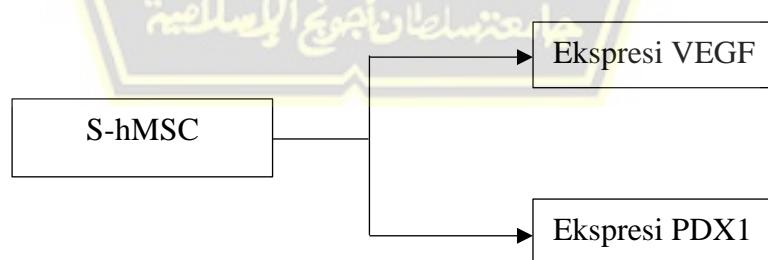
3.1. Kerangka Teori

Induksi STZ pada sel pankreas akan menginduksi stress oksidatif (ROS) yang mengaktifkan jalur IKK/NF-k β dan JNK/AP-1 untuk menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α , dan IFN- γ ⁵⁷. Pelepasan sitokin tersebut menyebabkan inflamasi yang berdampak terhadap kerusakan islet langerhans, kematian pada sel β -pankreas dan penurunan produksi insulin. Kerusakan tersebut menyebabkan penghambatan sekresi insulin yang menyebabkan kondisi hiperglikemia.

Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan *soluble molecule* berupa sitokin, kemokin dan *growth factor* lebih banyak dari pada kondisi normal⁶⁰. Sitokin-sitokin dan mediator-mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, IGF-1, dan HGF yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-hMSCs). Pada penelitian ini sekretom diberikan secara intraperitoneal pada tikus model DM tipe 1. Komponen VEGF pada S-hMSC mengaktifkan jalur angiogenesis sehingga meningkatkan ekspresi VEGF vaskular pankreas⁶⁵.



3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

1. Terjadinya peningkatan ekspresi VEGF sel β pankreas pada sampel tikus dengan model DM tipe 1 yang diinduksi streptozocin setelah pemberian S-hMSCs pada dosis (P1) 0.5 cc dan (P2) 1 cc.
2. Terjadinya peningkatan ekspresi PDX1 sel β pankreas pada sampel tikus dengan model DM tipe 1 yang diinduksi streptozocin setelah pemberian S-hMSCs pada dosis (P1) 0.5 cc dan (P2) 1 cc



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 $200\text{ g} \pm 10\text{ g}$ ($\text{cv} = 5\%$).

Perlakuan terdiri dari:

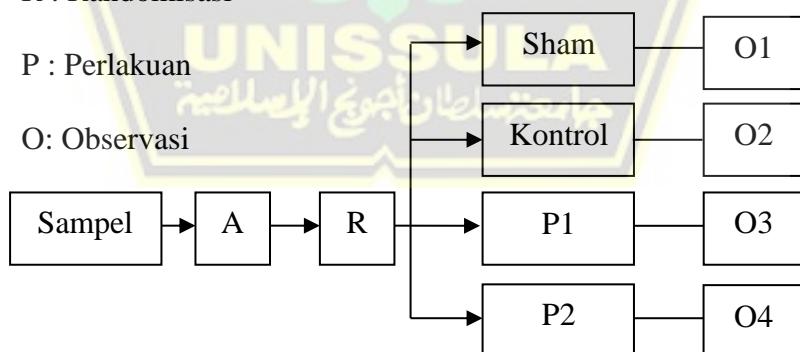
1. Kelompok: Sham (tidak diberi perlakuan),
2. Kelompok: Kontrol (DM Tipe 1 diinduksi STZ 4mg/minggu)
3. Kelompok: P1 (pemberian S-hMSCs secara intraperitoneal dosis 0.5 cc),
4. Kelompok: P2 (pemberian S-hMSCs secara intraperitoneal dosis 1 cc),

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: S-hMSCs dosis 0.5 cc dan 1 cc.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel dependen: ekspresi gen VEGF dan PDX1

4.2.1.3. Variabel Pengganggu

a. Variabel terkendali

1. Usia

Memilih subyek yang berumur 2 – 3 bulan.

2. Berat badan

Memilih subyek dengan berat badan antara 200 – 250 gram.

3. Waktu pengukuran kadar glukosa

Melakukan pengukuran kadar glukosa darah pada waktu yang sama.

4. Dosis perlakuan dan lama perlakuan

Dikendalikan dengan pemberian dosis perlakuan yang sama disesuaikan pada masing-masing kelompok tikus dan memberikan perlakuan selama sebulan.

5. Penyesuaian lingkungan

Dikendalikan dengan melakukan adaptasi pada subyek penelitian terlebih dahulu selama 3 hari.

b. Variabel tak terkendali

Subyek diberi pakan standar dan aquades jenis pakan yang diberi sama, namun jumlah yang dikonsumsi masing-masing subyek tidak diobservasi.

4.2.2. Defenisi Operasional

4.2.2.1. Sekretom Hipoksia MSCs (S-hMSC)

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*. S-hMSCs kemudian diinjeksikan secara intraperitoneal kepada beberapa kelompok yaitu kelompok P1 di berikan S-hMSCs 0.5 cc dan kelompok P2 di berikan S-hMSCs 0.5 cc. Injeksi S-hMSC dilakukan pada hari 1, 7 dan 14.

Skala: Rasio

4.2.2.2. Ekspresi gen VEGF

VEGF adalah mitogen spesifik sel endotel in vitro dan penginduksi angiogenik dalam jaringan pankreas. 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 gen PDX1

PDX1 adalah faktor transkripsi utama pada pankreas yang berperan dalam regenerasi jaringan pankreas dan sebagai regulator dalam produksi insulin. Sampel jaringan diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis *reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* (*Rattus norvegicus*) 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 dan timbul terjadi DM Tipe 1 setelah paparan STZ dosis 4mg/minggu 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

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

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat dan tidak cacat.
3. Bobot badan 200-250 gram.
4. S-hMSC dapat mengekspresikan CD90 dan CD29

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomicis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.3.3. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO

sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini setiap kelompok diberi tambahan 1 ekor tikus.

Pada penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 5 ekor sampel per kelompok. Kelompok sampel dalam penelitian disebar menjadi empat kelompok, maka besar sampel dapat dirumuskan:

Besar sampel = Jumlah kelompok penelitian x 5
 ekor/kelompok= 4×5 ekor= 20 ekor tikus jantan galur wistar.

4.3.4. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Berdasarkan besar sampel menurut kriteria WHO didapatkan jumlah sampel tiap perlakuan ≥ 5 sehingga total hewan coba yang diperlukan untuk penelitian ini adalah 20 ekor tikus putih jantan galur *Wistar*. Teknik Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Pertama, tikus diberi label dari 1 sampai 5. Lalu, membuat table kosong berisikan kolom yang berjumlah semua sampel penelitian yang terbagi dalam 4 kelompok perlakuan yaitu perlakuan Sham (tidak diberi perlakuan), Kontrol (hanya diberi induksi STZ 4mg/minggu), P1 (Pemberian S-hMSCs secara iv dengan dosis 0.5 cc), dan P2 (Pemberian S-hMSCs secara iv dengan dosis 1 cc), kemudian secara acak memasukan tikus tersebut ke dalam suatu kelompok dan memberi label pada tikus tersebut. Untuk cadangan setiap kelompok ditambah 1 ekor tikus sehingga total sampel setelah ditambah cadangan adalah 24.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri Biosafety Cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia

didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Selain itu penelitian ini menggunakan untuk induksi STZ dan pemberian S-hMSCs yaitu spuit 3 ml, jarum suntik 23-G, alat ukur glukosa digital, kandang tikus, tabung icrocentrifuge 1,5ml, sentifugator, alat qRT-PCR (Illumina) yang digunakan untuk analisis ekspresi gen VEGF dan PDX1

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 hewan penggerat (Harlan), Natrium sitray 50 mM pH 4,5 (ezzyme 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 Cells* dari *Umbilical Cord*

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

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

9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulenzi 80%.

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

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment soluution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline* (PBS) *buffer*. Sel dapat diresuspensi pada kosentrasi 5×10^6 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 sempel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ 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 dimasukan |
|--------|--|-----------------------|
| 1 | FITC mouse anti-human CD29 | 5µl |
| 2 | PE mouse anti-human CD90 | 5µl |
| 3 | PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45 | 5µl |
| 4 | APC Mouse anti-human CD31 | 5µl |
| 5 | Kosong | - |
| 6 | hMSC positive isotype control cocktail | 20µl |
| 6 | hMSC negative isotype control cocktail | 20µl |
| 7 | hMSC positive cocktail | 20µl |
| | PE hMSC negative cocktail | 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. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit 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 indicator menujukkan konsentrasi 5% oksigen.

5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFT untuk mendapatkan HypMSC-Scr yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis P1 dan P2.

4.5.5. Pembuatan Tikus Model DM Tipe 1

1. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dimasukan dalam satu kandang ,dua sampai lima tikus jantan pada suhu $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban $55\% \pm 5\%$, dengan siklus terang-gelap selama 12 jam (cahaya pada jam 8 : 00 dan mati pada pukul 20:00) Beri tikus akses menuju makanan dan air secara bebas.
2. Timbang semua tikus secara akurat 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, puaskan semua tikus selama 6 sampai 8 jam sebelum perlakuan STZ. Berikan minum seperti biasa.
4. Siapkan buffer natrium sitrat 50 mM (pH 4,5). Tempatkan 1 ml buffer ke dalam masing-masing tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tutup tabung dengan aluminium foil.
5. 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 65 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-10, puaskan semua tikus selama 6 sampai 8 jam. Uji kadar glukosa darah dari sampel vena di ekor menggunakan alat cek kadar gula digital. Kadar glukosa drah hewan coba $>150\text{mg/dl}$ lebih tinggi dibandingkan tikus kontrol.
10. Kadar glukosa puasa untuk hiperglikemia ringan harus $>150\text{ mg / dl}$ dan / atau menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik pada tikus yang disuntik STZ dibandingkan dengan tikus kontrol.
11. Pada minggu ke-3, sebagian besar tikus yang diinjeksi STZ mengalami diabetes berat dengan tingkat glukosa darah biasanya > 250 sampai 600 mg / dl .

12. Suatu zat uji atau senyawa sedang dinilai kemampuannya untuk mengoreksi hiperglikemia, perpanjang protokolnya lebih lama, tergantung pada kebutuhan eksperimental. Rawat kelompok hewan seperti yang dijelaskan pada langkah 3 sampai 9 untuk membentuk status diabetes dan kemudian obati hewan dengan terapi restoratif potensial. Sertakan kelompok yang menerima suntikan vehicle yang sesuai sebagai kontrol.
13. Tikus DM Tipe 1 yang telah terkonfirmasi di treatment S-hMSCs pada hari ke 7, 14, dan 21 dengan dosis P1 diinjeksi S-hMSCs 0.5 cc dan P2 S-hMSCs 1 cc. Tikus sham tidak di berikan treatmen apapun, sedangkan tikus control diberikan perlakuan STZ 4mg/minggu.

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 proses terminasi, koleksi organ pankreas kemudian disimpan dalam *cryotube* yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.
3. Pengumpulan sampel pankreas tikus.

4.5.7. 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 terlah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
2. Potongan pankreas 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 40C 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 isopropanol 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 μ m. Campuran diinkubasi pada suhu 55 $^{\circ}$ C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80 $^{\circ}$ 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 μ l OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 μ l, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70 $^{\circ}$ C.
10. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 μ l, DEPC-Treated H₂O 5 μ l, ReverTraAce 1 μ l. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 250C selama 5 menit, 42 $^{\circ}$ C selama 50 menit dan 85 $^{\circ}$ C selama 5 menit.

4.5.8. Pembacaan ekspresi gen VEGF dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

1. Ekspresi mRNA dari VEGF dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 μ l cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and MgCl₂) sebanyak 12,5 μ l,

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

3. PCR produk kemudian dianalisis dengan qRT-PCR dan peningkatan CT VEGF di kalkulasi terhadap gen house keeping β -actin.

4.5.9. Pembacaan ekspresi gen PDX1 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

1. Ekspresi mRNA dari PDX1 dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 µl cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and MgCl₂) sebanyak 12,5 µl, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 µl untuk primer forward dan reverse dan 8,3 µl Nuclease Free Water.
3. PCR produk kemudian dianalisis dengan qRT-PCR dan peningkatan CT PDX1 di kalkulasi terhadap gen house keeping β -actin.

4.6. Tempat dan Waktu Peneltian

4.6.1. Tempat Penelitian

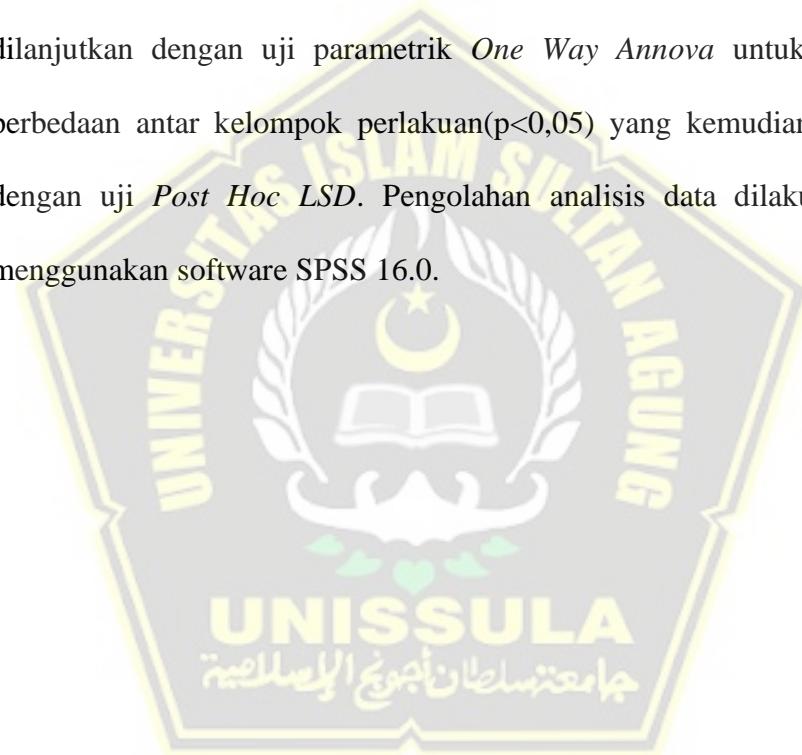
Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

4.6.2. Waktu Penelitian

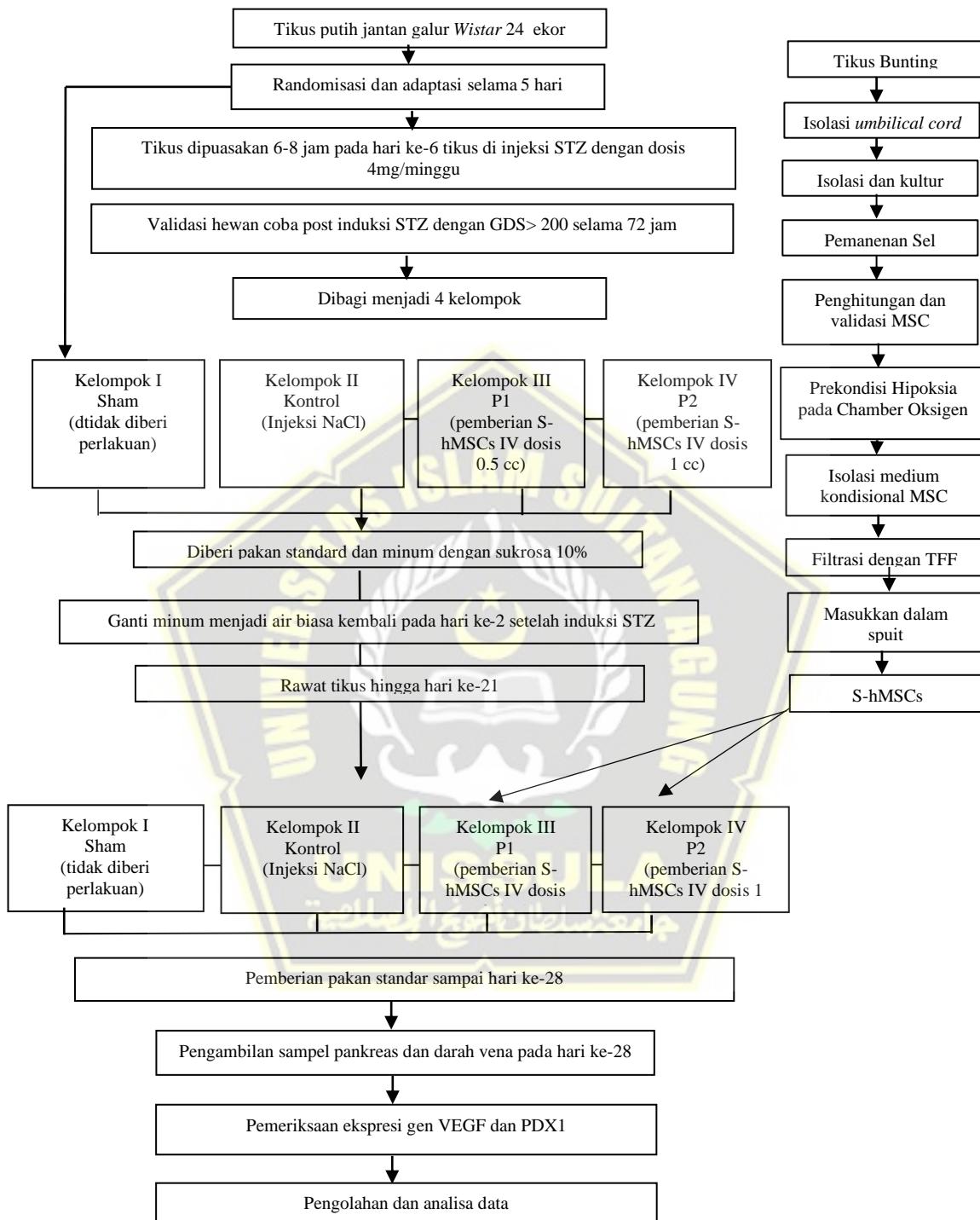
Penelitian dilakukan pada bulan Maret - April 2022.

4.7. Analisa Data

Data yang telah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Karena data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji homogenitas *Lavene test*. Data yang homogen dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Ananova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan($p<0,05$) yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD*. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan software SPSS 16.0.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Gambar Alur Penelitian

BAB V

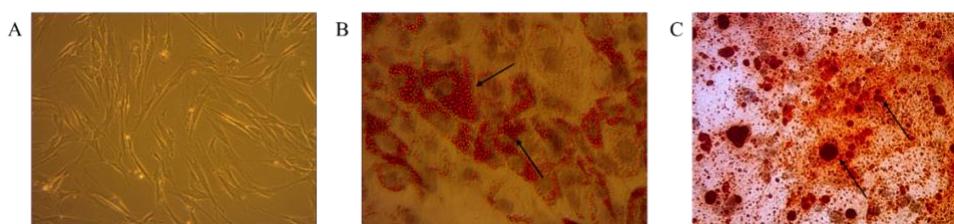
HASIL DAN PEMBAHASAN

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 200-250 gram dan berumur 2-3 bulan yang diinduksi *Streptozotocin* (STZ) dengan dosis 60 mg/kgBB pada hari ke-6 setelah diadaptasikan selama 5 hari dan dipuaskan 6-8 jam. Dalam penelitian ini jumlah sampel sebanyak 20 ekor dan tidak ada yang tereksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok dengan 1 kelompok Sham (tidak diberi perlakuan), 1 kelompok kontrol, dan 2 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan pertama (P1) terdiri atas 5 ekor hewan uji (Tikus DM Tipe 1) dengan pemberian injeksi S-hMSCs intraperitoneal dosis 0.5 cc pada hari ke 7, 14, dan 21 dan kelompok kedua (P2) terdiri atas 5 ekor hewan uji (Tikus DM Tipe 1) dengan pemberian injeksi S-hMSCs intraperitoneal dosis 1 cc pada hari ke 7, 14, dan 21. Untuk kelompok kontrol terdiri dari 5 ekor hewan uji yang hanya mendapatkan induksi STZ 60mg/kgBB dan NaCl sebagai *vehicle*. Sedangkan kelompok sham adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi Secretome Mesenchymal Stem Cell (MSC-Scr) dari Umbilical Cord

Isolasi MSC dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask plastik dengan penambahan medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS. Hasil kultur MSC setelah konfulenzi 80% didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis (Gambar 5.1 A). Hasil isolasi sel MSC divalidasi menggunakan uji diferensiasi untuk melihat kemampuan diferensiasi MSC menjadi osteogenik dan adipogenik⁶⁸. Uji diferensiasi adipogenik dengan pewarnaan *oil red O* yang menunjukkan terbentukan lipid droplet berwarna merah (Gambar 5.1 B). Uji diferensiasi osteogenik dengan pewarnaan *Alizarin red* menunjukkan terbentuknya deposisi kalsium yang ditandai dengan warna merah (Gambar 5.1 C).



Gambar 5.1. Hasil Validasi Isolasi Sel MSC

Validasi MSC juga dianalisis dengan *flow cytometry* untuk menunjukan MSC mampu mengekspresikan beberapa surface marker penanda MSC⁶⁹. MSC mampu mengekspresikan CD90 (99,80%), CD29 (94,20%) dan tidak mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%).



Gambar 5.2. Analisa Flowcytometry Terhadap Ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

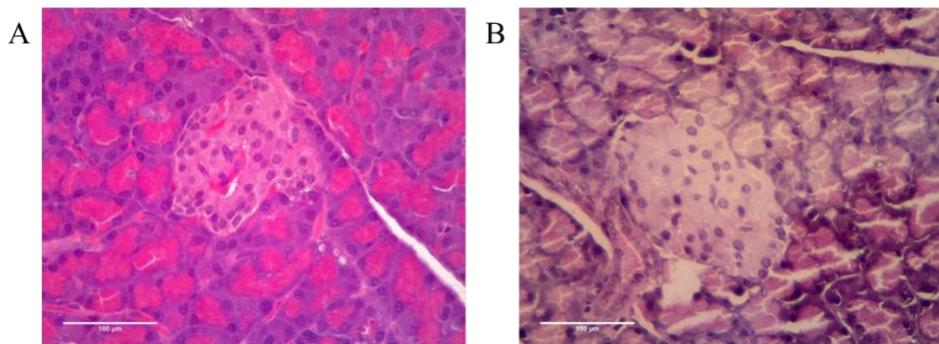
Penelitian Pidada et al melakukan pengamatan morfologi sel β -pankreas pada hewan model DM Tipe 1 dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE)⁷⁰. Pidada et al (2018) membuat preparat histopatologi dibuat sesuai prosedur Kiernan (2010) dan pewarnaan dengan metode Harris *Hematoksilin-Eosin* (HE)^{70,71}.

5.1.2. Validasi Tikus Model DM Tipe 1

Kelompok tikus yang diinduksi STZ 60 mg/kgBB menunjukan terdapat perbesaran sel β -pankreas dan kerusakan struktur inti sel yang menandakan terjadinya degenerasi sel β -pankreas dibandingkan kelompok sham (Gambar 5.3 A-B). Penelitian Dinullah dkk (2017) menunjukkan bukti bahwa pada kelompok kontrol positif yang diinduksi STZ terlihat perubahan morfologi organ pankreas, terdapat adanya rongga atau ruang intraseluler baik di daerah endokrin (pulau

Langerhans) maupun di daerah eksokrin (sel-sel asinar)⁷². Perubahan lainnya terjadi pada pulau Langerhans yaitu ketidakteraturan bentuk pulau Langerhans dan jumlah sel β - pankreas yang berkurang akibat adanya degenerasi sel endokrin. Perubahan yang terjadi menunjukkan bahwa STZ dapat merusak sel β -pankreas. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Erwin dkk. (2017) yang menyatakan pemberian STZ secara intraperitoneal mengakibatkan kerusakan pada sel β Langerhans pankreas. *Streptozotocin* bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA), sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin oleh sel β Langerhans pankreas⁷³.

Perubahan-perubahan pada sel-sel yang ditimbulkan oleh zat yang mempunyai efek sitotoksik yaitu pengecilan pulau-pulau Langerhans, pengurangan jumlah sel β dan degranulasi. Pada penderita diabetes melitus, beberapa sel β menunjukkan degranulasi lengkap dengan sitoplasma yang kosong⁷⁴. Berdasarkan penjelasan tersebut, terlihat bahwa tikus DM Tipe 1 berhasil terbentuk dan dapat digunakan sebagai hewan model DM Tipe 1 pada penelitian ini.



Gambar 5.3. (A) Kondisi Sel pada Kelompok Sham. (B) Kondisi Sel pada Sampel Penelitian setelah Dilakukan Induksi STZ dengan Dosis 60mg/kgBB. Perbesaran 100x

Kondisi tikus pada percobaan ini mengalami perubahan yang dapat dilihat dari hasil pemeriksaan GDS sebelum pemberian STZ, setelah pemberian STZ pada hari ke-7, 14 dan 21 dan sebelum terminasi. Peningkatan GDS tikus pada kelompok kontrol negative, kelompok P1 dan kelompok P2 di hari ke-7 percobaan dibandingkan dengan GDS tikus sebelum penyuntikan STZ. Kelompok kontrol mengalami rerata kadar GDS tikus menjadi 261,60 mg/dL, kelompok P1 menjadi 252,67 mg/dL dan kelompok P2 menjadi 263,86 mg/dL. Rerata GDS tikus yang sehat juga mengalami sedikit peningkatan menjadi 13,83 mg/dL, diduga karena stress selama perawatan. Hasil GDS diperiksa kembali pada hari ke-21 perlakuan didapatkan rerata GDS kelompok kontrol negative meningkat menjadi 401,67 mg/dL, sedangkan kelompok P1 dan P2 yang diberi S-hMSCs mengalami penurunan GDS menjadi 186,75 mg/dL dan 182,00 mg/dL.

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Ekspresi Gen VEGF dan PDX1

| 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 VEGF | 1.00±0.01 | 0.02±0.02 | 5.60±3.02 | 7.98±2.67 | |
| Saphiro wilk | 0.134 | 0.728 | 0.164 | 0.959 | 0.058 |
| Levene test | | | | | 0.004 |
| One way | | | | | |
| Anova | | | | | |
| Ekspresi gen PDX1 | 1.01±0.02 | 1.30±0.42 | 10.08±4.16 | 23.64±7.14 | |
| Saphiro wilk | 0.820 | 0.646 | 0.361 | 0.312 | 0.087 |
| Levene test | | | | | 0.000 |
| One way | | | | | |
| Anova | | | | | |

5.1.3. Pengaruh Pemberian S-hMSCs terhadap Ekspresi Gen VEGF pada Tikus Model DM Tipe 1

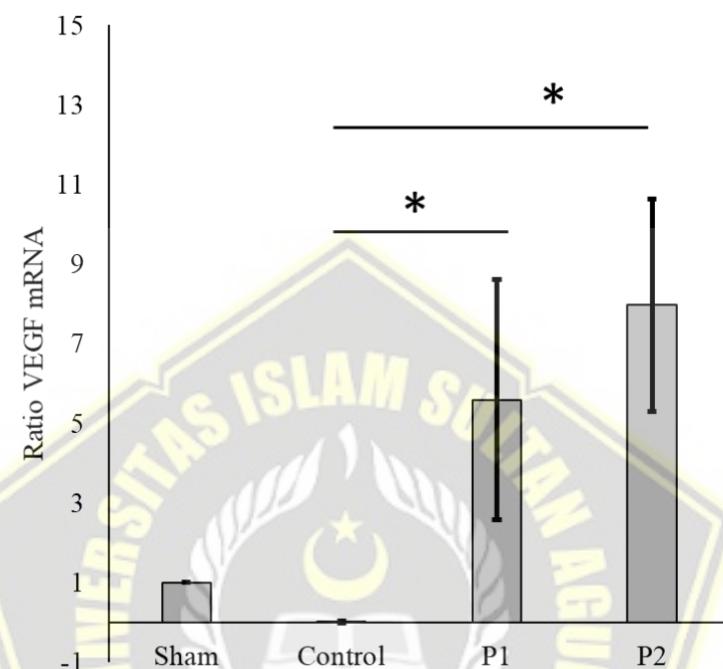
Diabetes melitus merupakan suatu gangguan metabolismik yang ditandai oleh hiperglikemia kronik. Hal ini disebabkan oleh kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin atau gangguan keduanya. Sebanyak 12-25% pasien DM mempunyai risiko untuk mengalami ulkus diabetika. Ulkus diabetika merupakan komplikasi yang sering terjadi pada pasien DM tipe 1 dan 2. Diabetes melitus merupakan suatu model prototipikal pada kejadian gangguan penyembuhan luka. Individu dengan DM menunjukkan kemampuan angiogenesis abnormal pada beberapa organ. Gen *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (VEGF-A), merupakan gen yang menjadi polipeptida VEGF. Studi fungsional yang telah dilakukan mengindikasikan bahwa polimorfisme pada gen ini memengaruhi ekspresi mRNA.

Ekspresi mRNA mempunyai peranan penting pada proses penyembuhan luka⁷⁵.

Beberapa protein yang bekerja sama dalam mengontrol pembentukan pembuluh darah baru di lokasi terjadinya luka adalah faktor pertumbuhan, protein matriks ekstraseluler (ECM), matriks metaloproteinase (MMP), integrin, dan sitokin⁷⁶. Terlepasnya *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), PDGF, dan TGF-β dari platelet, monosit, dan fibroblas merupakan pemicu terjadinya proses angiogenesis⁷⁷. Sel endotel bersifat responsif terhadap faktor-faktor pertumbuhan, seperti FGF, VEGF, PDGF, angiogenik, TGF- α , dan TGF- β . Sel endotel yang teraktivasi oleh molekul-molekul angiogenik kemudian merusak ikatan antar sel endotel, membran basement, dan komponen matriks ekstraseluler dengan melepaskan matriks metaloproteinase⁷⁸. Molekul-molekul tersebut membuat suatu sinyal angiogenik potensial dan merangsang sel endotel untuk bermigrasi ke matriks ekstraseluler, berproliferasi dan kemudian membentuk pembuluh immature^{78,79}. Kondisi hipoksia selama terjadinya luka menyebabkan molekul-molekul angiogenik disekresikan dan memicu terjadinya proliferasi dan pertumbuhan sel-sel endotel⁸⁰.

Pemberian S-hMSC menyebabkan peningkatan ekspresi gen VEGF secara tergantung dosis (Gambar 5.4). Pada kelompok P1 terdapat peningkatan ekspresi gen sebesar $5.60 \pm 3.02\%$ dan pada

kelompok P2 peningkatan sebesar $7.98 \pm 2.67\%$ dibandingkan dengan kelompok kontrol $0.02 \pm 0.02\%$. Hal ini menunjukkan bahwa S-hMSCs mengatur pelepasan *growth factor* yang berkaitan dengan regenerasi atau perbaikan sel β -pankreas pada DM Tipe 1.



Gambar 5.4. Grafik Ekspresi VEGF pada semua kelompok (*p signifikansi <0.05).

Tabel 5.2. Uji Post-hoc LSD ekspresi VEGF

| Kelompok | Kelompok Pebandingan | Signifikansi | Interval kepercayaan 95% | |
|----------|----------------------|--------------|--------------------------|------------|
| | | | Batas Bawah | Batas Atas |
| Sham | Kontrol | 0.000* | -9.6830 | -4.7450 |
| | P1 | 0.122 | -4.3810 | 0.5570 |
| | P2 | 0.446 | -3.3890 | 1.5490 |
| Kontrol | P1 | 0.000* | 2.8330 | 7.7710 |
| | P2 | 0.000* | 3.8250 | 8.7630 |
| P1 | P2 | 0.412 | -1.4770 | 3.4610 |

Uji Post Hoc: * mean difference significant P <0.05

Kemudian, data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif.

Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan hasilnya menunjukkan masing-masing perlakuan terdistribusi normal ($p>0,05$) untuk kelompok Gen VEGF, diketahui hasilnya sebagai berikut: kelompok kontrol; $p=0,728$, P1; $p=0,164$, P2; $p=0,959$. Hasil ini menandakan terdistribusi normal karena nilai $p>0.05$.

Selanjutnya, uji homogenitas menggunakan *uji Levene* menunjukkan hasil untuk kelompok Gen VEGF adalah $p=0.058$. Hasil ini menunjukkan bahwa data bersifat homogen ($p>0,05$). Sebaran data normal dan varian data sama, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

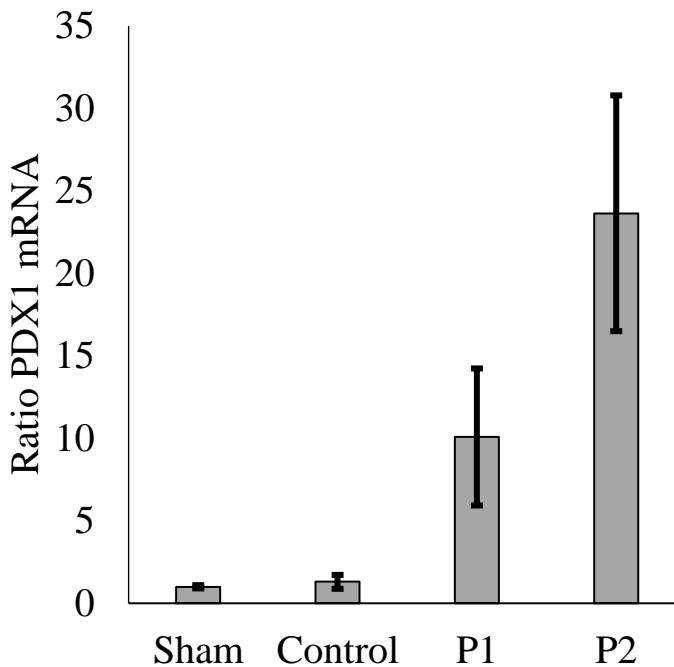
Uji parametrik *ANOVA* memperlihatkan hasil untuk kelompok Gen VEGF adalah $p=0.004$ sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p<0,05$). Uji lanjut menggunakan *Post-hoc Test* digunakan untuk mengetahui variabel mana yang memiliki perbedaan yang signifikan. Dari Tabel 5.6 juga menunjukkan bahwa sebagian perlakuan tidak memiliki perbedaan yang signifikan, yaitu kelompok sham dengan kelompok kontrol ($p=0,570$) serta kelompok P1 dengan P2 ($p=0,186$).

5.1.4. Pengaruh Pemberian S-hMSCs terhadap Ekspresi Gen PDX1 pada Tikus Model DM Tipe 1

Diabetes Melitus tipe 1 merupakan penyakit metabolismik yang disebabkan oleh kerusakan sel B pankreas baik oleh proses

autoimun, maupun idiopatik sehingga produksi insulin berkurang bahkan terhenti. Defisiensi insulin absolut biasanya didapatkan pada pasien Diabetes Mellitus tipe 1. Penyakit diabetes dapat dipengaruhi oleh gen pembentukan insulin, salah satunya adalah *Pancreatic Duodenal Homeobox 1* (PDX1) yang merupakan gen faktor transkripsi yang berperan dalam proses terbentuknya pankreas pada masa organogenesis serta maturasi sel β pankreas. Penurunan ekspresi gen PDX1 menyebabkan kegagalan maturasi sel β pankreas dan diabetes tipe 2. Defisiensi PDX1 dapat menyebabkan disfungsi dan kematian sel β pankreas yang menyebabkan penyakit diabetes. Kejadian ini dapat ditemui pada hewan pengerat maupun manusia²⁹.

Pemberian S-hMSC menyebabkan peningkatan ekspresi gen PDX1 secara tergantung dosis (Gambar 5.5). Pada kelompok P1 terdapat peningkatan ekspresi gen sebesar $10.08\pm4.16\%$ dan pada kelompok P2 peningkatan sebesar $23.64\pm7.14\%$ dibandingkan dengan kelompok kontrol $1.30\pm0.42\%$. Hal ini menunjukkan bahwa S-hMSCs mengatur regenerasi atau perbaikan gen *Pancreatic Duodenal Homeobox 1* (PDX1) pada DM Tipe 1.



Gambar 5.5. Grafik Ekspresi PDX1 pada semua kelompok (* p signifikansi <0.05).

Hasil uji normalitas *Shapiro Wilk* semua data dari masing-masing perlakuan terdistribusi normal ($p>0,05$). Pada Tabel 5.3, untuk kelompok Gen PDX1, diketahui bahwa: kelompok kontrol; $p=0,646$, P1; $p=0,361$, P2; $p=0,312$.

Kemudian, uji homogenitas menggunakan *uji Levene* menunjukkan hasil untuk kelompok Gen PDX1 adalah $p=0.087$. Hasil ini menunjukkan bahwa data bersifat homogen ($p>0,05$). Uji parametrik *ANOVA* diperoleh hasil untuk kelompok Gen PDX1 adalah $p=0.000$ sehingga terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p<0,05$). Uji lanjut menggunakan *Post-hoc Test* menunjukkan bahwa terdapat perlakuan tidak memiliki perbedaan

yang signifikan, yaitu kelompok sham dengan kelompok kontrol ($p=0,932$).

Tabel 5.3. Uji Post-hoc LSD Ekspresi PDX1

| Dependent Variable | (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | | Interval kepercayaan 95% | | |
|--------------------|--------------|--------------|-----------------------|------------|--------------------------|------------|--|
| | | | Signifikansi | Batas Atas | Batas Bawah | | |
| PDX1 | Sham | Kontrol | -0.2974010 | 0.932 | -8.090338 | 7.495536 | |
| | | P1 | -9.0829283* | 0.028 | -16.875866 | -1.289991 | |
| | | P2 | - | | | | |
| | P1 | Kontrol | 22.6438800* | 0.000 | -30.436817 | -14.850943 | |
| | | P2 | - | | | | |
| | | Kontrol | 13.5609517* | 0.004 | -21.353889 | -5.768014 | |
| | P2 | Kontrol | 22.3464790* | 0.000 | 14.553542 | 30.139416 | |

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Kemajuan terbaru dalam penelitian sel punca, terutama MSC telah membuka cakrawala baru dalam angiogenesis untuk pemulihan serta penyelamatan jaringan iskemik⁸¹. Faktor-faktor angiogenik yang dikeluarkan oleh MSC meliputi *Basic Fibroblast Growth Factor* (BFGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor beta* (TGF-β), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Angiopoietin-1* (ANG-1), *Placental Growth Factor* (PIGF), *interleukin 6* (IL-6), dan *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1). Seketul MSC secara positif merangsang angiogenesis *in vitro* dan *in vivo*⁸².

MSC secara aktif berpartisipasi dalam angiogenesis melalui diferensiasi langsung, interaksi kontak sel dengan turunan sel endotel, dan

melepaskan faktor pro-angiogenik secara parakrin. Faktor parakrin dapat meningkatkan suplai darah dari jaringan yang rusak melalui aktivasi dan rekrutmen sel punca dan sel progenitor. MSC memiliki beberapa faktor angiogenesis, termasuk *interleukin-8* (IL-8), *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF-1), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Faktor-faktor pro-angiogenik ini mampu membentuk jaringan pembuluh darah dan meningkatkan migrasi turunan sel endotel in vitro. Selain sekresi faktor angiogenik oleh MSC, terungkap bahwa berbagai faktor yang ada dalam sekretom dapat mengaktifkan sifat angiogenik dalam sel endotel. Sebagai contoh, MSC angiokrin darah tepi ditemukan mampu merangsang sifat fungsional endotel dengan menginduksi jalur pensinyalan VEGF-A melalui beberapa faktor seperti endotelin-1, IL-8, *Platelet-Derived Growth Factor-AA* (PDGF-AA), dan IGF-2. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa MSCs hipoksia lebih poten dalam meregenerasi jaringan rusak dibanding dengan MSCs normoksia, hal ini diduga karena MSCs hipoksia mengekspresi molekul *Heat Shock Protein* (HSP) jauh lebih tinggi dibanding normoksia, sehingga mampu melakukan *folding protein* yang menyebabkan fungsi protein intraseluler lebih optimal fungsinya, seperti VEGF dan PDGF⁴³. Penggunaan *Mesenchymal Stem Cell* dengan pemilihan dosis maksimal juga dapat mempercepat penyembuhan pada pankreas yang mengalami kerusakan yang biasanya dialami oleh para pasien penderita DM.

Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian perlakuan tidak memiliki perbedaan yang signifikan, yaitu kelompok sham dengan kelompok kontrol ($p=0,570$) serta kelompok P1 dengan P2 ($p=0,186$). Kelompok yang diinduksi STZ tidak berbeda bermakna dengan kelompok yg tidak terpapar karena hal ini menunjukkan bahwa hewan coba yang digunakan dalam kondisi fisiologis yang homogen, yakni dalam kadar glukosa darah normal sehingga dapat digunakan sebagai hewan uji. Kelompok P1, yaitu 5 ekor hewan uji (Tikus DM Tipe 1) dengan pemberian injeksi S-hMSCs IV dosis 0,5 cc dan kelompok P2, yaitu 5 ekor hewan uji (Tikus DM Tipe 1) dengan pemberian injeksi S-hMSCs IV dosis 1 cc tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada ekspresi Gen VEGF, sedangkan untuk kelompok sham dan kontrol juga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada ekspresi Gen VEGF. Berdasarkan data tersebut, bahwa pemberian injeksi S-hMSCs IV dosis 1 cc (dosis yang lebih besar) tidak mempengaruhi peningkatan kadar VEGF.

MSC diketahui dapat mensekresi VEGF dan faktor pertumbuhan lain serta meningkatkan proliferasi sel-sel endotel. Sekresi VEGF merupakan mediator sinyal dari sel β pankreas ke sel endotel untuk menginduksi pembentukan jaringan kapiler pada pulau Langerhans⁸³. Peningkatan dosis injeksi S-hMSCs IV diharapkan akan semakin meningkatkan sekresi VEGF. Hasil penelitian ini yang membuktikan bahwa pemberian injeksi S-hMSCs IV dosis 1 cc (dosis yang lebih besar) tidak mempengaruhi peningkatan kadar VEGF sejalan dengan hasil penelitian Muhar (2019) tentang Pengaruh

MSCs Hipoksia dan *MSCs Conditioned-Medium* dengan Teknik *Omental Patch* Terhadap Derajat Adhesi Peritoneal. Penelitian Muhar (2019) membuktikan bahwa tidak dijumpai adanya perbedaan kadar VEGF antara kelompok MSC hipoksia dosis tinggi dengan kontrol. Selanjutnya, Muhar (2019) juga menemukan bahwa peningkatan skor adhesi peritoneal diikuti dengan penurunan kadar VEGF dan peningkatan kadar PDGF karena kondisi objek penelitian sudah dalam kondisi perbaikan⁸⁴. Penelitian Sidharta (2018) memberikan sebuah kesimpulan bahwa kombinasi media kaya asam amino dan kondisi hipoksia dapat meningkatkan sekresi VEGF, khususnya pada kondisi hipoksia 5%⁸⁵.

Pemberian dosis S-hMSCs yang lebih tinggi tidak menimbulkan pengaruh disebabkan karena:

1. Sampel dari subjek penelitian ini (tikus jantan galur wistar dengan kondisi DM tipe 1) berasal dari strain yang sama sehingga pemberian dosis yang lebih tinggi dari injeksi S-hMSCs IV tidak berpengaruh terhadap gen glukoregulator tubuh.
2. Kondisi pankreas subjek penelitian ini (tikus jantan galur wistar dengan kondisi DM tipe 1) mengalami kerusakan sehingga seharusnya yang diperbaiki adalah gen glukoregulator tubuh. Sekresi VEGF merupakan mediator sinyal dari sel β pankreas ke sel endotel untuk menginduksi pembentukan jaringan kapiler pada pulau Langerhans. Kondisi sel β pankreas yang sudah rusak menyebabkan mediator (sekresi VEGF) tidak dapat menjalankan tugasnya dengan baik. Polimorfisme dari *human*

leukocyte antigen class II (HLA) gen yang mengkodekan DR dan DQ adalah penentu genetik utama DM tipe 1. Pasien DM tipe 1 sekitar 95% memiliki baik HLA-DR3 atau HLA-DR4. Pasien yang memiliki heterozigot haplotipe beresiko lebih besar secara signifikan untuk DM daripada homozigot. HLA-DQS juga dianggap penanda spesifik pada DM tipe 1. Sebaliknya, beberapa haplotipe (misalnya, HLA-DR2) memberikan proteksi yang kuat terhadap DM tipe 1 (Valdes,2011).

3. Penelitian ini tidak mengkombinasikan media kaya asam amino seperti penelitian Sidharta (2018) sehingga kurang dapat meningkatkan sekresi VEGF.

Kelompok kontrol dan sham tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,932$). Hal ini berarti untuk kelompok sham dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada ekspresi Gen PDX1. Kelompok yang diinduksi STZ tidak berbeda bermakna dengan kelompok yg tidak terpapar karena hal ini menunjukkan bahwa hewan coba yang digunakan dalam kondisi fisiologis yang homogen, yakni dalam kadar glukosa darah normal sehingga dapat digunakan sebagai hewan uji. Sedangkan dari gambar terdapat perbedaan signifikan antara kelompok yang lain, terutama untuk kelompok P1 dengan P2 ($p=0,004$), serta kelompok P2 dengan P1 ($p=0,004$). Kelompok P1, yaitu 5 ekor hewan uji (Tikus DM Tipe 1) dengan pemberian injeksi S-hMSCs IV dosis 0,5 cc dan kelompok P2, yaitu 5 ekor hewan uji (Tikus DM Tipe 1) dengan pemberian injeksi S-

hMSCs IV dosis 1 cc menunjukkan perbedaan yang signifikan pada ekspresi Gen PDX1.

Gen PDX1 merupakan gen glukoregulator tubuh yang secara tidak langsung berperan dalam pengaturan kadar glukosa darah. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda (dosis rendah maupun tinggi) dari injeksi S-hMSCs IV dapat meningkatkan ekspresi Gen PDX1. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan kondisi DM tipe 1. Diabetes tipe 1 adalah penyakit autoimun dimana sistem kekebalan tubuh menyerang sel β (sel penghasil insulin) di dalam klaster pankreas yang disebut Pulau Langerhans. Kebanyakan penderitanya adalah anak-anak dan remaja. Sel β bertanggung jawab untuk mengontrol kadar gula dalam darah dan memproduksi insulin untuk menjaga tetap stabil. Tanpa sel β , para penderita diabetes harus mendapat suntikan insulin. Injeksi S-hMSCs IV menjadi salah satu terapi baru dalam regenerasi sel dan salah satu nya membantu dalam regenerasi gen PDX1.

5.3. Keterbatasan Peneliti

1. Keterbatasan penelitian ini adalah tidak melakukan konfirmasi kadar HSP pada S-hMSCs yang mempengaruhi pelepasan VEGF.
2. Pada penelitian ini juga tidak melakukan pengamatan gen glukoregulator untuk menvalidasi bahwa tidak terjadi perbedaan yang signifikan akibat pemberian dosis S-hMSCs yang lebih besar pada hewan model dengan galur Wistar.

3. Pada penelitian tidak melakukan pengamatan sel β -pankreas setelah diberikan terapi S-hMSCs untuk memastikan perbaikan/ regenerasi sel β -pankreas.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan Penelitian

1. Terdapat pengaruh pemberian S-hMSCs 0,5 cc dan 1 cc terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF pada tikus model DM 1 dibanding dengan kontrol.
2. Terdapat pengaruh pemberian S-hMSCs dosis 0,5 cc dan 1 cc terhadap peningkatan ekspresi gen PDX1 pada tikus DM tipe 1 dibandingkan dengan kontrol.

6.2. Saran Penelitian

Saran bagi penelitian ini adalah:

1. Perlu pemeriksaan T Regulator setelah pemberian S-hMSCs.
2. Perlu mengkaji respon imun sel.
3. Perlu melakukan pengamatan sel sel β-pankreas setelah diberikan terapi S-hMSCs untuk memastikan perbaikan/ regenerasi sel β-pankreas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 Diabetes Mellitus : etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin North Am.* 2005;52(6):1553-78.
2. Jay S. Skyler, George L. Bakris, Ezio Bonifacio, Tamara Darsow, Robert H. Eckel, Leif Groop, Per-Henrik Groop, Yehuda Handelsman, Richard A. Insel, Chantal Mathieu, Allison T. McElvaine, Jerry P. Palmer, Alberto Pugliese, Desmond A. Schatz, Jay M. Sosenko, John P.H. Wilding, and Robert E. Ratner. Effect of Periodic Insulin therapy: An Updated Review. *Current Therapeutic Research.* 2019;90:61-67.
3. Holmes K, Roberts Thomas, Angharad M, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling.* 2007;19(10): 2003-12. [doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.013)
4. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie.* 2013;95(12):2271-85.
5. Paterson CC, et al. Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 years period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia.* 2019;62(3):408-17.
6. Pulungan AB, Annisa D, Imada S. Diabetes Melitus Tipe 1 pada Anak: Situasi di Indonesia dan Tata Laksana. *Sari Pediatri.* 2019;20(6):392-400.
7. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie.* 2013;95(12):2271-85.
8. Ahangar, P& Mills, S. J. Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. 2020
9. 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 Medica.* 2021;63(6):875-83.

10. Ribot J, Caliaperoumal G, Paquet J, Vidal CB, Petite H, Anagnostou F. Type 2 Diabetes Alters Mesenchymal Stem Cell Secretome Composition and Angiogenic Properties. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(2): 349-363.
11. Aftab N, Arshad H. Overexpression of PDX1 and NKX6.1 as a Treatment for Type 1 Diabetes: A Research Protocol. *UNRSCT Journal*. 2021;5(10):1-11.
12. Zhen-Chu Tang, Yi Chu, Yu-Yong Tan, Jing Li, Shan Gao. Pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma and diabetes mellitus. *Chinese Medical Journal*. 2020;133(3):344-350.
13. Gao T, McKenna B, Li C, Reichert M, Nguyen J, Singh T, et al. Pdx1 maintains beta cell identity and function by repressing an alpha cell program. *Cell Metab* 2014;19:259–271. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.002.
14. Waseem, M., Khan, I., Iqbal, H., Eijaz, S., Usman, S., Ahmed, N., ... Salim, A. Hypoxic Preconditioning Improves the Therapeutic Potential of Aging Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Streptozotocin-Induced Type-1 Diabetic Mice. *Cellular Reprogramming*. 2016; 18(5): 344–355. <https://doi.org/10.1089/cell.2016.0002>
15. C. Neidlinger-Wilke¹, A. Ekkerlein¹, R.M. Goncalves¹, J.R. Ferreira, A. Ignatius¹ H.J. Wilke and G.Q. Teixeira. Mesenchymal Stem Cell Secretome Decreases The Inflammatory Response In Annulus Fibrosus Organ Cultures. *European Cells and Materials*. 2012; 42:1-19. DOI: 10.22203/eCM.v042a01.
16. Khatri R, Mazurek S, Petry S, Linn T. Mesenchymal stem cells promote pancreatic β -cell regeneration through downregulation of FoxO1 pathway. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11:497. Doi: 10.1186/s13287-020-02007-9
17. Dias I, Pinheiro D, Silva KR, Stumbo AC, Thole A, Cortez E, de Carvalho L, Carvalho SN. Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin-induced type 1 diabetes. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2021;2. Doi: 10.1016/J.CRPHAR.2021.100069

18. Dettmer R, Cirksena K, Munchhoff J, Kresse J, Diekmann U, Niwolik I, Buettner FFR and Naujok O. FGF2 Inhibits Early Pancreatic Lineage Specification during Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cells*. 2020;9(1927). doi:10.3390/cells9091927www.mdpi.com/journal/cells
19. He Q, Song J, Cui C, Wang J, Hu H, Guo X, Yang M, Wang L, Yan F, Liang k, Liu Z, liu Fuqiang, Sun Z, Dong M, Hou X dan Chen L. Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a reverses diabetic β -cell dedifferentiation. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;12(449). Doi: 10.1186/s13287-021-02371-0
20. Xu L, Xu C, Zhou S, Liu X, Wang J, Liu X, Suping Q, Xin Y, Gao Y, Zhu Y, Tang X. PAX4 promotes PDX1-induces differentiation of mesenchymal stem cells into insuling-secreting cells. *AM J Transl R*. 2017;9(3):874-886.
21. Kristensen P, Høi-Hansen T, Boomsma F, Pedersen-Bjergaard U, Thorsteinsson B. Vascular endothelial growth factor during hypoglycemia in patients with type 1 diabetes mellitus: relation to cognitive function and renin-angiotensin system activity. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2009;58(10)
22. Holmes K, Roberts Thomas, Angharad M, Cross MJ. (2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition". *Cellular Signalling*. 2007;19(10): 2003-12. [doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.013)
23. Ali, Ibne; et al. (2013). "Expression and localization of locally produced growth factors regulating lymphangiogenesis during different stages of the estrous cycle in corpus luteum of buffalo" (*Bubalus bubalis*)". *Theriogenology*. 2013;81(3):426-436. [doi:10.1016/j.theriogenology.2013.10.017](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.017)
24. Tchaikovski V, Waltenberger J. Angiogenesis and arteriogenesis in diabetes mellitus: signal transduction defects as the molecular basis of vascular cell dysfunction. In: Deindl E, Kupatt C, eds. *Therapeutic Neovascularization: Quo Vadis* Munich, Germany: Springer; 2007: 33–74.

25. Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 322–328.
26. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 833–846.
27. Tchaikovski V, Waltenberger J, Olieslagers S, Bohmer FD. Diabetes Mellitus Activates Signal Transduction Pathways Resulting in Vascular Endothelial Growth Factor Resistance of Human Monocytes. *Circulation.* 2009;120(2):150-159.
28. Li S, Koya V, Li Y, Donelan W, Lin P, Reeves W, Yang L. Pancreatic duodenal homeobox 1 protein is a novel B-cell-specific autoantigen for type 1 diabetes. *Laboratory Investigation.* 2010;90(1): 31-39.
29. Fujimoto K, Polonsky KS. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11(4):30-37. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01121.x.
30. Zhen-Chu Tang, Yi Chu, Yu-Yong Tan, Jing Li, Shan Gao. Pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma and diabetes mellitus. *Chinnese Medical Journal.* 2020;133(3):344-350.
31. Mira M. Sachdevaa, Kathryn C. Claiborna, Cynthia Khooa, Juxiang Yanga, David N. Groffa, Raghavendra G. Mirmirab, and Doris A. Stoffers. Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cellsusceptibility to ER stress. *PNAS.* 2009;106(45). doi:10.1073/pnas.0904849106
32. Toren E, Burnette KS, Banerjee RR, Hunter CS and M. Tse H. Partners in Crime: Beta-cells and Autoimmune Responses Complicit in Type Diabetes Pathogenesis. *Frontiers in Immunology.* 2021; 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.756548>
33. Perkeni. (2019). *Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa Di Indonesia 2019.* Jakarta: PB Perkeni.
34. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, Groop PH, Handelsman Y, Insel RA, Mathieu C, McElvaine AT, Palmer JP, Pugliese A, Schatz DA, Sosenko JM, Wilding JPH and Ratne RE. Differentiation of

- Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. 2017;66:241-255. doi: 10.2337/db16-0806
35. Tridjaya B, Yati NP, Faizi M, Marzuki ANS, Moelyo AG, Soesanti F. Konsensus Nasional Pengelolaan DM tipe 1. BP IDAI. 2015
 36. Cho NH, Kirigia J, Mbanya JC, Ogurstova K, Guariguata L, Rathmann W, Roglic G, Forouhi N, Dajani R, Esteghamati A, Boyko E, Hambleton I, Neto, OLM, Montoya PA, Joshi S, Chan J, Shaw J, Samuels TA, Pavkov M, Reja A. Diabetes Atlas Eighth Ed. IDF. 2017
 37. Nor Faida A, Puspita Santik YD. Kejadian Diabetes Melitus Tipe I pada Usia 10-30 Tahun. *Higea*. 2020;4(1):33-42.
 38. Diabetes, D. O. F. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
 39. Diagnosis | ADA. (n.d.). Retrieved April 8, 2021, from <https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis>
 40. Egan AM. What is diabetes? Key points. 2018: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.002>
 41. Perin EC, Miller LW, Taylor DA, Willerson JT. Stem Cells and Therapy for Cardiovascular Disease. Elsevier. 2015. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00701-0>
 42. Li Z, Hu X, Zhong J. Mesenchymal stem cells: Characteristics, function, and application. Hindawi. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8106818>
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.

46. 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.
47. Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. Sultan Qaboos University Medical Journal. 2018; **18**(3), e264–e277.
<https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
48. Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*. 2016; **2**: 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
49. Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Martin, A., Contreras, L., Figueroa, F. E., & Khoury, M. Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; **6**(199)
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0192-0>
50. Bin Z, Ronne Wee Yeh Y, Kok Hian T, Sai Kiang L. Focus on Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*(2), 174; <https://doi.org/10.3390/ijms17020174>
51. Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*. 2018; **9**(12), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
52. Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; **18**(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
53. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. 2013; **12**(1): 60. Doi: [10.1186/2251-6581-12-60](https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60)

54. Graham ML, Janicek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Jan Schuurman H. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med.* 2011; 61(4): 356-60
55. Joseph, A., Baiju, I., Bhat, I. A., Pandey, S., Bharti, M., Verma, M., ... Taru Sharma, G. (2020). Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 235(7–8), 5555–5569. <https://doi.org/10.1002/jcp.29486>
56. Ishiuchi, N., Nakashima, A., Doi, S., Yoshida, K., Maeda, S., Kanai, R., ... Masaki, T. (2020). Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01642-6>
57. Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., OBrien, T., & Samali, A. (2011). Cytokine-Induced β -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. In *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. <https://doi.org/10.5772/22765>
58. Al-Azzawi, B., Mcguigan, D. H., Manderson Koivula, F. N., Elttayef, A., Dale, T. P., Yang, Y., ... Forsyth, N. R. (2020). The Open Stem Cell Journal The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. 6, 1–12. <https://doi.org/10.2174/1876893802006010001>
59. Saparov, A., Ogay, V., Nurgozhin, T., Jumabay, M., & Chen, W. C. W. (2016). Preconditioning of human mesenchymal stem cells to enhance their regulation of the immune response. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3924858>
60. Jiang, C. M., Liu, J., Zhao, J. Y., Xiao, L., An, S., Gou, Y. C., ... Wang, J. (2015). Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*, 94(1), 69–77. <https://doi.org/10.1177/0022034514557671>
61. 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.
62. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013; **64**: 384–396.
 63. 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.
 64. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
 65. Ormazabal V, Nova-Lampeti E, Rojas D, Zuniga FA, Escudero C, Lagos P, Moreno A, Pavez Y, Reyes C, Yanez M, Vidal N, Cabrera-vives G, Oporto K, Aguayo C. Secretome For Human Mesenchymal Stem Cells-Derived Endothelial Cells Promotes Wound Healing in Type-2 Diabetes Mouse Model. *International Journal of Molecular Science*. 2022;23(941):2-13. <https://doi.org/10.3390/ijms23020941>
 66. Pages G and Pouyssegur J. Transcriptional Regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene-a Concert of Activating Factors. *Cardiovascular Research*. 2005;65(3):564-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.032>
 67. Mahdipour E, Salmasi Z, Sabeti N. Potential of stem cell-derived exosomes to regenerate β islets through PDX-1 dependent mechanisme in a rat model of type 1 diabetes. *J cell Physiol*. 2019; 234:20310-20321.
 68. Robert, A.W., Marcon, B.H., Dallagiovanna, B. and Shigunov, P. Adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis of human mesenchymal stem/stromal cells: a comparative transcriptome approach. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:561.
 69. Caroti, C.M., Ahn, H., Salazar, H.F., Joseph, G., Sankar, S.B., Willett, N.J., Wood, L.B., Taylor, W.R. and Lyle, A.N. A Novel Technique for Accelerated Culture of Murine Mesenchymal Stem Cells that Allows for Sustained

- Multipotency. *Scientific Reports.* 2017; 7(1):1-14.
70. Ida Ayu Adhistania Pidada, Ni Luh Eka Setiasih, dan Ida Bagus Oka Winaya. Daun Kelor Memperbaiki Histopatologi Hati Tikus Putih Yang Mengalami Diabetes Melitus. *Buletin Veteriner Udayana.* 2018; 10(1): 50-56. eISSN: 2477-2712
71. Kiernan, J.A. On Chemical Reaction and Staining Mechanisms. *Dako Inc. Scientific Magazine.* 2010;40:127-136.
72. Dinullah, N.A., Salim, M.N., Hamdani. Pengaruh Ekstrak Daun Jamblang (*Syzygium cumini*) Terhadap Histopatologi Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptozotocin. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner.* 2017; 1(4). <https://doi.org/10.21157/jim%20vet..v1i4.4463>
73. Erwin, E., Etriwati, E., Muttaqien M., Pangestiningsih, T.W., Widyarini, S. Ekspresi Insulin Pada Pancreas Mencit (*Mus musculus*) Yang Diinduksi Dengan Streptozotocin Berulang. 2013; 7(1). <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.899>
74. Szebeni, A., Schloot, N., Kecskeméti, V., Hosszúfalusi, N., Pánczél, P., Prohászka, Z., Füst, G., Uray, K., Hudecz, F., Meierhoff, G. Th1 and Th2 Cell Responses of Type 1 Diabetes Patients and Healthy Controls to Human Heat-Shock Protein 60 Peptides AA437-460 and AA394-408. 2005; 54: 415-419.
75. Rahayu, Ika. Hubungan Antara Polimorfisme Gen VEGF Dengan Perkembangan Ulkus Diabetika. *Jurnal Kedokteran Meditek.* 2018; 24(66). <https://doi.org/10.36452/jkdoktmeditek.v24i66.1642>
76. Bao, P., Kodra, A., Tomic-canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., Brem, H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg.* 2010; 153(2):347-358. Doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023
77. Lin, P., Ferrara, N. Vascular Heterogeneity: VEGF Receptors Make Blood Vessels Special. *J Exp Med.* 2022; 219(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20212539>
78. Bauer, S.M., Bauer, R.J., Velazquez, O.C. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. *Sage Journal.* 2005; 39(4). <https://doi.org/10.1177/153857440503900401>

79. Engelmann, D., Mayoli-Nüssle, D., Mayrhofer, C., Fürst, K., Alla, V., Stoll, A., Spitschak, A., Abshagen, K., Vollmar, B., Ran, S., Pützer, B.M. E2F1 Promotes Angiogenesis Through The VEGF-C/VEGFR-3 Axis in A Feedback Loop For Cooperative Induction of PDGF-B. *Journal of Molecular Cell Biology.* 2013; 5(6):391-403. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt035>
80. Velnar, T., Bailey, T., Smrkol, V. The Wound Healing Process: An Overview of The Cellularand Molecular Mechanisms. 2009; 37(5):1528-1542.
81. Rezaie, J., Heizarzadeh, M., Hassanpour, M., Amini, H., Shokrollahi, M., Ahmadi, M., Rahbarghazi, M. The Angiogenic Paracrin Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Itechopen.* 2017. DOI: 10.5772/itechopen.84433
82. Kehl, D., Generali, M., Mallone, A., Heller, M., Uldry, A.C., Cheng, P., Getenbein, B., Hoerstrup, S.P., Weber, B. Proteomic Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells Secretomes: A Systematic Comparison Of The Angiogenic Potential. *NPJ Regenerative Medicine.* 2019; 4(8).
83. Lammert, A., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtough, L.C., Gerber, H.P., Ferrara, N., Melton, D.A. Role of VEGF-Ain Vascularization of Pancreatic Islets. 2003; 13(12):1070-1074. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00378-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00378-6)
84. Muhar, A.M., Delfitri, M., Putra, A., Syah Mirsyah, W. Pengaruh Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Hipoksia dan MSCs Conditioned Medium dengan Teknik Omental Patch Terhadap Derajat Adhesi Peritoneal. 2019. <http://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/23317>
85. Sidharta, V.M., Herningtyas, E.H., Lagonda, C.A., Fauza, D., Kusnadi, Y., Susuilowati, R., Partadiredja, G. High VEGF Level is Produced by Human Umbilicord-Mesenchymal Stem cells (hUC-MSCs) in Amino Acid-Rich Medium and Under Hypoxia Condition. *The Indonesian Biomedic Journal.* 2018; 10(3). <https://doi.org/10.18585/inabj.v10i3.457>
86. Ghasemi A., Khalifi S., Jedy S. Streptozotozin-nicotinamide Induced Rat Model of Type 2 Diabetes. 2014;101(4):408-20. DOI:[10.1556/APhysiol.101.2014.4.2](https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2)

87. Watada, Hirotaka. Role of VEGF-A in Pancreatic Beta Cells. Endocrine Journal. 2010;57(3):185-191. [10.1507/endocrj.k09e-035](https://doi.org/10.1507/endocrj.k09e-035)
88. Cunningham, CJ., Redondo-Castro, E., Allan, SM. The Therapeutic Potential of The Mesenchymal Stem Cell Secretome in Ischaemic Stroke. Journal Cerebral Blood Flow&Metabolism. 2018;38(8).
<https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>