

**PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME*
MESENCHYMAL STEM CELL HIPOKSIA TERHADAP
EKSPRESI CD38, p16, p21 DAN SIRT1
DI JARINGAN OTAK
(Studi *In Vivo* Pada Tikus Galur Wistar Model DM Tipe 1)**

**Tesis
Sebagai Bagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

**Bhirau Wilaksono
MBK.20.16.010194**

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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELL* HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI CD38, p16, p21 DAN SIRT1 DI JARINGAN OTAK
(Studi *In Vivo* Pada Tikus Galur Wistar Model DM Tipe 1)

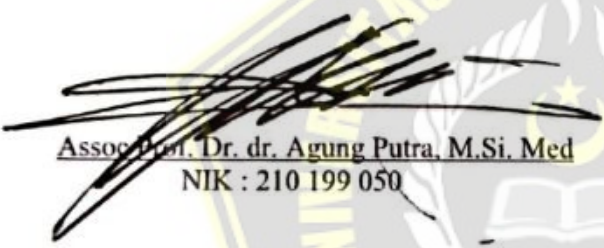
Disusun oleh :

Bhirau Wilaksono
MBK.20.16.010194

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II

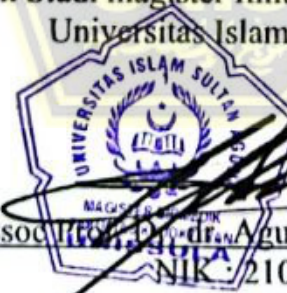


Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK : 210 199 050



Dr. dr. Chocidjah, M.Kes
NIK: 210 186 023

Mengetahui,
Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik Fakultas kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung



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

PERNYATAAN

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

Samarang, 23 Agustus 2022

(Bhira Wilaksono)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

1. Nama : Bhirau Wilaksono
2. Tempat, tanggal lahir : Bone-Bone, 29 November 1987
3. Agama : Islam
4. Jenis Kelamin : Laki-Laki

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Dharmawanita : Lulus tahun 1994
2. SDN 178 Bone-Bone : Lulus tahun 1999
3. SLTP Datok Sulaiman : Lulus tahun 2002
4. SMAN 1 Sukamaju : Lulus tahun 2005
5. FK UMI Makassar : Lulus tahun 2015
6. Magister Biomedik : 2020 - sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Ayah : Budiono Rubingun
2. Ibu : Titik Srimulyati
3. Istri : Yuni Ferawati Syachrir, S.si

KATA PENGANTAR

Assalamu alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis mampu menyelesaikan proposal tesis ini dengan judul “**Pengaruh Pemberian *Secretome Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia Terhadap Ekspresi CD38, p16, p21 Dan SIRT1 Di Jaringan Otak** (Studi In Vivo Pada Tikus Galur Wistar Model DM Tipe 1)”. Penyusunan proposal tesis ini sebagai salah satu syarat kelulusan dalam jenjang pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Proposal tesis ini dapat tersusun dan terselesaikan karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, S.H., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para Wakil Rektor yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med dan Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku pembimbing I dan II yang selalu sabar meluangkan waktu untuk membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.

5. dr. Mas Rizky A.A. Syamsuarno, M.Kes, Ph.D; Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK (K); Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen penguji I, II, dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini menjadi lebih baik.
6. Seluruh staf dan dosen pada program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat bagi kami.
7. Kepada kedua orang tua saya Budiono R dan Titik Srimulyati yang senantiasa mendukung dan mendoakan perjuangan saya dalam menggapai cita-cita.
8. Kepada istri tercinta Yuni Ferawati Syachrir S.Si yang senantiasa sabar mendukung serta mendoakan.
9. Segenap staf Stem cell & Cancer Research (SCCR) yang telah menjadi keluarga saya selama satu tahun terakhir.
10. Teman-teman program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan Proposal ini, terimakasih atas dukungannya. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan proposal penelitian ini.

Semarang, 23 Agustus 2022


(Bhirau Wilaksono)

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELL* HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI CD38, p16, p21 DAN SIRT1 DI JARINGAN OTAK TIKUS MODEL DM TIPE 1

Latar Belakang: Diabetes adalah penyakit metabolik kompleks yang menyebabkan gangguan neurodegeneratif ditandai dengan meningkatnya *senescence* sel di otak serta keterlibatan CD38 sebagai pendegradasi NAD⁺. *Secretome Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia (S-HMSCs) mengandung *soluble molecule* seperti sitokin anti-inflamasi yang dapat menekan faktor inflamasi akibat sekresi *senescence* sel. Namun, peran S-HMSCs terhadap kondisi neurodegeneratif hingga saat ini belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian S-HMSCs dalam bentuk injeksi terhadap ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1 pada otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ.

Metode: Penelitian eksperimental *post test control group*. Kelompok kontrol, sham, perlakuan S-HMSCs 500 µl (P1) dan S-HMSCs 1000 µl (P2). Injeksi S-HMSCs dilakukan pada hari 0, 7, 14, dan 21. Ekspresi CD38 dianalisis dengan IHC dan ekspresi p16, p21, serta SIRT1 menggunakan qRT-PCR. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan R Studio.

Hasil: Ekspresi CD38 mengalami penurunan bermakna pada perlakuan P1 rerata $12,7 \pm 2,65$ dan $8,4 \pm 1,01$ pada P2 dibanding kontrol $19,07 \pm 2,7$. Rasio ekspresi mRNA p16 mengalami penurunan pada P1 rerata $0,25 \pm 0,38$ dan $0,31 \pm 0,38$ pada P2 dibanding kontrol $1 \pm 0,01$. Rasio ekspresi mRNA p21 mengalami penurunan rerata $0,32 \pm 0,04$ pada P1 dan $0,05 \pm 0,03$ pada dosis pada P2 dibanding kontrol $1 \pm 0,01$. Rasio ekspresi mRNA SIRT1 mengalami peningkatan rerata $2,48 \pm 0,67$ pada P1 dibanding kontrol dengan rerata $1 \pm 0,01$.

Kesimpulan: Pemberian S-HMSCs berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan jumlah *senescence* sel dan CD38 di otak.

Kata Kunci: CD38, p16, p21, *secretome*, neurodegeneratif

ABSTRACT

THE EFFECT OF SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELL HIPOKSIA ON EXPRESSION OF CD38, P16, P21, AND SIRT1 IN THE BRAIN DM TYPE 1 RAT MODEL

Background: Diabetes is a complex metabolic disease that causes neurodegenerative disorders characterized by the aging of brain cells and the involvement of CD38 as an NAD⁺ degrader. Hypoxic Secretome Mesenchymal Stem Cells (S-HMSCs) contain soluble molecules such as anti-inflammatory cytokines that can suppress inflammatory factors due to cell senescence secretion. However, the role of S-HMSC in neuro-degenerative conditions is not yet clear. This study aims to determine the effect of giving S-HMSC in the form of injection on the expression of CD38, p16, p21, and SIRT1 in the brains of STZ-induced type 1 DM rats.

Methods: Experimental research post-test control group. The control group, sham, treated S-HMSCs 500 l (P1) and S-HMSCs 1000 l (P2). S-HMSCs were injected on days 0, 7, 14, and 21. CD38 expression was analyzed by IHC and p16, p21, and SIRT1 expressions using qRT-PCR. Data processing is done using R Studio.

Results: The expression of CD38 decreased significantly in the P1 treatment with an average of 12.7 ± 2.65 and 8.4 ± 1.01 in P2 compared to the control 19.07 ± 2.7 . The ratio of p16 mRNA expression decreased in P1 by an average of 0.25 ± 0.38 and 0.31 ± 0.38 at P2 compared to 0.01 ± 1 in control. The ratio of p21 mRNA expression decreased by an average of 0.32 to 0.04 at P1 and 0.05 to 0.03 at a dose at P2 compared to 0.01 ± 1 in control. The SIRT1 mRNA expression ratio increased by a mean of 2.48 to 0.67 in P1 compared to controls with a mean of 1 ± 0.01 .

Conclusion: The administration of S-HMSC has a significant effect on decreasing the number of aging cells and CD38 in the brain.

Keywords: CD38, p16, p21, secretome, neurodegenerative

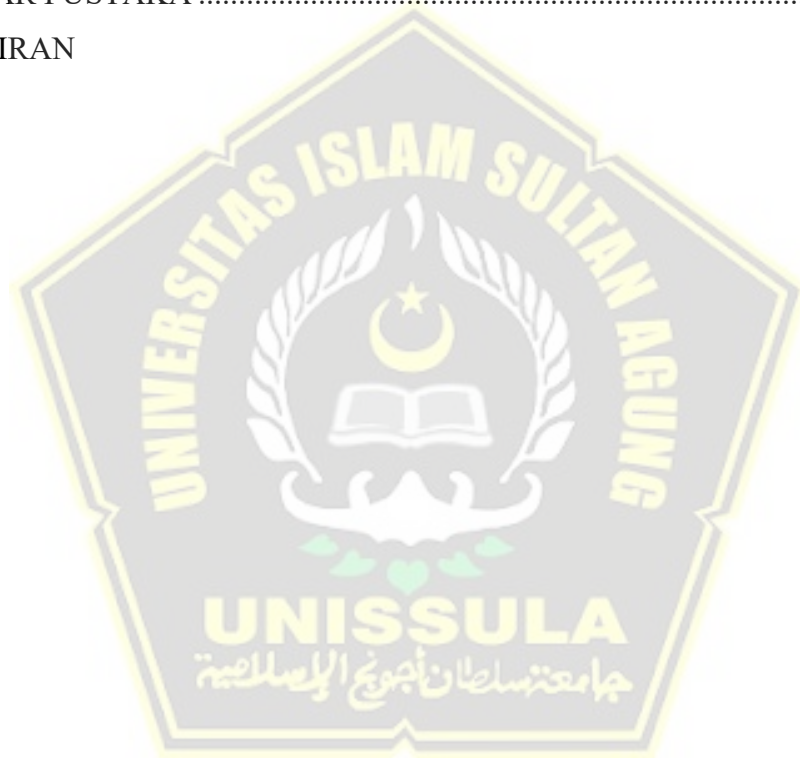
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
1.5. Originalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. CD38.....	9
2.1.1. Definisi	9
2.1.2. Kompleks Biologi CD38	9
2.1.3. Fungsi CD38.....	10
2.1.4. CD38 di Otak.....	13
2.2. Sel Senescence.....	13
2.2.1. Definisi	13
2.2.2. Jenis Sel Senescence.....	14

2.2.3. Senescence Sel dan Neurodegeneratif.....	22
2.3. SIRT1.....	24
2.3.1. Definisi	24
2.3.2. SIRT1 di Otak dan Neuron Survival	25
2.3.3. SIRT1 dan Otak	28
2.4. Diabetes	29
2.4.1. Definisi	29
2.4.2. Epidemiologi	29
2.4.3. Diabetes dan Neurodegeneratif	30
2.3. Mesenchymal Stem Cell (MSC).....	34
2.3.1. Definisi	35
2.3.2. Sumber MSC	35
2.3.3. Karakteristik MSC.....	35
2.3.4. Hipoksia.....	36
2.3.5. Secretome Stem Cell	37
2.4. Peran Secretome Mesenchymal Stem Cell Hipoksia (S-HMSCs) Terhadap Ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1 pada Jaringan Otak Tikus	37
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	40
3.1. Kerangka Teori	40
3.2. Kerangka Konsep.....	43
3.3. Hipotesis	43
BAB IV METODE PENELITIAN	44
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	44
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	45
4.2.1. Variabel Penelitian	45
4.2.1.1. Variabel Bebas	45
4.2.1.3. Variabel Terikat	45
4.2.2. Definisi Operasional.....	45
4.2.2.1. Secretome MSCs.....	45
4.2.2.2. Ekspresi CD38	45
4.2.2.3. Ekspresi p16.....	46

4.2.2.4. Ekspresi p21	46
4.2.2.5. Ekspresi SIRT1	46
4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	47
4.3.1. Subyek Penelitian	47
4.3.2. Sampel Penelitian	47
4.3.2.1. Kriteria Inklusi	47
4.3.2.2. Kriteria Eksklusi.....	47
4.3.2.3. Kriteria Drop Out	48
4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	48
4.3.4. Besar Sampel	48
4.4. Alat dan Bahan	48
4.4.1. Alat	48
4.4.2. Bahan	49
4.5. Cara Penelitian.....	50
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	50
4.5.2. Prosedur Isolasi Mesencymal Stem Cell dari Umbilical Cord... 50	
4.5.3. Pembacaan Marker dengan Flow Cytometry	51
4.5.4. Proses Hipoksia	53
4.5.5. Prekondisi Hewan Model	53
4.5.6. Pembuatan Model DM tipe 1.....	54
4.5.7. Validasi Hewan Model	55
4.5.8. Terminasi dan Pengambilan Jaringan.....	55
4.5.9. Pembacaan Ekspresi CD38 dengan IHC	55
4.5.10. Ekstraksi RNA dan Sintesis cDNA	57
4.5.10.1. Ekstraksi RNA	57
4.5.10.2. Kuantifikasi RNA.....	59
4.5.10.3. Sintesis cDNA.....	59
4.5.10.4. Analisis ekspresi gen dengan qRT-PCR	60
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	62
4.6.1. Tempat Penelitian	62
4.6.2. Waktu Penelitian.....	62

4.7. Analisa Data.....	62
4.8. Alur Penelitian.....	63
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	64
5.1. Hasil Penelitian.....	64
5.2. Pembahasan	76
5.3. Kelemahan Penelitian	81
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	82
6.1. Kesimpulan.....	82
6.2. Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	84
LAMPIRAN	



DAFTAR SINGKATAN

AD	: Alzheimer disease
ADPR	: Adenosine Diphosphate Ribose
AGEs	: Hyperglycemia-generated advanced glycation end products
ALS	: Amyotrophic Lateral Sclerosis
AP-1	: Activator Protein-1
APC	: Antigen-presenting Cell
BBB	: Blood Brain Barrier
BDNF	: Brain Derived Neurotrophic Factor
bFGF	: Basic Fibroblast Growth Factor
BRASSTO	: Brain-specific Sirt1-overexpressing
BSC	: Biosafety Cabinet
cADPR	: Cyclic ADP-ribose
CCF	: Chromatin Cytoplasmic Fragments
CD	: Cluster of Differentiation
CDKi	: Cyclin Dependent Kinase
CNS	: Central Nervous System
DM	: Diabetes Mellitus
DAMPs	: Damage Associated Molecule Patterns
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ER	: Endoplasmic Reticulum
FBS	: Fetal Bovine Serum
GDNF	: Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor
H-MSCs	: Hipoksia mesenchymal stem cells
HD	: Huntington Disease
HIF	: Hypoxic Induce Factor
IDE	: Insulin-Degrading Enzyme
IDF	: International Diabetes Federation
IGF-1	: Insulin-Growth Factor 1
MMP-9	: Matriks Metaloproteinase-9
PD	: Parkinson Disease
PBS	: Phospat Buffer Saline
NAD	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP	: Adenin Dinukleotida Fosfat
NAADP	: Nikotinat Adenin Dinukleotida phospat
NF- κ B	: Nuclear Kappa Beta
NGF	: Nerve Growth Factor
NMN	: Nicotinamide Mono-Nucleotide
NR	: Nucleotide Riboside
OIS	: Oncogen Induction Senescence
MCP1	: Monocyte Chemoattractant Protein 1
MSC	: Mesenchymal Stem Cells
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
MIDAS	: Mitochondrial dysfunction –associated Senescence
PECAM-1	: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

ROS	: Reaktif Oksigen Spies
SCN	: nukleus suprachiasmatic
SASP	: Senesence Associated Secretory Phenotype
SA-Bgal	: Senescence-Associated β -galactosidase
SIRT1	: Silent Information Regulator Tipe 1
STZ	: Streptozotocin
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor-Alpha
TERT	: Telomerase Reverse Transcriptase
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

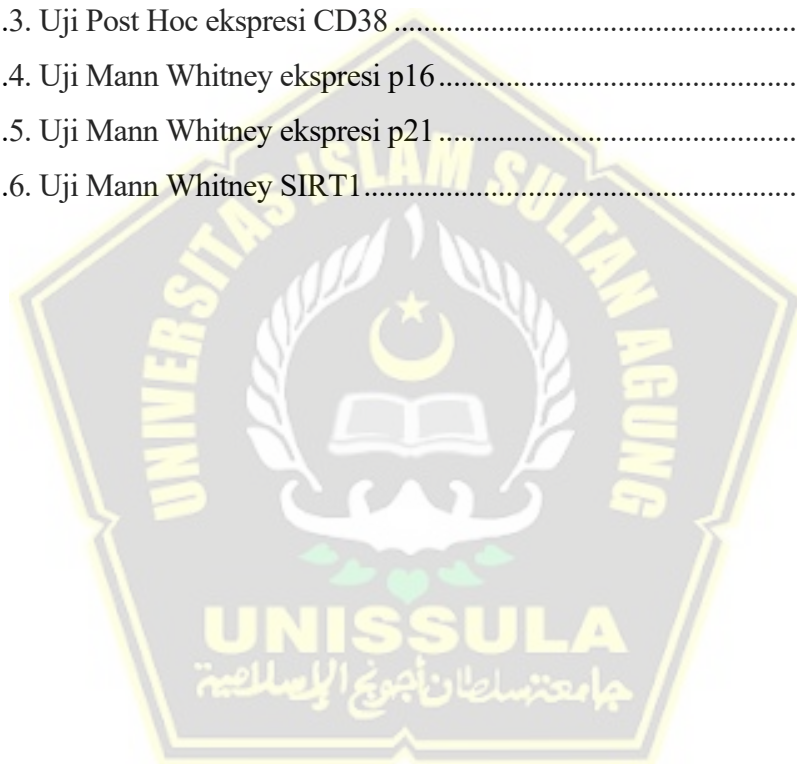


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Gambaran CD38 selama aging.....	10
Gambar 2.2. Morfologi Senescence sel.....	14
Gambar 2.3. Karakteristik Sel senescence	17
Gambar 2.4. Induksi SASP terhadap peningkatan CD38 Makrofag.....	21
Gambar 2.5. Penanda Senescence di central nervous system (CNS)	22
Gambar 2.6. Perbendaan Senescence sel pada normal aging dan penyakit neurodegenerative	23
Gambar 2.7. Senescence sel dalam memediasi neurodegenerasi.....	23
Gambar 2.8. Induksi SASP meningkatkan ekspresi CD38	24
Gambar 2.9. SIRT1 di Otak	25
Gambar 2.10. Peran SIRT1 pada perkembangan neuron.....	26
Gambar 2.11. SIRT1 dalam pembentukan sinaps.....	27
Gambar 2.12. Pathway neurodegenerasi pada kondisi DM	33
Gambar 2.13. Diabetes dan neurodegenerasi di otak.....	33
Gambar 2.14. Sumber MSC	35
Gambar 2.15. Diferensiasi MSC	36
Gambar 2.16. Hipoksia mengaktivasi MSC.....	36
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	42
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	43
Gambar 4.1. Rancangan penelitian	44
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	63
Gambar 5.1. Isolasi MSCs	65
Gambar 5.2. Analisis Flowcytometri	65
Gambar 5.3. Hasil Pemeriksaan IHC CD38.....	68
Gambar 5.4. Rasio Ekspresi CD38	69
Gambar 5.5. Rasio Ekspresi p16	71
Gambar 5.6. Rasio Ekspresi p21	73
Gambar 5.7. Rasio Ekspresi SIRT1	75

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas penelitian	6
Tabel 4.1. Sekuen primer untuk amplifikasi gen-gen target	50
Tabel 4.2. Analisis flowcytometri	52
Tabel 4.3. Komposisi reagen sintesis cDNA	60
Tabel 4.4. Komposisi reagen Mastermix qRT-PCR	61
Tabel 4.5. Kondisi siklus, suhu dan waktu mesin PCR untuk pengujian gen	61
Tabel 5.1. Analisis kandungan biomolekul S-HMSCs	66
Tabel 5.2. Data hasil penelitian ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1	67
Tabel 5.3. Uji Post Hoc ekspresi CD38	69
Tabel 5.4. Uji Mann Whitney ekspresi p16	71
Tabel 5.5. Uji Mann Whitney ekspresi p21	73
Tabel 5.6. Uji Mann Whitney SIRT1	75



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) adalah salah satu penyakit metabolik kompleks yang dapat menginisiasi terjadinya gangguan neurodegeneratif pada *central nervous system* (CNS)¹. Kondisi neurodegeneratif seperti demensia, alzheimer, parkinsonisme, atau penyakit saraf motorik dikarakterisasi oleh hilangnya populasi neuron yang bersifat progresif secara selektif seperti degenerasi frontotemporal, gangguan ekstrapiramidal, atau degenerasi spinocerebellar². Studi terkini menyebutkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi CD38 sebagai pendegradasi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD) agen neuroprotektif dalam sel-sel neuron, astrosit, serta sel mikro glial³.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa kondisi hiperglikemik dalam proses pergantian aliran dalam sawar darah-otak memungkinkan masuknya glukosa yang tinggi ke dalam sel-sel otak melalui transporter glukosa dan meningkatkan stres oksidatif melalui kelebihan produksi ROS yang berimplikasi terhadap hubungan antara stres oksidatif dan disfungsi mitokondria.⁴ Selanjutnya, mekanisme ini akan memicu timbulnya senescence sel yang ditandai oleh peningkatan ekspresi p21 dan p16 yang dapat menjadi salah satu kontributor utama dari kondisi neurodegeneratif^{4,5}. Sekreteri faktor yang dihasilkan oleh senescence sel yakni *senescence*

associated secretory phenotype (SASP) seperti IL-6, IL-8, dan MCP1 menginduksi peningkatan NADase CD38⁶. Selanjutnya, kondisi ini memicu efek downstream penurunan *silent information regulator* tipe 1 (SIRT1) sebagai komponen penting dalam memodulasi pertumbuhan dendrit, akson, plastisitas neuron, dan fungsi kognitif, serta perlindungan terhadap degenerasi saraf terkait penuaan seluler dan penurunan kognitif^{7,8,9}.

Prevalensi diabetes dan neurodegeneratif meningkat secara paralel. Saat ini, diabetes mempengaruhi hingga 10% dari negara maju sementara Alzheimer berkisar hingga 1,5% dari populasi¹⁰. Ekspektasi prevalensi DM sudah melebihi prediksi tahun 2030 dan 2050 sehingga diperkirakan pada tahun 2050 prevalensi alzheimer meningkat menjadi 3,3%. Selain itu, 40.000 pengukuran klinis tunggal dengan kuat mengkonfirmasi hubungan antara DM dan peningkatan risiko parkinson di kemudian hari¹¹. Ensefalopati diabetes juga mengalami peningkatan sebagai akibat dari peningkatan global diabetes tipe 1 terlebih pada pasien yang semakin muda dengan prevalensi mencapai 40% pada DM kronis atau yang tidak terkontrol^{12,13}. Hingga saat ini, pengobatan kondisi neurodegeneratif dengan beberapa regimen kimiawi seperti acetylcholinesterase inhibitor, memantine, anti ansietas, antipsikotik, hanya bersifat suportif serta belum tersedianya modalitas terapi untuk menyembuhkan kondisi ini¹⁴

Penelitian terkini membuktikan bahwa *Sekretome Mesenchymal Stem Cells* (MSC) mengandung soluble molecule bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi, mikrovesikel, serta exosome yang mampu

memperbaiki dan menginduksi regenerasi dan menurunkan inflamasi. Lebih lanjut, sekresi secretome dari MSC tikus mampu menyelamatkan sel dari apoptosis yang diinduksi oleh ekspresi protein tau dalam model sel untuk penyakit Alzheimer¹⁵. Secara khusus, kelangsungan hidup dan proliferasi sel tau sekretom sumsum tulang MSC juga menunjukkan kapasitas dalam kondisi neuroregeneratif¹⁶. Namun, peran secretome terhadap CD38, senescence sel dan SIRT1 hingga saat ini masih belum jelas.

Secretome MSC adalah istilah kolektif untuk faktor terlarut yang diproduksi oleh sel punca dan digunakan untuk komunikasi antar sel dan dikodekan oleh sekitar 10% dari genom manusia. Sekresinya mencakup beragam serum proteins, *growth factor*, *angiogenic factor*, *hormone*, *cytokine*, *extracellular matrix* protein, dan bahkan, sebagian lipid mediator dan material genetik^{15,17}. IL-10 sebagai salah satu soluble faktor yang disekresikan diduga mampu menghambat pembentukan ROS serta menekan SASP yang sekresikan oleh senescence sel¹⁸. Lebih lanjut, secretome juga mampu menghambat respon inflamasi dari sel mikroglia¹⁹. Sekretom merupakan bio molekul aktif sehingga tidak memiliki imunogenisitas, tidak menimbulkan efek samping, dan ukuran molekulnya yang kecil 5-300 kDa sehingga mudah untuk diabsorpsi menembus *blood brain barrier* (BBB)²⁰

Peningkatan ekspresi CD38 dan menurunnya SIRT1 berdasarkan mekanisme tersebut dapat diatasi dengan pemberian sekretom. Pada penelitian sebelumnya IL-10 dapat menghambat respon sitokin pro inflamasi²¹. Sementara *exosome* memiliki efek positif pada berbagai model

neurodegeneratif. Selain itu, *exosome* juga menurunkan sensitivitas dopaminergik terhadap stres oksidatif serta memodulasi lingkungan neurogenik^{17,22}. Lebih lanjut, neurotropik yang disekresikan oleh MSC juga dapat meningkatkan *neuronal survival* seperti *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)²³. Meskipun secara spesifik belum ada penelitian yang menyebutkan *secretome* dalam menekan CD38 dalam proses degeneratif tetapi MSC terbukti dapat menghambat ekspresinya²⁴. Oleh karena itu, kami menduga adanya potensi *secretome* MSC sebagai agen alternatif yang dapat digunakan untuk menghambat ekspresi CD38 akibat proses degeneratif akibat diabetes sehingga dalam penelitian ini akan diamati pengaruh sekretom MSC dalam mengontrol CD38, sel *senescence* melalui penanda p16 dan p21, serta SIRT1 pada otak tikus model yang diinduksi STZ secara *in vivo*. Data yang diperoleh pada penelitian ini akan diolah menggunakan R Studio sebagai salah satu bahasa pemrograman. Pengolahan data yang dikembangkan oleh Ross Ihaka dan Robert Gentleman pada tahun 1995 yang memungkinkan visualisasi data lebih baik.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah :
 ”Apakah terdapat pengaruh pemberian *secretome* H-MSCs terhadap ekspresi CD38, p16, p21 dan SIRT1 pada otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian *secretome* H-MSCs terhadap ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1 pada otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi CD38 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28 dibanding kontrol
2. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi p16 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28 dibanding kontrol
3. Untuk mengetahui pengaruh penurunan ekspresi p21 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28 dibanding kontrol
4. Untuk mengetahui pengaruh peningkatan ekspresi SIRT1 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28 dibanding kontrol

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian *secretome* H-MSCs dalam dunia kedokteran sebagai agen regeneratif dalam yang berpengaruh terhadap perbaikan kondisi otak akibat diabetes.

1.4.2. Manfaat praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran *secretome* H-MSCs dalam mengontrol kondisi regeneratif yang efektif. Selain itu penelitian ini dapat memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh sekretom terhadap kondisi regeneratif otak. Penelitian lebih lanjut dapat diaplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas penelitian (2004-2021)

Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Variabel penelitian	Hasil
K. Le Blanc, I. Rasmusson, C. Go"therstro"m, C. Seidelz, B. Sundberg, M. Sundin, K. Rosendahl, C. Tammik & O. Ringden (2004)	Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes	In Vitro, Eksperimental	Variabel bebas: MSC Variabel terikat: CD25, CD38	Mesenchymal stem cell menghambat ekspresi CD38
Yoshio Ogura, Munehiro Kitada, Jing Xu, Itaru Monno, Daisuke Koya (2020)	CD38 inhibition by apigenin ameliorates mitochondrial oxidative stress through restoration of the intracellular NAD ⁺ /NADH ratio and Sirt3 activity in renal tubular cells in diabetic rats	In Vivo, Eksperimental	Variabel bebas : Apigenin Variabel terikat : CD38, NAD ⁺ /NADH ratio, SIRT3	Apigenin menghambat ekspresi CD38 dan memperbaiki stress oksidatif mitokondria pada sel tubulus ginjal
Sung Hyun Son, Su Mi Lee, Mi Hwa Lee, Young Ki Son, Seong Eun Kim, Won Suk An (2021)	Omega-3 Fatty Acids Upregulate SIRT1/3, Activate PGC-1 α via Deacetylation, and Induce Nrf1 Production in 5/6 Nephrectomy Rat Model	In Vivo, Eksperimental	Variabel bebas : omega 3 FA Fariabel terikat : SIRT1/3, PGC-1 α , Nrf1,	Omega 3 Fatty acid meningkatkan biogenesis mitokondria. upregulasi Nrf1 dan Nrf2. peningkatan PGC-1 α dan deasetilasi PGC-1 α , yang dipicu oleh peningkatan SIRT1

G. Corbi ,V. Conti ,K. Komici , V. Manzo ,A. Filippelli ,M. Palazzo,F. Vizzari ,S. Davinelli ,A. Di Costanzo, G. Scapagnini,N. Ferrara ,and D. Casamassima (2018)	Phenolic Plant Extracts Induce Sirt1 Activity and Increase Antioxidant Levels in the Rabbit's Heart and Liver	In Vivo, Eksperimental	Variabel bebas : Phenolic Plant Extracts Variabel terikat: SIRT1 Antioksidan levels	Terdapat peningkatan aktifitas SIRT1 dan antioksidan level pada jantung dan hati kelinci yang diberi perlakuan
Vivi Yustianingsih, Titiek Sumarawati, Agung Putra, (2019)	HIPOKSIA enhances selfrenewal properties and markers of mesenchymal stem cells	In Vitro, Eksprimental	Variabel bebas: Hipoksia Variabel terikat: marker MSC	Hipoksia MSC meningkatkan proliferasi dan stemness MSC, serta sitokin lebih optimal

Penelitian Le Blanc *et al.*, 2004 menggunakan *mesenchymal stem cell* tanpa proses hipoksik menekan ekspresi CD25 dan CD38 pada limfosit yang diaktifkan dengan *phytohaemagglutinin*. Penelitian Yoshio Ogura *et al.*, mengungkapkan CD38 dapat tersupresi dengan pemberian *apigenin* serta memperbaiki stres oksidatif mitokondria melalui pemulihan rasio NAD⁺/NADH intraseluler pada sel tubulus ginjal tikus diabetes. Penelitian Sung Hyun Son *et al.*, mengungkap pemberian asam lemak omega-3 dapat meningkatkan SIRT1 dan mengaktifkan PGC-1 α melalui deasetilasi pada tikus dengan 5/6 nefrectomi. Penelitian G Corbi *et al.*, mengungkap pemberian ekstrak *phenolic plant* dapat menginduksi aktifitas SIRT1 serta level antioksidan pada hati dan jantung kelinci. Penelitian Yustianingsih *et al.*, 2019 mengungkapkan kondisi hipoksia MSCs meningkatkan produksi sitokin yang disekresikan MSCs. Penelitian ini berbeda dari penelitian lain karena menggunakan *secretome* hipoksik MSCs yang di filtrasi dengan

tangential flow filtration (TFF) sehingga diperoleh *sekretome* dengan ukuran dan kandungan tertentu, pada penelitian ini pemberian *secretome* diberikan melalui injeksi intraperitoneal dibandingkan pada kontrol dan sham dalam mengukur ekspresi CD38, p16, p21 serta SIRT1.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. CD38

2.1.1. Definisi

CD38 adalah *surface marker* yang pertama kali diidentifikasi oleh E. L. Reinherz dan S. F. Schlossman dalam sebuah tugas besar untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi penanda permukaan sel dengan antibodi monoklonal sebagai bagian dari riset pioneer pencarian molekul untuk imunofenotip sel T²⁵. Penanda ini diekspresikan pada awal diferensiasi *stem cell* CD34⁺ dan tetap dalam sel-sel imun yang matur termasuk sel T, sel B, granulosit, dan sel NK. Namun, seiring perkembangan riset, ekspresi CD38 tidak terbatas hanya pada sel imun tapi juga terekspresi pada berbagai jaringan seperti otak, mata, prostat, usus, pancreas, otot, tulang dan ginjal²⁶. Selain sebagai *surface marker* CD38 juga terlibat dengan begitu banyak kondisi fisiologis maupun patologis yang terjadi seperti pendegradasi utama *nikotinamide adenin dinukleotida* (NAD⁺) dalam jaringan mamalia.

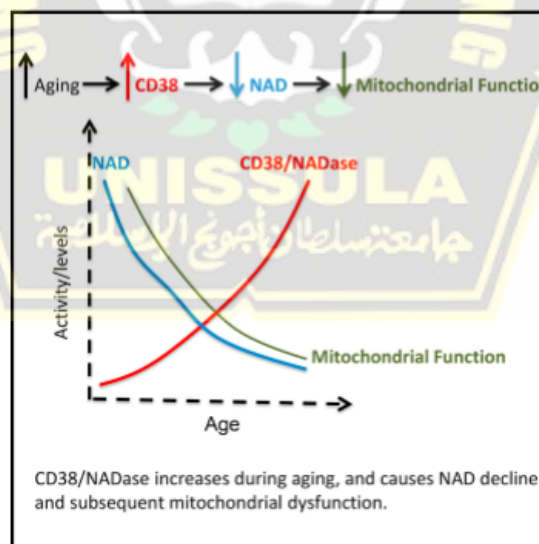
2.1.2. Kompleks Biologi CD38

CD38 adalah glikoprotein transmembran yang berukuran 45 kDa yang terdiri dari bagian ekor di sitoplasma, domain transmembran, dan domain ekstraseluler. CD38 memiliki reseptor dan fungsi yang diperantarai enzim. Data yang diperoleh menggambarkan bahwa kromosom 4 adalah letak promotor gen CD38 pada manusia yang kemudian diregulasi oleh faktor

seperti NF- κ B, R $\times$ R, L $\times$ R, dan STAT. Ekspresi CD38 diinduksi oleh berbagai faktor seperti endotoksin, interferon, dan beberapa *nuclear receptor*. Salah satu karakteristik unik dari enzim CD38 adalah lokalisasi selulernya yang sebagian besar memiliki orientasi membran tipe II, dengan situs katalitik menghadap ke luar sel. Dengan demikian, lebih dari 90% dari CD38 berfungsi sebagai ekto-NADase. Sisi lain, CD38 tidak hanya berfungsi untuk mendegradasi NAD, tetapi juga prekursor NAD yang bersirkulasi seperti nicotinamide mono-nucleotide (NMN) dan nucleotide riboside (NR)²⁵.

2.1.3. Fungsi CD38

Ekspresi CD38 meningkat seiring peningkatan usia kronologis, CD38 yang awalnya digambarkan sebagai reseptor yang diekspresikan oleh sel, terutama limfosit T, di mana CD38 juga mengatur adhesi sel dan terlibat dalam transduksi sinyal yang dimediasi oleh kompleks reseptor utama.



Gambar 2.1. CD38 selama proses aging

Lebih lanjut, CD38 juga memetabolisme NAD⁺ ekstraseluler, menghasilkan ADPR dan ADPR siklik. Ekto-enzim ini mengontrol homeostasis nukleotida ekstraseluler dan fluks kalsium intraseluler, CD38 relevan dalam berbagai kondisi fisiopatologis (infeksi, tumor, dan penuaan). Pada aplikasi klinis, CD38 digunakan sebagai penanda aktivasi sel dan dalam diagnosis/stadium leukemia²⁶.

Secara garis besar terdapat dua fungsi utama CD38 yang telah direview secara ekstensif yakni:

a) Aktivitas Enzimatik

CD38 memiliki aktivitas enzimatik yang kompleks. Salah satu fungsi utamanya yang diketahui adalah sebagai enzim NADase, yang menyebabkan hidrolisis NAD dan menciptakan produk sampingan ADPR dan nikotinamida. Selain itu, CD38 juga dapat mengkatalisis siklisasi NAD untuk menghasilkan cADPR melalui aktivitas ribosa siklase ADP-nya, meski fungsi ini adalah fungsi sekunder dari fungsinya sebagai NADase. Substrat lain yang diketahui dari CD38 adalah *nikotinamide adenin dinukleotida fosfat* (NADP), yang dapat dihidrolisis menjadi *asam nikotinat adenin dinukleotida fosfat* (NAADP) melalui reaksi pertukaran basa²⁷.

b) Aktivitas Ligan/Reseptor

Sebagai reseptor, CD38 berinteraksi dengan ligan CD31 yang dikenal sebagai *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), yakni glikoprotein transmembran tipe I yang berukuran 130 kDa³. Interaksi antara CD38 dan CD31 mirip dengan yang terlihat dengan selektin, menghasilkan

interaksi yang lemah dan dinamis antara sel imun dan sel endotel untuk mendorong perilaku migrasi sel imun²⁷.

2.1.4. CD38 di Otak

CD38 diekspresikan di otak pada seluruh spesies termasuk tikus dan manusia. Pada manusia, CD38 diekspresikan di hampir semua area otak, secara statistik ekspresinya terlihat lebih tinggi daripada rata-rata di caudate, pallidum, olfactory bulb, putamen, thalamus, dan cingulate anterior pada tingkat seluler. Pada tingkat subseluler, di dalam otak tikus, CD38 sebagian besar terletak di membran plasma dan intraseluler. Selama perkembangan kehidupan, CD38 diekspresikan di otak tikus antara hari ke 14 dan 28 pasca kelahiran, terutama di astrosit, di mana ia mengatur perkembangannya secara otonom dan mendorong diferensiasi oligodendrosit secara non otonom. CD38 juga termasuk regulator utama intraseluler NAD level di otak. Lebih lanjut, Melalui aktivitas siklusnya, CD38 juga menghasilkan cADPR, suatu penggerak kalsium universal yang terlibat dalam pelepasan neurotransmitter oleh neuron dan astrosit di otak³.

Peran yang dimainkan oleh CD38 dalam neurodegenerasi dan peradangan saraf diawali dengan peningkatan jumlah sel *senescence* di otak, sebagian besar oleh *senescence* astrosit yang merilis SASP ditandai dengan pelepasan sitokin dan kemokin pro-inflamasi. Faktor pro-inflamasi ini meningkatkan ekspresi CD38 dalam astrosit lain dan sel mikroglia, yang mengarah ke pelepasan sitokin pro-inflamasi dan peradangan saraf yang diperkuat serta penurunan NAD akibat peningkatan aktivitas enzimatik CD38

yang menyebabkan penurunan aktivitas SIRT yang bergantung pada NAD. Hal ini berimplikasi pada akumulasi kerusakan DNA serta disfungsi metabolik serta stres oksidatif, yang menyebabkan kerusakan saraf dan kematian sel³.

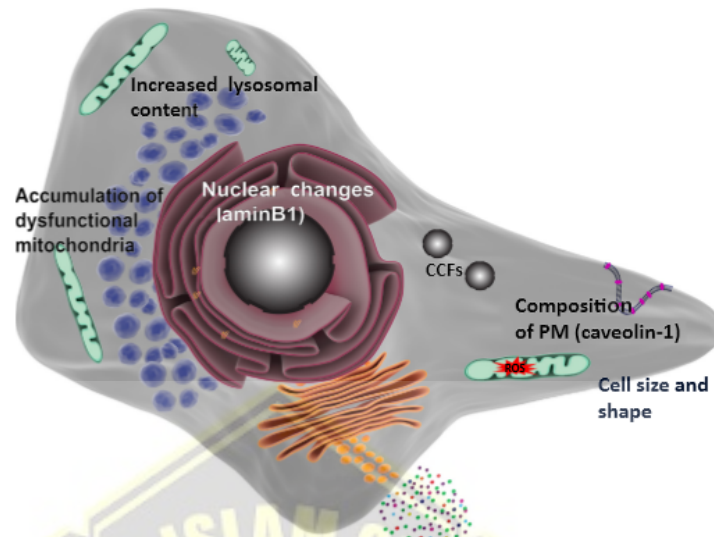
2.2. Sel *Senescence*

2.2.1. Definisi

Sel *senescence* merupakan suatu tahapan pada siklus sel yang tidak lagi mengalami pertumbuhan namun tidak melakukan program kematian sel. Keadaan ini bersifat permanen atas penghentian siklus sel yang terjadi pada sel dengan stressor yang berbeda. Keadaan *senescence* ini disertai dengan kegagalan untuk memasuki kembali siklus sel sebagai respons terhadap rangsangan mitogenik, fenotip sekretori yang tinggi dan resistensi terhadap kematian sel. Hal ini bisa terjadi di beberapa jaringan selama proses fisiologis dan patologis yang berbeda seperti remodeling jaringan, cedera, kanker, dan penuaan²⁸. Keadaan ini ditandai dengan peningkatan ekspresi tumor supresor p21 CIP1/WAF1 (dikodekan oleh Cdkn1a) dan p16INK4A (dikodekan oleh Cdkn2a)²⁹.

Fenotipe sel *senescence* sering ditandai dengan aktivasi respons dari kerusakan DNA secara kronis, keterlibatan berbagai inhibitor *cyclin-dependent kinase* (CDKi), peningkatan sekresi faktor pro-inflamasi dan remodeling jaringan, induksi gen antiapoptosis, perubahan tingkat metabolisme, dan stres pada retikulum endoplasma (ER). Konsekuensi dari jalur pensinyalan sel-sel penuaan ini menunjukkan penyimpangan struktural,

dari morfologi yang membesar dan lebih rata, komposisi membran plasma (PM) yang berubah, akumulasi lisosom dan mitokondria, dan perubahan inti³⁰.



Gambar 2.2. *Morfologi Senescence sel*

Morfologi tampak membesar dengan bentuk yg tidak beraturan, integritas inti terganggu karena hilangnya lamin B1, yang juga menyebabkan munculnya fragmen kromatin sitoplasma (CCF); kandungan lisosom meningkat, yang seringkali terdeteksi sebagai aktivitas b-galaktosidase tinggi; mitokondria besar tetapi disfungsional yang menghasilkan *reaktive oxygen species* (ROS); dan membrane plasma yang berubah seperti peningkatan caveolin-1³⁰.

2.2.2. Jenis Sel *Senescence*

Sel *senescence* bisa diinduksi oleh berbagai rangsangan yang berbeda, diantaranya adalah:

a) Sel *Senescence* yang diinduksi kerusakan DNA

Kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki dapat menyebabkan *Sel Senescence* atau apoptosis, tergantung pada besarnya kerusakan. Secara *in vitro*, beberapa agen perusak DNA digunakan untuk menginduksi jenis penuaan ini, termasuk radiasi atau obat-obatan.

b) Sel *Senescence* yang diinduksi onkogen (OIS)

Aktivasi onkogen, seperti Ras atau BRAF, atau inaktivasi *tumor suppressors*, seperti PTEN dapat menyebabkan OIS. *Senescence* yang diinduksi onkogen ini adalah respons anti-proliferatif yang kuat dan berkelanjutan yang disebabkan oleh pensinyalan onkogenik yang dihasilkan dari mutasi pengaktifan onkogen, atau inaktivasi gen penekan tumor. Jalur yang memediasi OIS sangat kompleks dan belum sepenuhnya dijelaskan, tetapi penghentian proliferasi melibatkan aktivasi jalur RB dan p53³¹.

c) Sel *Senescence* yang diinduksi reaktif oksigen spesies (ROS)

Produk pengoksidasi dari metabolisme sel atau agen oksidatif yang ada seperti H₂O₂, dapat menyebabkan *Sel Senescence*, meskipun agen pengoksidasi mengarahkan efeknya sebagian melalui kerusakan DNA, komponen dan proses seluler lainnya juga terpengaruh. Peningkatan level ROS telah terbukti berpotensi penting dalam menginduksi penuaan sel. ROS berkontribusi pada onset dan progresi penuaan seluler dengan merusak mtDNA secara langsung atau bersinergi dengan modifikasi enzim

telomerase reverse transcriptase (TERT) dan aktivitas jalur p53 dan Ras³². Selain itu, produksi ROS dengan pensinyalan serial melalui GADD45-MAPK14 (p38MAPK)-GRB2-TGFBR2-TGFb diperlukan dan cukup untuk stabilitas penghentian pertumbuhan, selama pembentukan senescence³³.

d) Sel *Senescence* yang diinduksi kemoterapi

Berbagai obat-obatan anti kanker dapat menginduksi Sel *Senescence* beberapa dapat menginduksi DNA damage seperti *bleomycin* dan *doxorubicin*, dan beberapa lainnya beraksi melalui mekanisme yang berbeda seperti menghambat CDKs seperti *abemaciclib* dan *palbociclib*. *Senescence* juga diaktifkan sebagai respons terhadap kemoterapi untuk mencegah penyebaran sel kanker. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa respons ini tidak selalu pasti dan bahwa populasi yang persisten dapat menggunakan *senescence* sebagai jalur adaptif untuk memulai kembali proliferasi dan menjadi lebih agresif³⁴.

e) *Mitochondrial dysfunction-associated Sel senescence* (MIDAS)

Disfungsi mitokondria bisa menyebabkan terjadinya Sel *Senescence* yang ditandai dengan adanya produksi *senescence-associated secretory phenotype* (SASP). Disfungsi mitokondria ini dapat menginduksi penuaan seluler dalam in vitro dan in vivo. Namun, sedikit yang diketahui tentang mekanisme yang memediasi efek ini. Beberapa penelitian mengimplikasikan ROS pada mitokondria sebagai

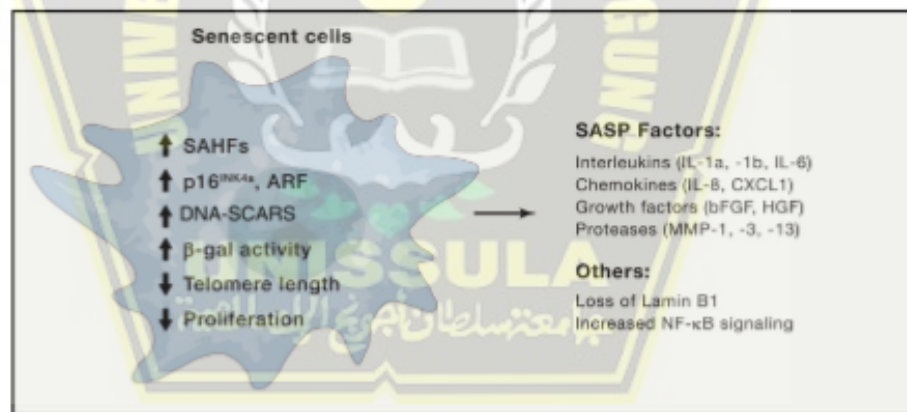
penyebabnya, tetapi juga lebih dimungkinkan karena disfungsi mitokondria³⁵.

f) Sel *Senescence* yang diinduksi epigenetic

Inhibitor DNA metylase seperti *5-aza-20-deoxycytidine* atau histon deasetilase seperti *suberoylanilide hydroxamic acid* dan *sodium butyrate* dapat menyebabkan terjadinya sel *senescence*.

g) *Parakrin Sel Senescence*

Sel *senescence* sekunder yang disebabkan oleh induksi SASP yang disekresikan oleh sel *senescence* primer, sebelumnya sel yang menjalani OIS (yang diinduksi onkogen) dapat mengirimkan SASP melalui mekanisme parakrin ke sel sekitar. Kondisi kompleks ini diatur oleh pensinyalan inflammasome dan IL-1^{30,36}.



Gambar 2.3. Karakteristik Sel *senescence*⁵⁴.

Secara garis besar, sel *senescence* memiliki dua sisi mata uang yang berbeda, satu sisi sel *senescence* memiliki efek positif, sisi lain ia juga memiliki efek negatif.

Efek positifnya antara lain :

a) Wound Healing

Sel *senescence* berkaitan dengan penyembuhan luka di kulit. Fibroblas direkrut ke tempat cedera dan berdiferensiasi menjadi miofibroblas. Pada akhir proses penyembuhan luka, protein matrikseluler CCN1 yang diekspresikan pada area injuri, berikatan dengan reseptornya, integrin $\alpha 6 \beta 1$, dan mengaktifkan produksi stres oksidatif di miofibroblas. Peningkatan stres oksidatif menyebabkan penuaan myofibroblast selama penyembuhan luka di kulit, yang melindungi terhadap perkembangan fibrosis yang berlebihan.

b) Liver Fibrosis

Fibrosis hati terjadi sebagai akibat dari akumulasi berlebihan protein matriks ekstraseluler, termasuk kolagen. Fibrosis hati yang berlanjut dapat menyebabkan sirosis dan gagal hati. Pada kondisi ini, sel stellata hepatic akan diaktifkan dan mulai memproduksi komponen matriks ekstraseluler untuk memperbaiki kerusakan. Sel-sel *stellata* kemudian menjadi sel *senescence* dan mengekskresikan SASP, termasuk MMPs, untuk memperbaiki jaringan parut fibrotik.

c) Cardiac Fibrosis

Sel *senescence* memiliki peran penting dalam regulasi fibrosis jantung setelah infark miokard (MI) pada model tikus. Fibroblas jantung

yang *senescence* terakumulasi dalam jantung yang mengalami infark 1 minggu setelah MI pada tikus. Di sisi lain, deposisi kolagen meningkat setelah MI. Hasil ini menunjukkan bahwa penuaan seluler yang dimediasi oleh p53 penting untuk membatasi deposisi kolagen jantung dan fibrosis jantung.

d) Senescence yang diprogram saat perkembangan

Temuan menarik pada riset terbaru mengungkap bahwa sel *senescence* juga terjadi selama perkembangan, dan sel *senescence* kemungkinan terlibat dalam mempromosikan remodeling jaringan selama masa perkembangan²⁸.

Efek negatif sel *senescence* :

a) Tumor promotion

Meskipun sel *senescence* terlibat dalam menekan transformasi malignansi, tetapi faktor-faktor yang disekresikan oleh SASP seperti sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8, MCP2, dan lainnya), protease (MMPs dan lainnya), dan *growth factor* (VEGF dan lainnya) dapat memfasilitasi perkembangan dan mempercepat metastasis sel tumor dengan mempengaruhi lingkungan mikronya.

b) Penyakit Degeneratif

Beberapa penyakit lain yang berhubungan dengan sel *senescence* seperti sarcopenia, osteoarthritis, dan fibrosis paru. Penuaan astrosit juga telah terlibat dalam patogenesis penyakit alzheimer dan penyakit

parkinson. Hingga saat ini laporan dari sel *senescence* yang terkait dengan berbagai penyakit manusia telah meningkat²⁸.

Berbagai penelitian hingga saat ini mengungkap bahwa sel *senescence* terlibat dalam banyak penyakit degeneratif terkait usia baik dalam situasi normal maupun patologis. sel *senescence* mempengaruhi struktur jaringan normal dan integritas jaringan melalui perilsan SASP²⁸.

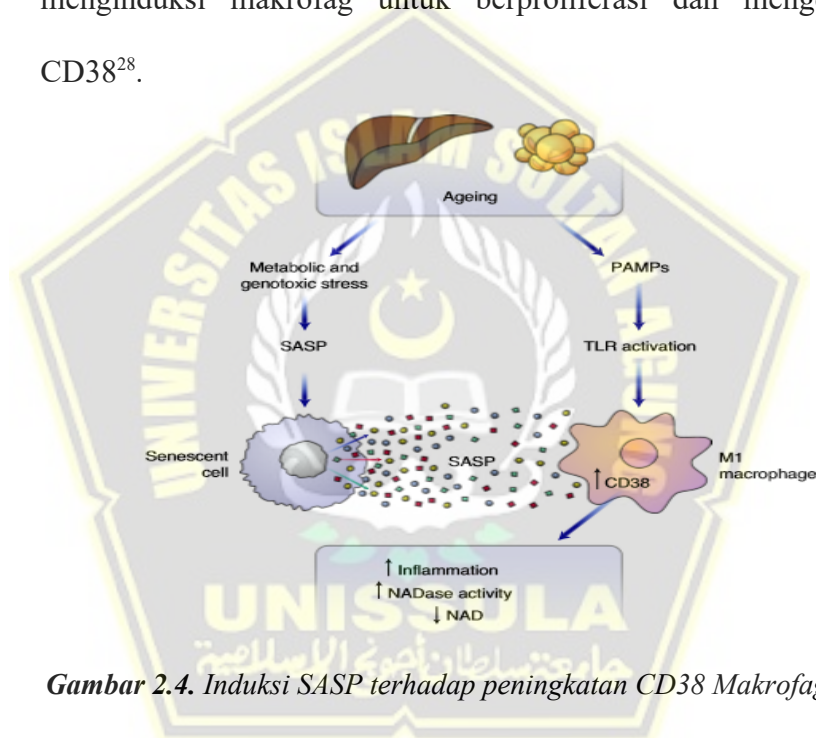
c) Adipocyte senescence, Obesity, and Diabetes

Banyaknya sel *senescence* jaringan adiposa tidak hanya meningkat seiring penuaan tetapi juga pada kondisi obesitas, terutama obesitas hipertrofik. Sejalan dengan ini, ukuran sel adiposa dalam jaringan adiposa subkutan pada individu non-diabetes berhubungan positif dengan penanda penuaan seluler. Akumulasi lemak putih berlebih dalam adiposit memicu respons inflamasi pada jaringan adiposa dan menginisiasi proses patologis sistemik. Adipokin yang senestinya tidak diinginkan seperti TNF- α diproduksi oleh respon inflamasi ini dan menyebabkan resistensi insulin dan diabetes³⁷.

Sel *senescence* progenitor adiposa adalah regulator negatif utama adipogenesis, baik melalui mekanisme sel-otonom atau dengan mempengaruhi sel-sel lain melalui perilsan SASP. Setelah terbentuk, Sel *senescence* dapat mempengaruhi fungsi sel-sel progenitor jaringan adiposa sekitar, menghambat adipogenesis. Selain itu, sel-sel tua dapat secara langsung menyebabkan resistensi insulin melalui sekresi faktor

SASP seperti aktivin A, IL-6 dan TNF- α . Sel-sel tua juga berkontribusi pada kemo-atraksi makrofag ke jaringan adiposa visceral pada obesitas³⁷.

Sel senescence dengan SA-b-gal positif terakumulasi dalam jaringan adiposa ini disertai dengan akumulasi p53 dan p21, peningkatan regulasi faktor SASP, dan infiltrasi inflamasi. Sel senescence secara progresif terakumulasi dalam jaringan adiposa putih visceral dan hati selama proses penuaan, selain itu sitokin inflamasi yang disekresikan (SASP) menginduksi makrofag untuk berproliferasi dan mengekspresikan CD38²⁸.

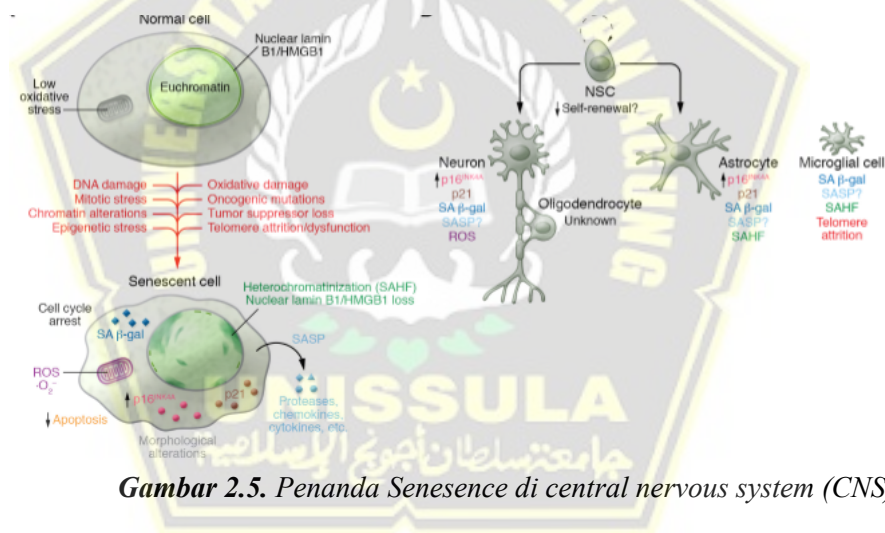


Gambar 2.4. Induksi SASP terhadap peningkatan CD38 Makrofag

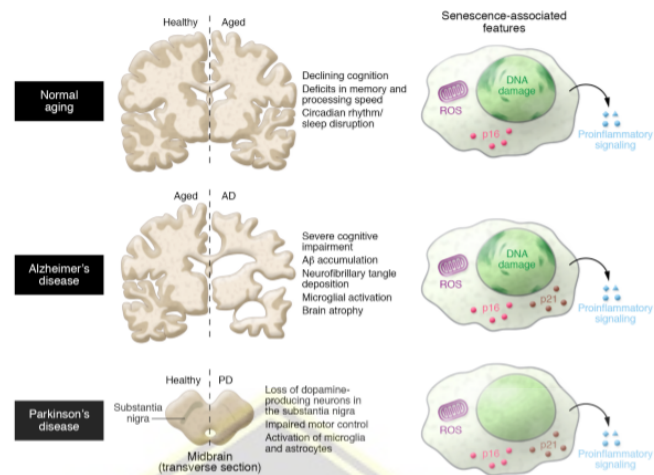
Penuaan dan akumulasi lemak yang meningkatkan akumulasi sel *senescence* akan menyebabkan meningkatnya ekspresi CD38 pada Makrofag tipe 1 yang berimplikasi tingginya inflamasi dan aktifitas NADase serta menurunnya koenzim NAD⁺ melalui SASP. SASP yang dirilis oleh sel *senescence* diperlukan dan cukup untuk meningkatkan ekspresi CD38 dalam makrofag dan mendorong proliferasi makrofag³⁸.

2.2.3. Sel Senescence dan Neurodegeneratif

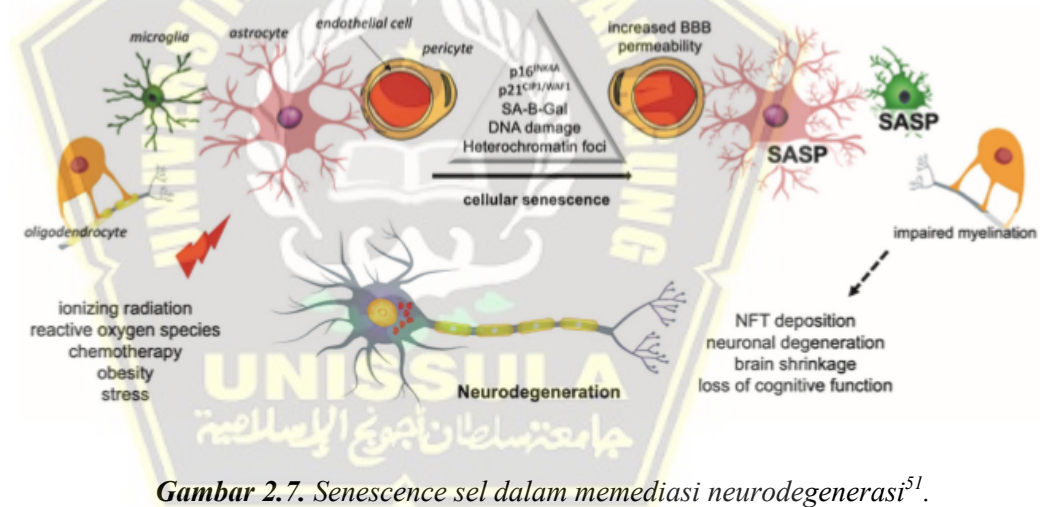
Kondisi neurodegenerasi baik yang terjadi secara alami seiring bertambahnya usia kronologis maupun neurodegenerasi yang dipicu oleh berbagai kondisi seperti diabetes berkaitan dengan induksi SASP oleh sel *senescence* sebagai sumber utama *sterile inflammation* yang meningkatkan aktivitas *senescence-associated β -galactosidase (SA-Bgal)*, kompleks SASP yang menginduksi kemokin pro-inflamasi, *damage associated molecule patterns (DAMPs)* dan sitokin³⁹.



Berbagai stressor baik yang bersifat intrinsik maupun ekstrinsik dapat menstimulasi peningkatan sel *senescence* di otak. Juga terhadap sel sel otak semisal astrosit dan mikroglia, yang menunjukkan bahwa mekanisme ini dapat berkontribusi pada gangguan interaksi glia-neuron melalui SASP dan pengembangan patologi otak⁴⁰.



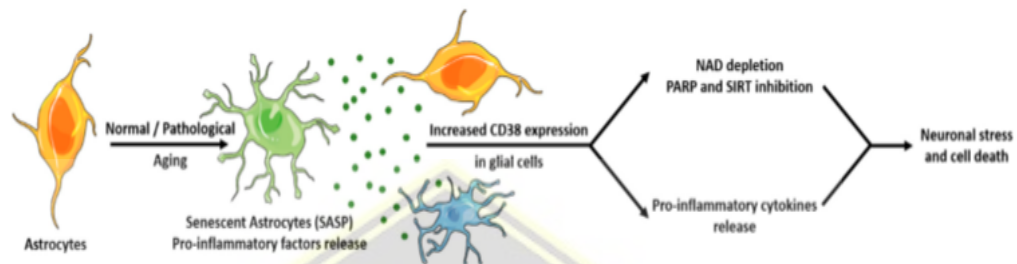
Gambar 2.6. Perbedaan sel senescence pada normal aging dan penyakit neurodegeneratif⁹.



Gambar 2.7. Senescence sel dalam memediasi neurodegenerasi⁵¹.

Penuaan seluler dapat diinduksi oleh beberapa rangsangan di sel-sel otak yang berbeda. Penuaan mikroglia dan astrosit menyebabkan peradangan dan hilangnya dukungan trofik. Penuaan oligodendrosit mengurangi mielin, yang mempengaruhi transmisi dan BBB dapat dikompromikan oleh penuaan sel endotel. Perubahan ini berdampak pada integritas dan kelangsungan hidup neuron dan akhirnya fungsi otak⁴¹. Lebih lanjut, akumulasi berlebihan SASP

yang dihasilkan oleh senescence sel akan menginduksi peningkatan ekspresi CD38 yang juga berimplikasi pada penurunan koenzym NAD^{+42} . Penghapusan CD38 sangat mengurangi peradangan saraf dan menunjukkan bahwa CD38 mungkin memainkan peran kunci dalam proses neurodegenerasi^{3,29}.



Gambar 2.8. Induksi SASP meningkatkan ekspresi CD38

2.3. SIRT1

2.3.1. Definisi

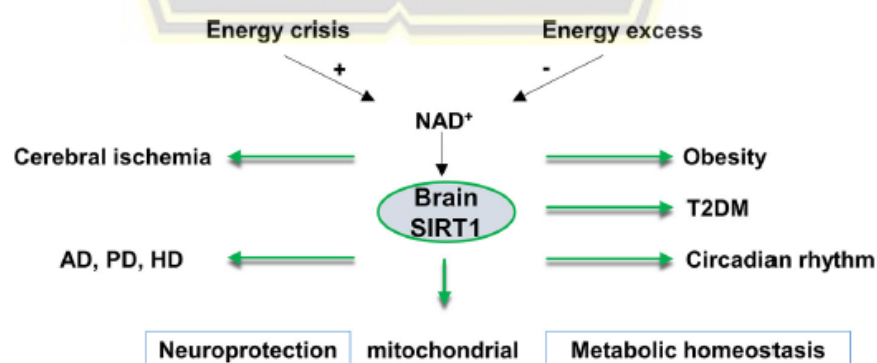
Protein *silent regulator 2* (Sir2), atau dikenal juga sebagai sirtuin adalah keluarga protein pensinyalan yang terlibat dalam regulasi metabolisme yang awalnya diidentifikasi sebagai *gene silencing* untuk mencegah ekspresi gen, tapi kemudian diketahui terlibat dalam banyak fungsi termasuk menambah usia pada sel ragi. Protein ini adalah keluarga deasetilase protein yang sangat terkonservasi dan bergantung pada NAD^{+} untuk aktivitasnya. Sejauh ini ada tujuh sirtuin (SIRT1-SIRT7) pada mamalia. Salah satu sirtuin yang memiliki banyak manfaat terkait dengan saraf adalah SIRT1 terkait perlindungan saraf dari peradangan.

Modulasi aktivitas sirtuin dapat mempengaruhi jalannya beberapa agregat dalam membentuk gangguan neurodegeneratif termasuk penyakit

alzheimer, penyakit parkinson, penyakit huntington, amiotrofik sklerosis lateral (ALS) dan atrofi otot spinal dan bulbar. Sirtuin dapat mempengaruhi perkembangan gangguan neurodegeneratif dengan memodulasi aktivitas faktor transkripsi dan secara langsung mendeasetilasi spesies proteotoksik sehingga terdapat potensi terapi untuk memodulasi aktivitas sirtuin pada gangguan ini⁹.

2.3.2. SIRT1 di Otak dan Neuron Survival

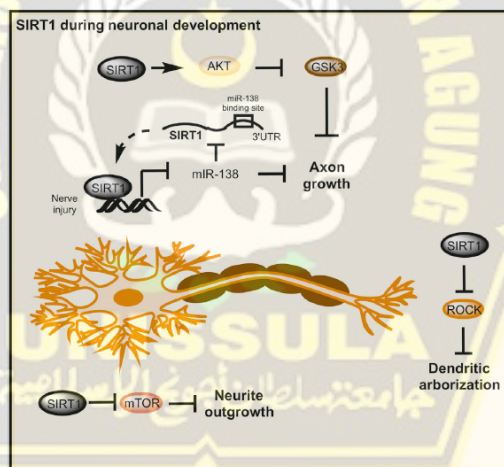
SIRT1 diekspresikan secara luas di otak orang dewasa. Sebagian besar terlokalisasi di inti saraf. Namun, SIRT1 juga ditemukan di sel glial otak, di sel punca saraf, mikroglia, dan astrosit, serta di hipotalamus sebagai pusat kendali homeostasis. SIRT1 mRNA diekspresikan dalam *arkuata*, *ventromedial*, *dorsomedial*, dan inti *paraventrikular hipotalamus*, yang menunjukkan peran penting SIRT1 di otak dalam mengatur status metabolisme. Fungsi lain dari SIRT1 otak adalah regulasi jam sirkadian di nukleus *suprachiasmatic* (SCN) dari hipotalamus. Selain itu fungsi fisiologis SIRT1 di hipotalamus adalah melakukan perlindungan saraf pada disfungsi neurologis⁴³.



Gambar 2.9. SIRT1 di Otak

SIRT1 otak bergantung pada jumlah NAD⁺ yang meningkat saat krisis energi dan menurun dengan beban energi yang tinggi. Fungsi yang tepat dari SIRT1 otak adalah pelindung terhadap obesitas, diabetes, disregulasi sirkadian. Selain itu, SIRT1 otak memberikan perlindungan saraf terhadap cedera iskemik dan gangguan neurodegeneratif, seperti penyakit Alzheimer (AD), penyakit Parkinson (PD), dan penyakit Huntington (HD).

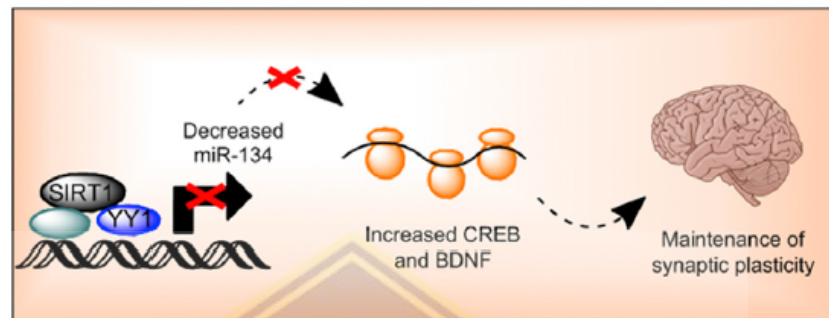
Ekspresi SIRT1 yang tinggi di otak embrio menunjukkan bahwa ia memiliki peran dalam perkembangan saraf dan otak. Gagasan ini sesuai dengan beberapa fenotipe yang terkait dengan tikus SIRT1-*knockout*, di mana kelangsungan hidup pasca kelahiran jarang terjadi sehingga memiliki cacat perkembangan seperti *ecencephaly*⁴⁴.



Gambar 2.10. Peran SIRT1 pada perkembangan neuron

SIRT1 dapat mendorong perkembangan akson dengan mendeasetilasi Akt dan menghambat Gsk3, mempengaruhi dinamika mikrotubulus selama perpanjangan akson. SIRT1 juga berinteraksi dengan *microRNA*-138 melalui loop umpan balik negatif dan *microRNA* ini menekan pertumbuhan akson.

SIRT1 juga memengaruhi arborisasi dendritik dengan penghambatan aktivitas ROCK kinase. SIRT1 sitoplasma dapat merangsang pertumbuhan neurit yang bergantung pada NGF karena penurunan regulasi mTOR dan penghambatan efektor hilirnya⁴⁵.



Gambar 2.11. SIRT1 dalam pembentukan sinaps

Di *hippocampus*, SIRT1 mempengaruhi plastisitas sinaptik melalui kompleks repressor yang mengandung faktor transkripsi YY1, yang mengatur *microRNA*-134 (miR-134). *MicroRNA* spesifik otak ini mengatur protein pengikat respons cAMP (CREB) dan ekspresi *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Protein ini penting untuk pembentukan sinaps dan potensiasi jangka panjang.

Selain itu SIRT1 di hipotalamus juga berperan dalam mengatur kondisi fisiologi dan perilaku dengan mengoordinasikan respons neuroendokrin yang mengatur nafsu makan, suhu, kontrol sirkadian, dan pelepasan hormon untuk mempertahankan homeostasis. Di bagian ventromedial nukleus hipotalamus, SIRT1 mengatur pengeluaran energi dan melindungi dari obesitas dalam kondisi diet tinggi lemak, selain itu, SIRT1 juga mengatur aktivitas dan suhu tubuh di dorsomedial dan hipotalamus

lateral. Di dalam inti arkuata, SIRT1 memodulasi nafsu makan dan kekebalan adaptif. Dalam nukleus *supraschiasmatic* hipotalamus, kadar SIRT1 menurun seiring dengan penuaan sehingga mempengaruhi pola aktivitas dan sirkadian⁴⁵.

2.3.3. SIRT1 dan Otak

Salah satu fenomena fisiologis di mana fungsi tubuh menurun seiring waktu yakni proses menua (longevity), demikian pula otak, hingga saat ini secara luas dipahami bahwa penuaan otak ditandai dengan adanya perubahan kognitif. Penuaan ini adalah faktor risiko utama untuk beberapa penyakit neurodegeneratif, seperti alzheimer (AD) dan parkinson (PD). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa proses inflamasi dan stres oksidatif berkontribusi pada gangguan kognitif pada manusia. Studi ekspresi gen menunjukkan perubahan ekspresi gen terkait usia pada otak manusia.

Gen downregulasi yang mencakup memori dan pembelajaran, pensinyalan kalsium, dan fungsi mitokondria yang menurun. Selain itu, inflamasi kronis juga terbukti terkait dengan penuaan dalam mekanisme peningkatan progresif kondisi pro-inflamasi atau “inflammageing”. Pada kondisi ini, SIRT1 memainkan peran penting dalam perkembangan penyakit neurodegeneratif, seperti AD dan PD. SIRT1 juga terlibat dalam penuaan dan umur melalui peningkatan *Brain-specific SIRT1-overexpressing* (BRASSTO) spesifik otak yang menjadi penanda peningkatan rentang hidup pada tikus⁴⁶.

2.4. Diabetes

2.4.1. Definisi

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolisme heterogen yang dikarakterisasi oleh hiperglikemia kronis yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin atau gangguan aksi insulin atau keduanya⁴⁷. Termasuk malfungsi metabolisme karbohidrat, protein, dan lipid⁴. Diabetes mellitus diklasifikasikan menjadi diabetes mellitus tipe 1 yang juga dikenal sebagai *insulin-dependent* yang ditandai dengan kurangnya produksi insulin dan diabetes mellitus tipe-2 yang dikenal sebagai diabetes *non-insulin-dependent* yang disebabkan oleh ketidakmampuan tubuh untuk menggunakan insulin secara efektif, serta diabetes gestasional yakni hiperglikemia yang ditemukan pertama kali pada masa kehamilan⁴⁸.

2.4.2. Epidemiologi

Sebagai bagian dari *heterogenous disorder* diabetes memiliki progresifitas mencapai proporsi epidemi secara global dengan perkiraan sekitar 347 juta orang penderita secara global pada tahun 2011 yang diproyeksikan akan meningkat menjadi 552 juta pada tahun 2030^{49,50}. Selain itu gangguan toleransi glukosa (IGT), kondisi yang mungkin menyebabkan diabetes juga diproyeksikan naik 7,1% pada tahun 2030⁵¹. Lebih lanjut, menurut *International Diabetic Federation* (IDF) pada tahun 2011, tidak kurang dari 366 juta orang menderita penyakit ini dan 80% di antaranya tinggal di negara dengan pendapatan rendah dan sedang⁴⁸.

2.4.3. Diabetes dan Neurodegeneratif

Salah satu komplikasi diabetes yakni gangguan mikrovaskuler jangka panjang seperti neuropati, nefropati, dan retinopati⁵⁰. Yang patut diberi perhatian salah satunya adalah penyakit degeneratif pada sistem saraf yang menimbulkan beban medis dan kesehatan masyarakat yang substansial pada populasi di seluruh dunia. Penyakit Alzheimer (AD), penyakit Parkinson (PD), dan *amyotrophic lateral sclerosis* (ALS) adalah tiga penyakit neurodegeneratif utama. Prevalensi dan insiden penyakit ini meningkat secara dramatis seiring bertambahnya usia, sehingga jumlah kasus diperkirakan akan meningkat di masa mendatang karena rentang hidup di banyak negara terus meningkat⁵².

Selain itu kondisi ini juga dapat menyebabkan perubahan progresif lambat di otak, seperti ensefalopati diabetik yang ditandai dengan perubahan kognitif dan perubahan struktural yang dapat diidentifikasi pada pencitraan otak^{10,53}. Gangguan neurodegeneratif, sebagai gangguan progresif pada fungsi otak yang secara umum mempengaruhi orang dewasa dan memburuk seiring bertambahnya usia. Hal ini dipicu oleh kerusakan neuron tertentu atau kerusakan saraf secara umum. Akibatnya, beberapa fungsi saraf yang sangat spesifik seperti penglihatan, pendengaran atau fungsi kognitif umum seperti yang diamati pada demensia terpengaruh⁵¹. Meski tampaknya kedua masalah ini terpisah, namun terdapat hubungan antara keduanya. Peran diabetes dalam perkembangan demensia dengan kondisi neurodegenerasi lain juga telah lama dieksplorasi oleh para ilmuwan. Hubungan keduanya memang tampak erat

sebagaimana kita ketahui bahwa meski hanya memiliki proporsi 2% dari total berat tubuh tetapi untuk menjalankan fungsinya ia membutuhkan 25% total konsumsi glukosa tubuh atau 5,6 mg glukosa per 100 g jaringan otak manusia per menit⁵⁴.

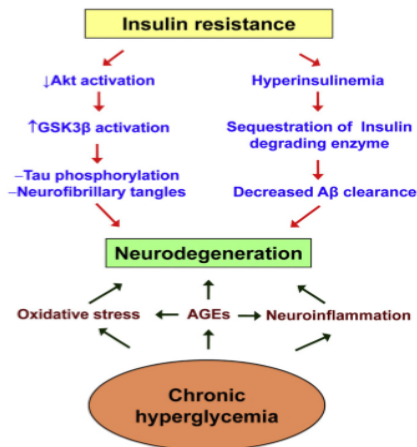
Meskipun tidak banyak bukti langsung yang menunjukkan hubungan antara diabetes dan neurodegenerasi, beberapa penelitian telah menunjukkan korelasi antara diabetes dan atrofi otak dan penurunan integritas saraf. Dalam penelitian Yi *et al* (2011) dengan menggunakan model tikus diabetes yang diinduksi *streptozotocin* (STZ), didapatkan ensefalopati dengan degenerasi saraf dan peradangan serta gangguan dalam komunikasi *gap junction*¹. Selain itu, penyakit neurodegeneratif juga mempengaruhi metabolisme glukosa di otak. Gangguan neurodegeneratif juga telah dieksplorasi lebih banyak terjadi pada penderita dengan kondisi diabetes dibandingkan dengan mereka yang tidak menderita diabetes⁵⁵. Penelitian lain menunjukkan bahwa mereka yang menderita diabetes memiliki prevalensi yang lebih tinggi dari gangguan kognitif dan penurunan kognitif yang lebih besar dibandingkan dengan individu normoglikemik^{56,57}.

Selain itu, terdapat defisit dalam kinerja memori dan kognisi yang berbasis hipokampus selain terjadinya pengurangan volume otak yang dimediasi oleh kondisi diabetes pada individu⁵⁸. Studi klinis menunjukkan penurunan fungsi neuropsikologis pada pasien diabetes penyakit alzheimer (AD) dengan tingkat metabolisme glukosa yang rendah dan kelainan sensitivitas insulin di otak yang mengarah ke lingkungan hiperglikemik yang

dapat menyebabkan kematian neuron. Resistensi insulin juga menurunkan metabolisme glukosa yang berimplikasi menyebabkan *hyperphosphorylates* TAU protein sehingga menyebabkan *neurofibrillary tangles* yakni penumpukan protein dalam neuron penderita AD⁵¹.

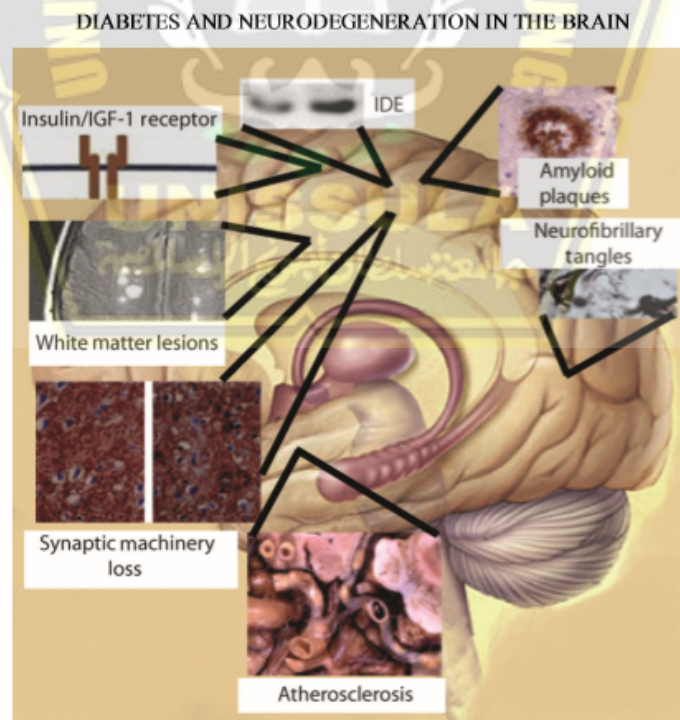
Dalam sebuah studi *post mortem* pada 216 pasien diabetes menunjukkan bahwa pasien dengan alel ApoE-ε4, yang merupakan faktor risiko genetik untuk AD, menunjukkan peningkatan plak neuritik hipokampus di korteks dan hipokampus serta risiko yang lebih tinggi dari angiopati amiloid serebral. Studi *post mortem* lain dengan sekitar 1000 pasien diabetes menunjukkan bahwa diabetes menyebabkan atrofi kortikal yang lebih besar⁵⁹. Lebih lanjut, pada penelitian Kamada *et al* (2007) dengan model hiperglikemik bermanifestasi dalam meningkatkan stres oksidatif dan aktivitas matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) yang mengakibatkan disfungsi sawar darah otak setelah cedera iskemia-reperfusi. Data ini menunjukkan bahwa dalam kondisi hiperglikemik ketika sawar darah otak terganggu, dapat menyebabkan sel-sel inflamasi dan cairan menembus otak yang menyebabkan edema dan kematian sel^{51,60}.

Degenerasi saraf pada penyakit Alzheimer disebabkan oleh pembentukan *neurofibrillary tangle* dan deposisi plak amiloid ekstraseluler. Kedua pathway tersebut difasilitasi oleh resistensi insulin sebagai penyebab utama diabetes tipe 2.



Gambar 2.12. Pathway neurodegenerasi pada kondisi DM³⁸.

Hyperglycemia-generated advanced glycation end products (AGEs), stres oksidatif dan peradangan saraf yang dihasilkan oleh hiperglikemia kronis juga merupakan penyebab penting dari kondisi neurodegenerasi sehingga memberikan hubungan penting antara diabetes dan neurodegenerasi⁶¹.



Gambar 2.13. Diabetes dan Neurodegenerasi di Otak³.

Gambaran skematis perubahan di otak dengan kondisi diabetes. Hilangnya insulin dan pensinyalan insulin termasuk reseptor *insulin-growth factor 1* (IGF-1) yang berkontribusi pada ensefalopati diabetik dan penyakit Alzheimer. Hilangnya insulysin juga dikenal sebagai *insulin-degrading enzyme* (IDE), Plak amiloid dan *neurofibrillary tangles*, Aterosklerosis yang berhubungan dengan diabetes dan faktor risiko vaskular lainnya yang berkontribusi terhadap adanya iskemia dan penyakit vaskular campuran. Hilangnya sinaptik ditunjukkan di otak murine dengan imunohistokimia untuk sinaptofisin, serta lesi materi putih yang diidentifikasi menggunakan pencitraan resonansi magnetik otak dari pasien dan diabetes bersama dengan leukopenia¹⁰.

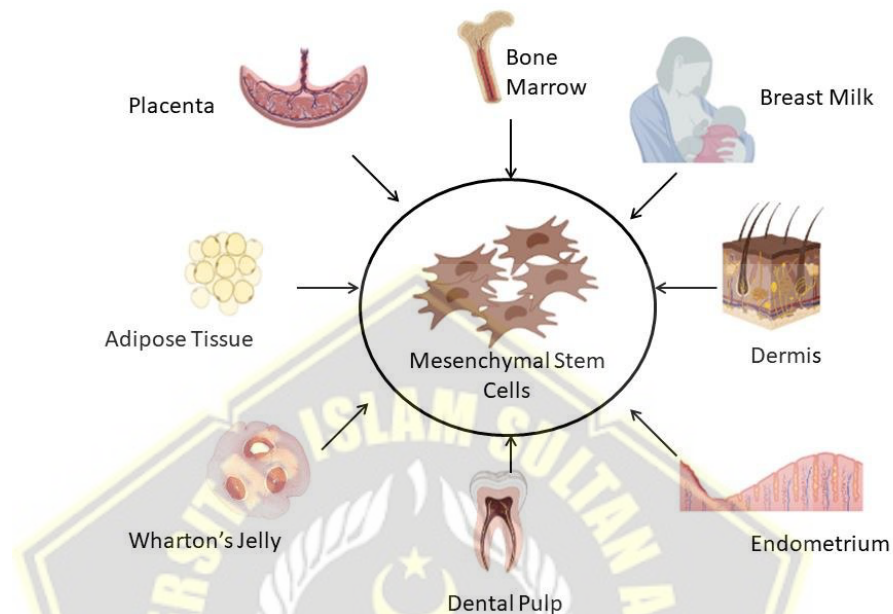
2.5. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC)

2.5.1. Definisi

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit. *Mesenchymal stem cell* dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, bone marrow, hingga *wharton jelly* dari tali pusat⁶². Secara umum, MSC diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, MSC yang diisolasi dari tikus, dimana MSC tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat *osteogenic*⁶³.

2.5.2. Sumber MSC

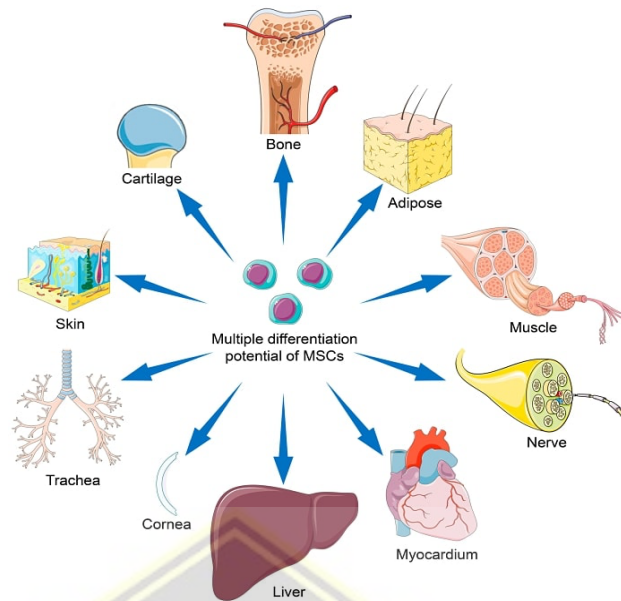
MSC dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthon jelly* dari tali pusat, dan plasenta⁶².



Gambar 2.14. Sumber MSC⁶⁷.

2.5.3. Karakteristik MSC

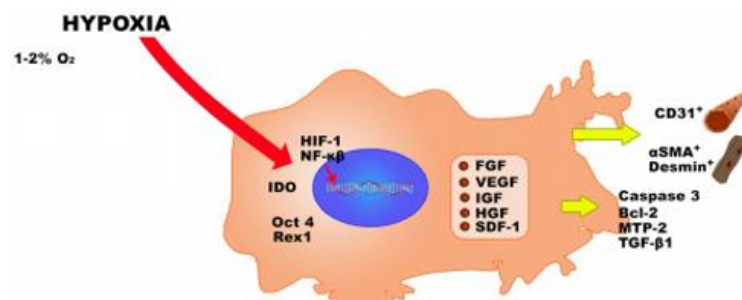
MSC memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan self renewal, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit⁶⁴. Selain itu MSC juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengeksresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti-inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam menekan inflamasi yang terjadi di CNS⁶⁵.



Gambar 2.15. Diferensiasi MSC

2.5.4. Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, *self renewal*, dan pelekatan MSC⁶⁶. Lebih lanjut kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSC⁶⁷.



Gambar 2.16 Hipoksia mengaktivasi MSC⁷¹.

2.5.5. *Secretome Stem Cell*

MSC diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut *sekretome*, biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, interleukin, *growth factor* (GF), hormon, eksosom, mikrovesikel, serta faktor anti-inflamasi. Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel^{68,69}. Sejumlah besar molekul bioaktif yang dihasilkan dari MSC termasuk bahan genetik (DNA, fragmen RNA, *microRNAs* (miRNAs)), enzim, sinyal dan protein transduksi sinyal, faktor imunomodulator dan *growth factor* yang dilapisi oleh membran bilayer.⁷⁰ Neurotropin yang dihasilkan dari MSC (*brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dan *nerve growth factor* (NGF)), yang sangat penting untuk pengurangan cedera tulang belakang. Hal ini juga berkaitan dengan CNS⁷¹. Selain itu *secretome* yang disekresikan dari MSC menunjukkan efek menguntungkan dalam pengobatan penyakit degeneratif hepatobilier, pernapasan, tulang, gastrointestinal, kardiovaskular dan sistem saraf⁷². Lebih lanjut, eksosom yang berasal dari *umbilical cord mesenchymal stem cell* mereduksi eksitasi neuron serta mengaktivasi sel glial⁶⁸.

2.6. Peran *Secretome Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia (S-HMSCs) Terhadap Ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1 pada Jaringan Otak Tikus Model DM Tipe 1

MSC mensekresikan banyak derivat seperti sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, interleukin, *growth factor* (GF), hormon,

eksosom, mikrovesikel, serta faktor anti-inflamasi⁷¹. Kondisi hipoksia akan memicu MSC untuk mensekresikan lebih banyak soluble molekul yang mengandung lebih banyak mediator-mediator anti-inflamasi dan *growth factor*⁶⁶. Peran *secretome* untuk mensupresi ekspresi CD38 yang diinduksi oleh SASP dan proses degenerasi karena *aging* belum sepenuhnya jelas meski CD38 merupakan target yang sangat menjanjikan untuk melawan neurodegenerasi serta peradangan saraf karena hubungannya yang erat dengan penuaan serta memiliki bukti eksperimental³. MSC secara langsung terbukti dapat mensupresi CD38²⁴. Selain itu, MSC juga mensekresikan (*brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dan *nerve growth factor* (NGF)) yang penting dalam pertumbuhan jaringan saraf⁶⁸.

Sitokin anti-inflamasi yang disekresikan seperti IL-10 akan menekan faktor inflamasi dalam SASP seperti IL-6 dan IL-1 serta agen *inflammasome* lain melalui jalur NF- κ B^{73,74}. Faktor-faktor SASP yang tersupresi akan menghambat terbentuknya *senescence* sel baru yang diinduksi SASP yakni parakrin *senescence* sel^{30,36}. Lebih lanjut, SASP dari *senescence* sel yang disupresi akan menghambat terekspresinya CD38^{28,38}. Menurunnya ekspresi CD38 akan menyebabkan peningkatan koenzim NAD⁺ yang dipergunakan dalam metabolisme sel dalam reaksi redoks serta dipergunakan oleh SIRT1 dalam melepas gugus asetil dari protein. Peningkatan koenzim NAD⁺ dapat digunakan untuk mengaktifkan SIRT1 sebagai sensor intraseluler NAD⁺⁷⁵. Selain itu, peningkatan ekspresi SIRT1 akan berimplikasi positif sebagai neuroproteksi, mengurangi pembentukan plak amyloid, dan menekan proses

neurodegenerasi serta penurunan kognitif^{76,77,78}. SIRT1 menggunakan NAD⁺ untuk menghilangkan struktur kimia spesifik yang disebut gugus asetil sebuah proses yang disebut deasetilasi dari protein seluler untuk mengontrol regulasi transkripsi, metabolisme energi, ritme sirkadian, perbaikan DNA, dan kelangsungan hidup sel.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

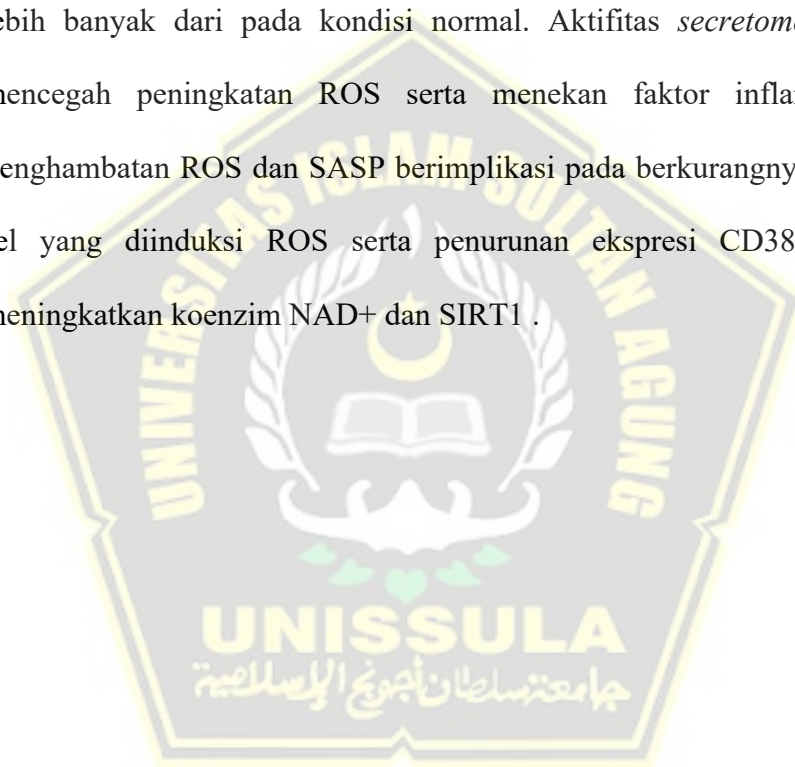
3.1. Kerangka Teori

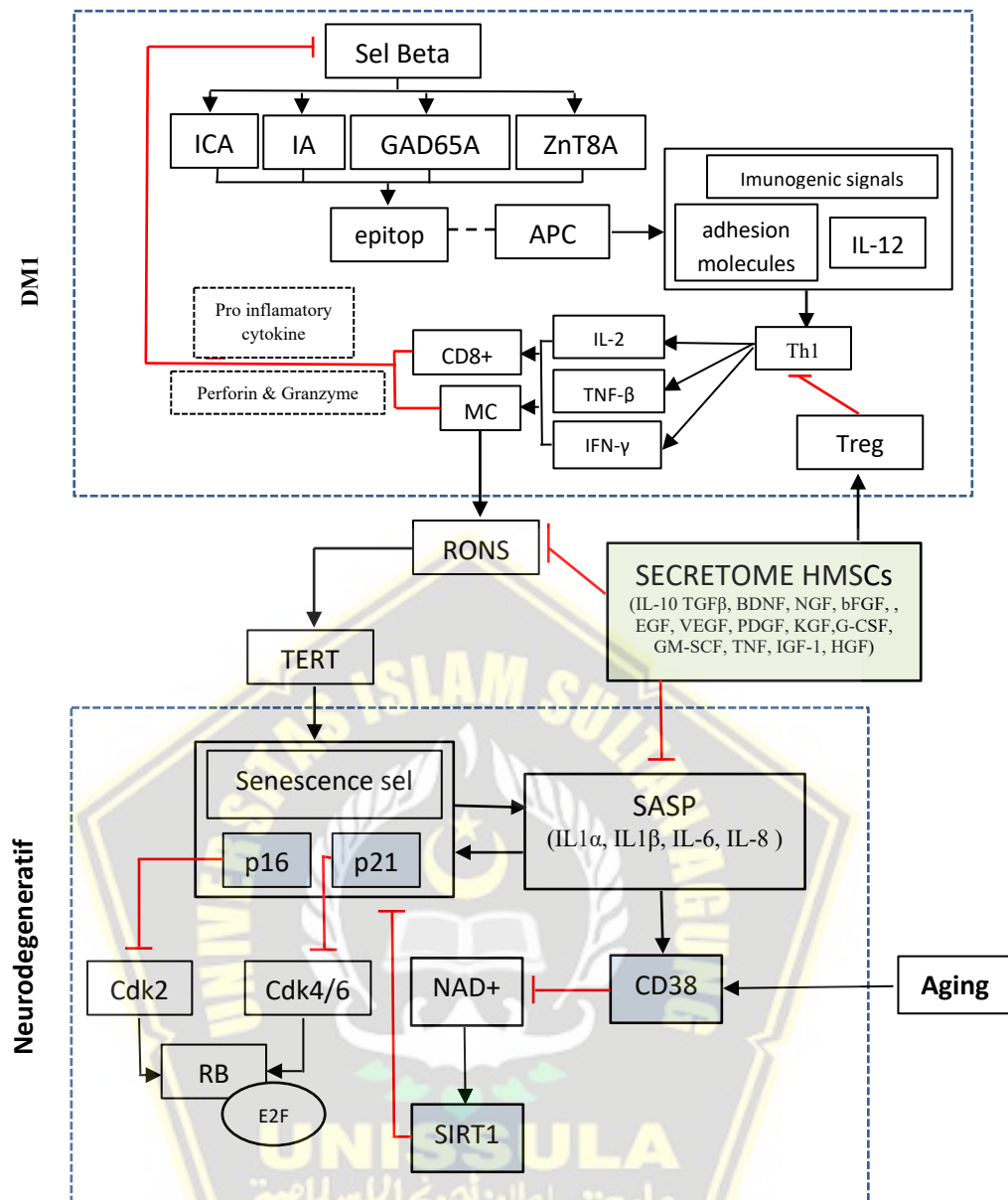
Sel beta pankreas mengekspresikan *glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody* (GAD65A), *insulin autoantibody* (IAA), *islet cell autoantibody* (ICA), *zinc transporter 8 autoantibody* (ZnT8A). Autoantigen ini merilis epitop-epitop yang kemudian ditangkap oleh *antigen presenting cell* (APC) seperti makrofag dan sel dendritik. Sel-sel APC ini kemudian merilis *immunogenic signal*, molekul adhesi dan IL12 yang akan mengaktifasi Th1. Th1 yang teraktifasi akan merilis IL-2, IFN γ , dan TNF β yang akan mengaktifasi autoreaktif CD8 $^{+}$ dan makrofag yang akan merilis *perforin* dan *granzym* serta sitokin pro-inflamasi yang akan menghancurkan beta sel. Akumulasi jumlah beta sel yang berkurang akan menyebabkan terjadinya diabetes tipe 1. Reaktif oksigen nitrogen spesies (RONS) yang dihasilkan oleh mekanisme tersebut berkontribusi pada onset dan progresi penuaan seluler dengan merusak mtDNA atau bersinergi dengan modifikasi enzim *telomerase reverse transcriptase* (TERT) dan aktivitas jalur p53 dan Ras.

Peningkatan akumulasi *senescence sel* di otak dan terakumulasi melalui *senescence* yang diinduksi ROS, *senescence* akibat disfungsi mitokondria, serta parakrin *senescence* sel. Lebih lanjut, *senescence* sel ini akan merilis faktor-faktor inflamasi dalam *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) yang mengakibatkan terjadinya peningkatan ekspresi

CD38 serta menyebabkan efek parakrin *senescence* sel baru. Tingginya ekspresi CD38 akan mengonsumsi banyak *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD⁺) sehingga menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi yang berefek downstream penurunan SIRT1.

Secretome MSC Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan survival dan proliferasi MSC. MSC hipoksia akan mengekspresikan molekul soluble berupa sitokin, kemokin dan *growth factor* lebih banyak dari pada kondisi normal. Aktifitas *secretome* akan turut mencegah peningkatan ROS serta menekan faktor inflamasi SASP. Penghambatan ROS dan SASP berimplikasi pada berkurangnya *senescence* sel yang diinduksi ROS serta penurunan ekspresi CD38 yang akan meningkatkan koenzim NAD⁺ dan SIRT1 .

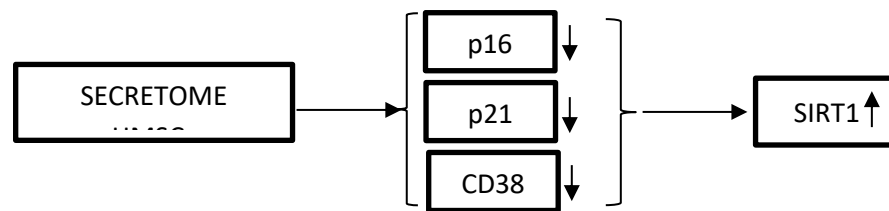




Gambar 3.1. Kerangka Teori

AgPC: antigen-presenting cell; GAD65A: glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody; IAA: insulin autoantibody; ICA: islet cell autoantibody; ZnT8A: zinc transporter 8 autoantibody.

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian secretome H-MSCs terhadap penurunan ekspresi CD38 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28
2. Terdapat pengaruh pemberian secretome H-MSCs terhadap penurunan ekspresi p16 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28
3. Terdapat pengaruh pemberian secretome H-MSCs terhadap penurunan ekspresi p21 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28
4. Terdapat pengaruh pemberian secretome H-MSCs terhadap peningkatan ekspresi SIRT1 pada otak tikus yang diinduksi STZ pada dosis 1000 μ l dan 500 μ l pada hari 28

BAB IV

METODE PENELITIAN

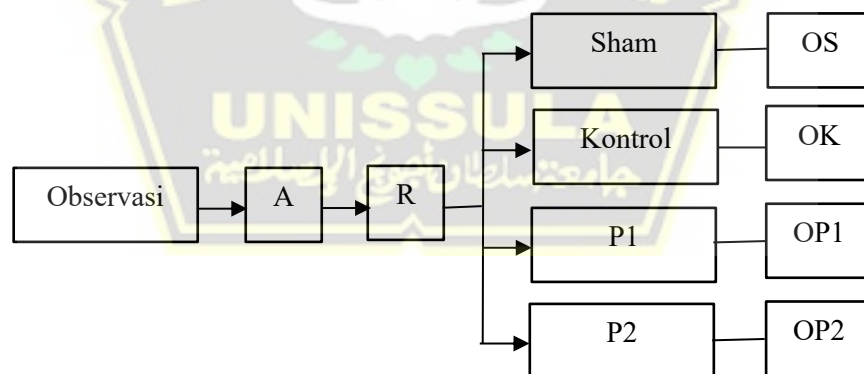
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

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

Perlakuan terdiri dari:

- Kelompok: Sham (tidak diberi perlakuan),
- Kelompok: Kontrol (DM)
- Kelompok: P1 (pemberian secretome H-MSC dosis $500 \mu\text{L}$),
- Kelompok: P2 (pemberian secretome H-MSC dosis $1000 \mu\text{L}$),

A : Adaptasi R : Randomisasi P : Perlakuan O: Observasi



Gambar 4.1. Rancangan penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Secretome HMSCs dosis 500 μ L dan 1000 μ L

4.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. *Secretome* MSC Hipoksia

Secretome adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh *mesenchymal stem cell* (MSCs). Molekul larut meliputi beragam serum proteins, *growth factor*, *angiogenic factor*, *hormone*, *cytokine*, *extracellular matrix protein*, mikrovesikel, eksosom, dan bahkan, sebagian lipid mediator dan material genetik. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs secara hipoksia. Kemudian dilakukan filtrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF). Sekretome yang digunakan dalam beberapa kelompok yaitu kelompok P1 sebanyak 500 μ l dan kelompok P2 sebanyak 1000 μ l. Skala: Rasio

4.2.2.2. Ekspresi CD38

Ekspresi CD38 adalah gambaran *surface marker* yang berperan sebagai pendegradasi utama *Nikotinamida adenina dinukleotida* (NAD⁺). Sampel jaringan otak diambil dan dibuat slide

untuk dianalisis dengan metode IHC yang disajikan dalam bentuk persentase. Skala : Rasio

4.2.2.3. Ekspresi p16

Ekspresi p16 adalah gambaran protein supresor tumor yang memainkan peran penting dalam mengatur siklus sel, yang mengkodekan inhibitor spesifik dari cyclin D-CDK4 dan CDK6. Dengan mengontrol aktivitas CDK4, p16 membantu mengontrol fosforilasi Rb pada akhir G₁. Sampel jaringan otak diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan *metode reverse transcriptase-polimerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase. Skala : Rasio

4.2.2.4. Ekspresi p21

Ekspresi p21 adalah gambaran CDK inhibitor yang menghambat aktivitas CDK-2 dan CDK-4 dibawah regulasi p53, dan menghentikan siklus sel pada fase G₁. Sampel jaringan otak diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode *reverse transcriptase-polimerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase. Skala : Rasio

4.2.2.5. Ekspresi SIRT1

Ekspresi Protein *silent regulator 2* (Sir2), atau dikenal juga sebagai sirtuin adalah gambaran keluarga protein pensinyalan yang terlibat dalam regulasi metabolisme yang awalnya diidentifikasi sebagai *gene silencing* untuk mencegah ekspresi gen. SIRT1 ini

adalah NAD-dependent deacetylase yang sangat terkonservasi dan bergantung pada NAD⁺ untuk aktivitasnya. Sampel jaringan otak diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk dianalisis dengan metode reverse transcriptase-polimerase chain 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 berusia 3 bulan dengan bobot badan 250 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House Integrated Biomedical Laboratory*, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang dan diinjeksi STZ 65 mg/KgBB

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

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

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat dan tidak mengalami kecacatan.
3. Bobot badan 200-250 gram.
4. GDP 200 setelah hari ke-7 pemberian STZ

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.

2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mengalami infeksi atau mati selama rentang waktu penelitian

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur *Wistar* dibagi menjadi 4 perlakuan yaitu perlakuan Sham (tidak diberi perlakuan), Kontrol (diinduksi STZ tanpa pemberian *secretome*), P1 (Pemberian *secretome* dengan kadar 500 μL), dan P2 (Pemberian *secretome* kadar 1000 μL).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 6 ekor sampel per kelompok.

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*. Oksigen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Instrumen dan alat Real-Time PCR dan *thermal cycle* (PCRmax Eco 48 real time PCR), fluorometer, mikropipet dan tip,

homogenizer, mikrosentrifuge dan rotor, spinner, vortex, micro pestle, microtube 1,5 cc, qPCR tube 0,5 cc, qPCR tube 0,2 cc, qPCR well plate dan seal, timbangan analitik, pinset, gunting.

4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep bahan untuk hewan model yakni STZ. Bahan untuk analisis ekspresi CD38 dengan IHC Phospat buffer solution (PBS), Ethanol 70%, 80%, 90%, Xylol, Parrafin cair (histoplast), Bahan pengecatan *Hematoksin-Eosin* (HE), Canada balsam, Antibodi primer CD38 Rabbit pAB, Antibodi sekunder *Biotinylated goat anti-polyvalent*, Kit *universal streptavidin-biotin (EnVision-DakoCytomation^R)*. Bahan untuk analisis ekspresi p16, p21, dan SIRT1 dengan RT-PCR adalah TRI reagen, isopropyl-alcohol, ethanol 75%, ddH₂O, master mix qPCR, cDNA syntesis kit *TOYOBO ReverTra AceTM qPCR RT Master Mix with gDNA Remover*, *Quantifluour RNA Kit*, qPCR master mix *Bioline SensiFAST SYBR[®] No-ROX Kit*, serta rat primer dari gen-gen yang target yang memiliki sekuens masing-masing.

Tabel 4.1. Sekuen primer untuk amplifikasi gen-gen target

Gene	Primer	Anneling Temp.	Cycles
p16	F : CTACTCTCCTCCGCTGGGAA	54 °C	35
	R : GGCCTAACTTAGCGCTGCTT		
p21	F : CAGGCTCAGGAGTTAGCAAGG	65 °C	35
	R : TCAACACCCTGTCTTGTCTTCG		
SIRT1	F : CTTGGAGCAGGTTGCAGGAAT	62 °C	35
	R : GGACACCGAGGAACTACCTGAT		
GAPDH	F : TGACAACTTTGGCATCGTGG		
	R : GGGCCATCCACAGTCTTCTG		

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.5.2. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

Seluruh proses isolasi *mesenchymal stem cell* 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 berisi medium transport.
2. Umbilical cord diletakkan ke petri dish, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS. Tindakan dilakukan dengan pinset

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 tumbuh 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 konflensi 80%

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

Pembacaan marker dengan flowcytometri dilakukan beberapa tahap, yakni:

1. Lepaskan sel dari flask dengan menggunakan BDTM accutaseTM cell *detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1x10⁷ sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer

(cat. No. 554656) atau Phospat Buffer Saline (PBS) buffer. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung falcon 5ml yang berisi *reagen flowcytometry*
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 pada setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel ke dalam masing-masing tabung. Vortex atau tapping.
5. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.
6. Cuci sebanyak 2 kali dengan stain buffer (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l stain bufer (PBS) atau 1 kali washing buffer .
7. Baca di flow cytometry gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk set up cytometry (sebagai kompensasi).

Tabel 4.2. Analisis flowcytometri

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD29	5 μ l
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD44	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD45	5 μ l
4	APC <i>Mouse anti-human</i> CD31	5 μ l
5	Kosong	-
	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20 μ l
6	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20 μ l
	hMSC <i>positive cocktail</i>	20 μ l
7	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20 μ l

4.5.4. Proses Hipoksia

Proses hipoksia dilakukan beberapa tahap yakni:

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC dimasukkan 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 menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan secretome yang selanjutnya dibagi sesuai dosis P1 dan P2

4.5.5. Prekondisi Hewan Model

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan sehat yang didapatkan dari di unit hewan coba *Integrated Biomedical Laboratory*, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Tikus dipelihara dalam kandang yang sudah distandarisasi berukuran 37 x 40 x 18 cm dengan penutup kawat kasa dan kondisi temperature ruangan 23-25°C, kelembaban 40-70%, dan siklus gelap:terang setiap 12:12 jam. Perlakuan pada tikus dimulai dengan mengadaptasi tikus

selama 7 hari dalam kandang yang terstandarisasi dengan suasana laboratorium untuk pengamatan terhadap kesehatan dan perubahan tingkah laku, selama penelitian hewan diberi pakan standar AIN-76A dan air minum secara adlibitum (Werawatganom, 2014). Dasar kandang di beri serbuk kayu dan diganti setiap 2 hari. Setelah dilakukan randomisasi masing-masing kelompok, tikus akan menempati kandang yang berbeda.

Penelitian berlangsung dengan prosedur perlakuan hewan secara benar ditinjau dari prinsip 3R (*reduction, replacement, refinement*) serta prinsip 5F (*freedom from hunger and thirst, freedom from discomfort, freedom from pain, injury or disease, freedom of express normal behaviour, freedom from fear and distress*) (Food and agriculture organization of the united nations, 2011) dan diberlakukan kriteria putus uji apabila subjek penelitian mengalami sakit atau kematian sehingga tidak bisa memenuhi prosedur penelitian yang membutuhkan waktu selama 28 hari.

4.5.6. Pembuatan Model DM tipe 1

Beberapa Langkah pembuatan hewan coba adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan tikus yang telah dirandomisasi dengan berat 200-250gr.
2. Menyiapkan sediaan STZ dengan dosis 65 mg/kgBB ekor.
3. Menginduksi secara intraperitoneal pada tikus.
4. Selang dua hari memeriksa gula darah puasa.
5. Melakukan validasi dengan mpemeriksaan gula darah puasa pada hari ke-2, 5 dan 7.

4.5.7. Uji Validasi Hewan model

Validasi dilakukan dengan pemeriksaan kadar gula darah puasa (GDP) yang diambil dari ujung ekor tikus 3 hari setelah melakukan injeksi STZ intraperitoneal. Hewan model masuk dalam kriteria inklusi setelah kadar GDP mencapai diatas 200 mg/dl pada hari ke-7.

4.5.8. 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 intraperitoneal
2. Setelah tikus mati, dilakukan koleksi organ otak kemudian disimpan dalam cryotube yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80oC dalam RNA later dan satu bagian terpisah yakni buffer formalin 10%.

4.5.9. Pembacaan Ekspresi CD38 dengan IHC

Ambil *slide* sampel dari kulkas 4°C dan diamkan pada suhu ruang selama ± 30 menit, kemudian dilakukan proses deparafinisasi dengan merendam sampel dalam xylene 1,2 dan 3 masing masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan mencelupkan *slide* sampel pada rak *staining* logam kedalam etanol absolut 1, absolut 2, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 70% masing masing selama 3 menit, kemudian dicuci pada air mengalir selama 5 menit, selanjutnya direndam aquades

selama 5 menit. Proses selanjutnya yaitu *Antigen retrieval* dengan merendam slide dalam *citrate buffer* 1x pH 6,5 dan masukkan dalam Decloaking Chamber (Biogear) selama 30 menit pada suhu 90°C Keluarkan *glass jar* dari *microwave* dan diamkan hingga mencapai suhu ruang (± 30 menit). Setelah selesai keluarkan ke suhu ruang hingga slide dingin.

Selanjutnya *slide* dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan blocking peroksidase endogen dengan H_2O_2 selama 5 menit, kemudian *slide* dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan *blocking background* dengan meneteskan larutan *Background Sniper* (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) pada jaringan per *slide* dan diinkubasi selama 20 menit, selanjutnya *slide* dikeringkan dengan menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan tanpa merusak jaringan dan ditambahkan *first Antibody* sebanyak 70-100 μ L antibodi CD38 (Dako; Carpinteria, CA), kemudian tutup *humidity chamber* dan simpan di dalam kulkas 4°C *overnight*.

Ambil *slide* sampel dari kulkas 4°C dan diamkan pada suhu ruang selama ± 30 menit hingga mencapai suhu ruang, kemudian cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, bersihkan jaringan dan tetesi *secondary antibody* *Trek Universal Link* (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi *Trek Avidin-HRP Label* (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) inkubasi selama 45 menit pada suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak

3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi DAB 1:400 (1 μ L Betazoid DAB Chromogen + 400 μ L Betazoid DAB) inkubasi 3 menit dalam ruangan gelap, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian lakukan *counterstaining* dengan mencelupkan dalam *Mayer Hematoksilin* (Bio-Optica Milano S.p.A) selama 3 menit, cuci slide menggunakan air mengalir selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan lithium karbonat sebanyak 100 μ L setiap jaringan, kemudian dicuci air mengalir selama 5 menit dan kemudian *slide* dicelupkan pada rak *staining* logam kedalam etanol 70%, etanol 80%, etanol 96%, etanol absolut 1, absolut 2, masing masing selama 3 menit, selanjutnya proses clearing dengan mencelupkan slide pada xylene 1, 2 dan 3 masing masing selama 5 menit, kemudian mounting jaringan dengan entellan.

4.5.10. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

4.5.10.1. Ekstraksi RNA

Prosedur ekstraksi RNA terdiri dari tiga tahapan utama yang diuraikan sebagai berikut.

Tahap I *Sample preparation*

Sampel jaringan otak dalam RNA-later dikeluarkan dari freezer dan ditunggu hingga agak sedikit cair kemudian sampel ditimbang seberat 50-70 mg dan dipindahkan ke mikrotube 1,5 mL menggunakan pinset yang selanjutnya, ditambahkan 1000 μ L TRIreagen (*Trizol Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Sampel yang tercampur digerus

dengan mikropestel hingga hancur kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.

Tahap II *Phase separation*

Sampel yang telah diinkubasi ditambahkan 200 μ L *chloroform* kemudian divortex hingga homogen dan dilakukan inkubasi selama 5-15 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi pada 12000xg selama 15 menit pada suhu 4°C. Hasil dari sentrifugasi ini akan diperoleh 3 lapisan larutan yaitu : (1) *lower red organic phase* (protein) (2) *interphase* (DNA) (3) *upper aqueous phase* (RNA); selanjutnya lapisan atas dipindahkan ke mikrotube baru.

Tahap III *RNA Precipitation*

Sampel *aqueous phase* (RNA sampel) dalam microtube 1,5 mL ditambahkan dengan 500 μ L 100% 2-propanol (isopropyl-alcohol) dan dihomogenkan dengan vortex, selanjutnya diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi pada 12000xg selama 5 menit dengan suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang, kemudian pellet RNA dicuci dengan 1 mL 75% ethanol dan divortex hingga homogen. Selanjutnya, sampel disentrifugasi 7500xg selama 5 menit dengan suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pellet RNA dikeringanginkan dengan cara tube dibiarkan terbuka selama 5-10 menit. Setelah dikeringanginkan, pellet RNA diresuspensi dengan

diethylpyrocarbonate-treated (DEPC) water atau ddH₂O dan dihomogenkan dengan cara ditapping secara perlahan.

4.5.10.2. Kuantifikasi RNA

Prosedur untuk kuantifikasi sampel RNA yang sudah diekstraksi dari sampel jaringan dilakukan dengan dua tahap yaitu pembuatan working solution dan pengukuran RNA sampel. Tahap pertama, *working solution* atau larutan standard dibuat dengan menambahkan 10 μ L *Quantifluor RNA dye* dengan 3990 μ L 1X TE buffer, selanjutnya divortex agar lebih homogen. Sebelum dilakukan pengukuran sampel RNA, larutan blanko dapat diukur terlebih dahulu untuk tujuan kalibrasi atau sebagai pembanding dalam analisis fotometri dengan cara menambahkan 200 μ L *working solution* pada microtube 0.5 mL dan diukur intensitasnya. Tahap kedua, sampel RNA sebanyak 5 μ L ditambahkan dalam 200 μ L *working solution*, dihomogenkan dengan spinner dan diinkubasi selama 5 menit pada ruang gelap, selanjutnya konsentrasi RNA sampel dapat diukur.

4.5.10.3. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan berdasarkan prosedur pabrikan dari Kit *TOYOBO ReverTra AceTM qPCR RT Master Mix with gDNA Remover* dengan No. FSQ-301. Langkah pertama dalam tahapan sintesis cDNA yaitu disiapkan campuran 1 pada tube 0,2 mL steril dengan komposisi seperti berikut :

Tabel 4.3. Komposisi reagen sintesis cDNA

Reagen	Volume (μL)
<i>4X DN Mastermix (with gDNA remover)</i>	2
<i>RNA Tempale</i>	1-2
<i>Nuclease Free Water</i>	ad 8
Total	8 μL

Larutan dihomogenkan dengan spinner, selanjutnya campuran 1 diinkubasi pada termal cycle dengan suhu 37°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, campuran 2 disiapkan dengan menambahkan 2 μL *5X RT Mastermix II* pada campuran 1 dan dilanjutkan pada proses inkubasi dengan termal cycle pada suhu 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit dan 98°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, sampel cDNA dalam tube siap untuk dianalisis atau disimpan di -20°C untuk analisis selanjutnya.

4.5.10.4. Analisis ekspresi gen dengan qRT-PCR

Proses analisis gen target dilakukan dengan terlebih dahulu mempersiapkan larutan Mastermix berdasarkan prosedur *qPCR master mix Bioline SensiFAST SYBR® No-ROX Kit* (Cat. No. BIO-98005) dengan komposisi berikut :

Tabel 4.4. Komposisi reagen Mastermix qRT-PCR

Reagen	Volume (μL)
<i>2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix</i>	10
<i>10 μM Forward Primer</i>	0,8
<i>10 μM Reverse Primer</i>	0,8
<i>cDNA Tempale</i>	1-3
<i>Nuclease Free Water</i>	ad 20
Total	20 μL

Pembuatan *Mastermix* tersebut adalah untuk 1 kali reaksi, jumlah reaksi pembuatan *Mastermix* dapat disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan diuji. Setelah semua larutan reaksi dihomogenkan dan di spindown, 20 μL larutan reaksi dimasukkan ke dalam *PCR microplates* kemudian *seal* dipasang dengan rapat dan terbentuknya gelembung udara dihindari. Selanjutnya, dilakukan pengujian ekspresi gen target maupun *housekeeping gene* dengan mesin *real time PCR* (PCRmax Eco 48 real time PCR) dengan kondisi standart untuk PCR adalah sebagai berikut:

Tabel 4.5. Kondisi siklus, suhu dan waktu mesin PCR untuk pengujian gen

Siklus	Suhu	Waktu	Keterangan
1	95°C	2 menit	Aktivasi Polimerase
40	95°C	5 detik	Denaturasi
	60-65°C	10 detik	Annealing
	72°C	5-20 detik	Elongasi

Catatan: Sebelum dimasukkan ke RT-PCR dilakukan optimasi suhu *annealing* untuk setiap gen.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), *Intergrated Biomedical Laboratory* Fakultas Kedokteran Unissula

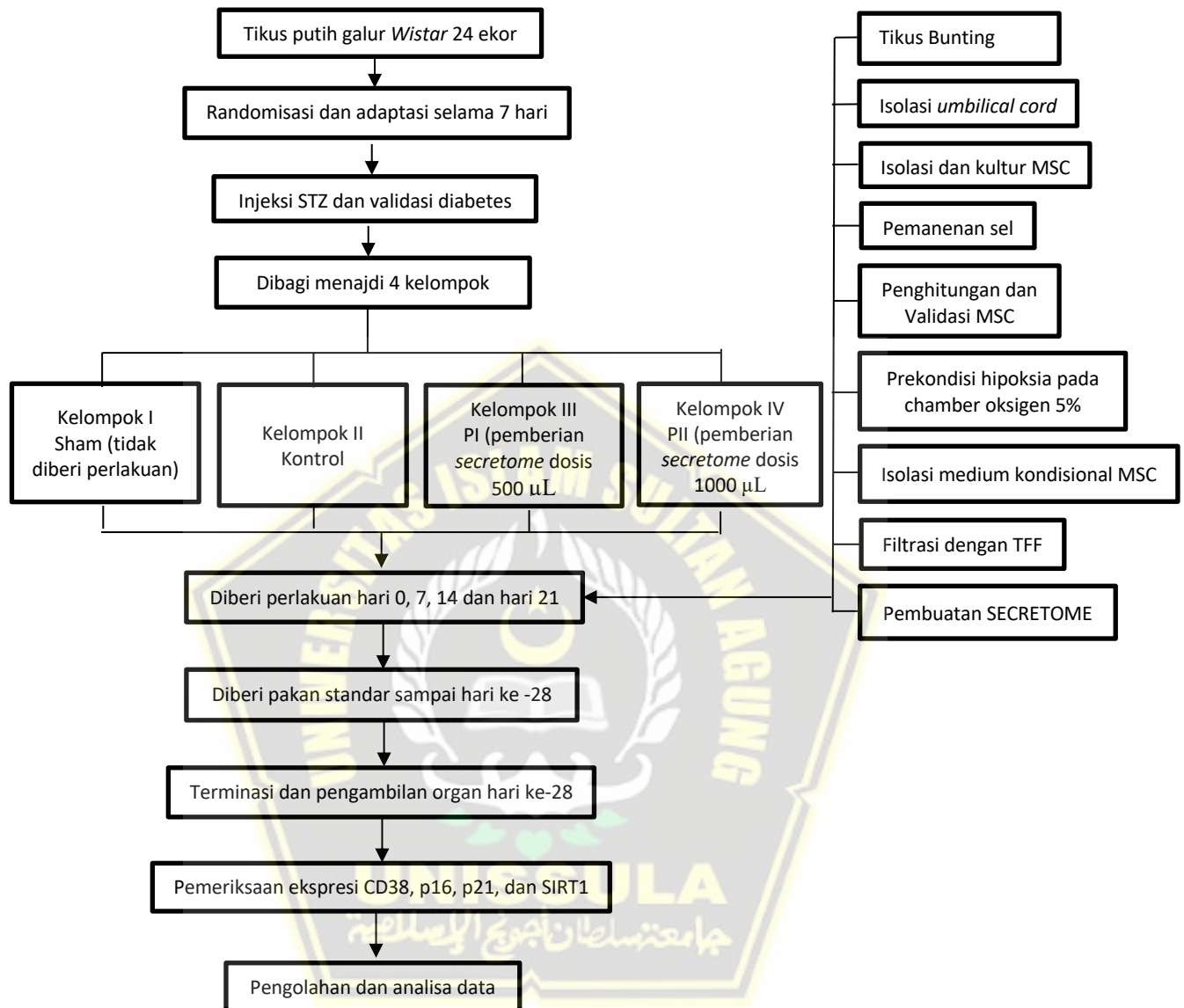
4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan maret - mei 2022.

4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh, diproses, disunting, dan ditabulasi, kemudian dilakukan uji deskriptif lalu dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene*. Apabila sebaran data normal dan varian data sama, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan hasilnya $p < 0,05$ akan dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Bila terdapat sebaran data tidak normal dan varian tidak sama, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan R Studio.

4.8. Alur Penelitian



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

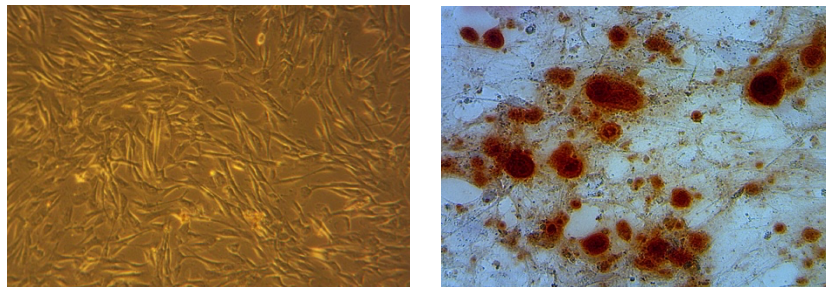
Penelitian eksperimental ini kami lakukan selama periode bulan Maret 2022 hingga Mei 2022 di laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek dari penelitian yang telah dilakukan ini adalah tikus galur *wistar* jantan yang berbobot 250 hingga 300 gram berumur 4-6 bulan model diabetes melitus tipe 1 yang diinduksi STZ sebanyak 65 mg/kgBB per ekor⁷⁹. Sampel penelitian ini sebanyak 24 ekor tanpa *drop out* selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol, dan 1 kelompok sham. Kelompok perlakuan pertama (P1) sebanyak 6 ekor hewan uji dengan pemberian 500 µL dosis *secretome* dan kelompok perlakuan kedua (P2) terdiri atas 6 hewan uji dengan pemberian 1000 µL. sedangkan kelompok kontrol tanpa pemberian *secretome*, dan kelompok sham adalah kelompok sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi Secretome Mesenchymal Stem Cell Hypoksia (S-HMSCs)

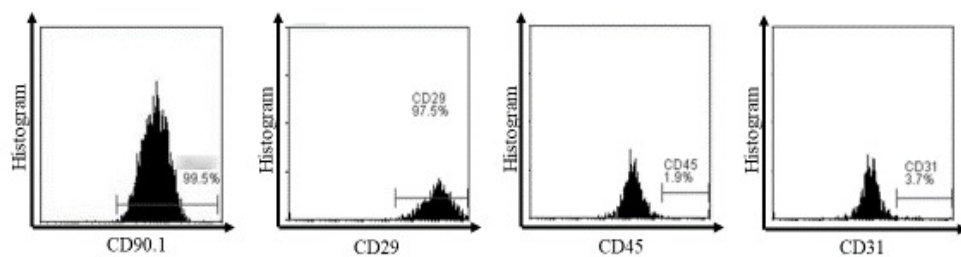
Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, dengan standar steril. MSCs diisolasi dari *warthon jelly umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi yang telah didapatkan kemudian dikultur pada flask steril T75 dengan medium komplit khusus.

Kultur MSCs yang adherent dan konfluen lebih dari 80% setelah pasase ke-4 memiliki morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis. MSCs memiliki ciri dapat berdiferensiasi menjadi sel osteosit, yang ditandai dengan endapan kalsium berwarna merah setelah pewarnaan dengan *Alizarin red dye*. Dari hasil pengamatan ini sel hasil isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca yakni dapat berdiferensiasi menjadi lineage yang baru.



Gambar 5.1. (A) Isolasi MSCs dengan konfluen 80% didapatkan gambaran sel berbentuk *spindle-like* pada pembesaran 100x. (B) Diferensiasi osteogenic menggunakan pewarnaan *Alizarin red* pada populasi MSC pembesaran 100x.

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



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

Sel MSCs diprekondisi secara hipoksia selama 24 jam dalam chamber CO₂, selanjutnya medium kultur MSCs yang mengandung secretome tersebut dikoleksi dan difiltrasi menggunakan alat *tangential flow filtration* (TFF) hingga diperoleh molekul kecil berukuran 10 hingga 50 kDa yang mengandung molekul anti-inflamasi seperti *interleukin-10* (IL-10) yang memiliki ukuran 18 kDa.

Tabel 5.1. Analisis kandungan biomolekul S-HMSCs

Molekul	S-HMSCs (pg/ml)
VEGF	1228.86 ± 27.71
PDGF	1043.06 ± 24.49
FGF	1085.34 ± 28.92
IL-10	415.02 ± 7.14

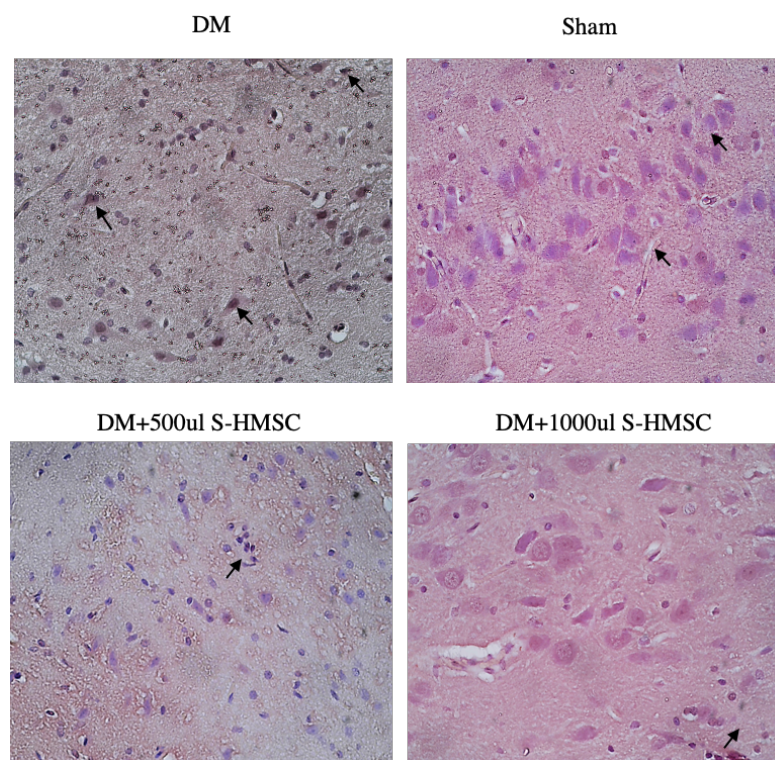
Sitokin IL-10 ini berperan mensupresi SASP yang disekresikan oleh senescence sel seperti IL-6, IL-1 dan TNF- α serta agen inflamosome lain melalui jalur NF- κ B^{20,73}. *Growth factor* akan menstimulasi pembentukan jaringan baru melalui pensinyalan endogen untuk mengatur respons seluler yang diperlukan dalam proses penyembuhan luka seperti migrasi, proliferasi, dan diferensiasi.

Tabel 5.2. Data hasil penelitian ekspresi CD38, p16, p21, dan SIRT1

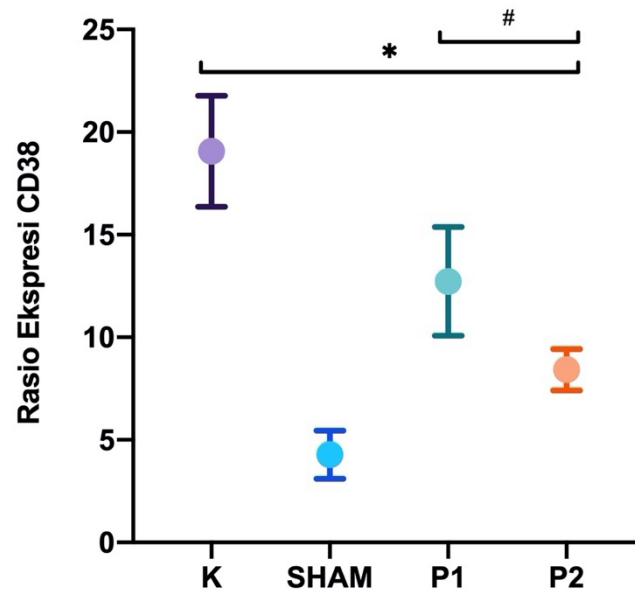
Variabel	Kelompok				pvalue
	K n=6 Mean±SD	P1 n=6 Mean±SD	P2 n=6 Mean±SD	SHAM n=6 Mean±SD	
SIRT1	1±0	2.48±0.67	0.04±0.017	0.003±0.009	
<i>Saphiro wilk</i>	0.001	0.627	0.057	0.001	
<i>Levene test</i>					0.001
<i>Kruskal-Wallis</i>					0.001
p21	1±0	0.32±0.037	0.05±0.025	0.44±0.079	
<i>Saphiro wilk</i>	0.001	0.765	0.037	0.059	
<i>Levene test</i>					0.145
<i>Kruskal-Wallis</i>					0.001
p16	1±0	0.25±0.38	0.31±0.38	0.60±0.57	
<i>Saphiro wilk</i>	0.001	0.017	0.023	0.024	
<i>Levene test</i>					0.426
<i>Kruskal-Wallis</i>					0.004
CD38	19.07±2.69	12.72±2.65	8.41±1.008	4.274±1.17	
<i>Saphiro wilk</i>	0.981	0.779	0.753	0.357	
<i>Levene test</i>					0.184
<i>One Way Anova</i>					0.001

5.1.2. Efek Pemberian *Secretome Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia (S-HMSCs) Terhadap Ekspresi CD38 pada Jaringan Otak Tikus Model DM Tipe 1

CD38 adalah glikoprotein transmembran yang berukuran 45 kDa yang berperan penting dalam *degradasi nicotinamide adenin dinucleotide* (NAD⁺), CD38 akan menghasilkan satu molekul cADPR untuk setiap 100 molekul NAD yang dihidrolisis⁸⁰. Peningkatan ekspresi CD38 berkaitan dengan paparan SASP yang disekresikan oleh senescence sel. Pada pemberian S-HMSCs ekspresi CD38 berkurang secara signifikan tergantung dosis (Gambar 5.3).



Gambar 5.3 . Hasil pemeriksaan IHC Thalamus pada jaringan otak (perbesaran 40x) yang diolah dengan imageJ menampilkan perbedaan persentase ekspresi CD38(tanda panah)



Gambar 5.4. Hasil IHC menunjukkan rasio ekspresi CD38 pada jaringan otak masing-masing kelompok perlakuan.
*Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Tabel 5.3. Uji Post Hoc LSD ekspresi CD38 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
K	SHAM	0.001*
	P1	0.001*
	P2	0.001*
SHAM	P1	0.001*
	P2	0.025*
P1	P2	0.019*

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

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs 500 μ L dan 1000 μ L secara berturut-turut menurunkan ekspresi CD38 hingga 6.3 dan 10.6 kali lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi CD38 dibanding kontrol dan sham. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian

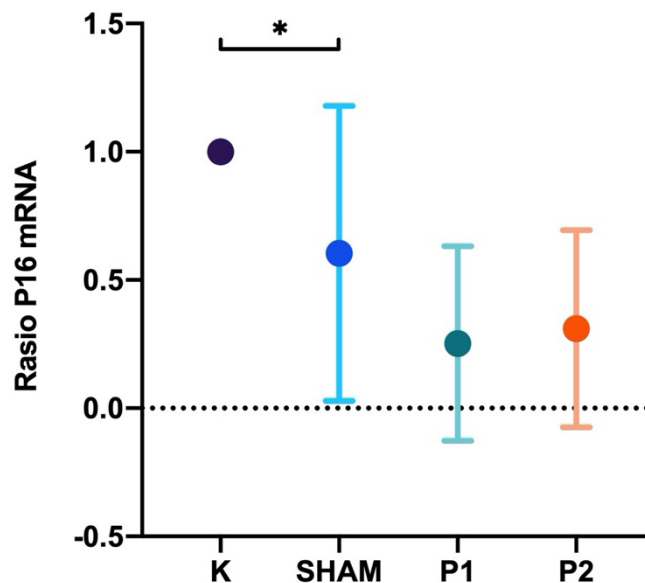
S-HMSCs mampu menurunkan ekspresi CD38 meskipun belum setara dengan kondisi normal tanpa induksi STZ.

Pada data deskriptif ekspresi CD38 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas mendapatkan p value >0.05 dan homogenitas > 0.05 . Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Hasil disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.4 dan tabel 5.3. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok sham dan kelompok perlakuan, serta antar kelompok perlakuan.

5.1.3. Efek Pemberian *Secretome Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia (S-HMSCs) Terhadap Ekspresi p16 pada Jaringan Otak Tikus Model DM Tipe 1

p16 adalah *cyclin-dependen kinase inhibitor*, yang mengontrol transisi sel dari fase G1 ke S sehingga sel kehilangan kapasitasnya untuk berproliferasi karena penghentian siklus sel yang ireversibel. p16 membantu mengontrol fosforilasi Rb pada akhir G1 yang memicu terjadinya sel senescence yang sering ditandai dengan aktivasi respons dari kerusakan DNA secara kronis, keterlibatan berbagai inhibitor *cyclin-dependent kinase* (CDKi), peningkatan sekresi faktor pro-inflamasi dan remodeling jaringan,

induksi gen anti-apoptosis, perubahan tingkat metabolisme, dan stres pada retikulum endoplasma (ER).



Gambar 5.5. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA p16 pada jaringan otak masing-masing kelompok perlakuan.

*Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Tabel 5.4. Uji Mann Whitney ekspresi mRNA p16 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
K	SHAM	0.049*
	P1	0.002*
	P2	0.002*
SHAM	P1	0.179
	P2	0.179
P1	P2	0.309

Uji Mann Whitney : *mean difference significant $P < 0.05$

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs S-HMSCs 500 μ L dan 1000 μ L secara berturut-turut menurunkan ekspresi gen

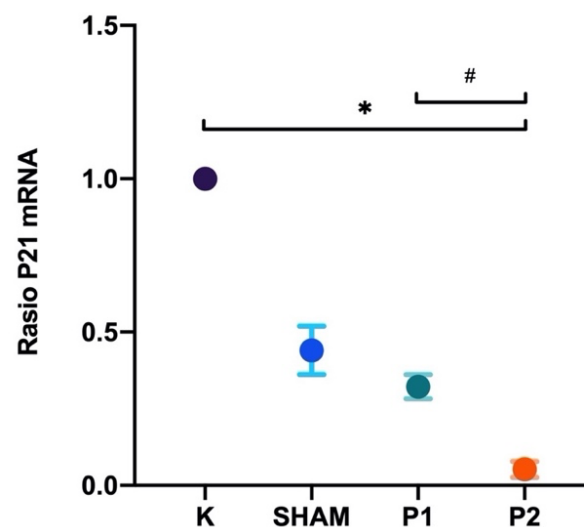
p16 hingga 0,75 dan 0,69 kali lipat lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen p16 dibanding kontrol. Namun, pemberian dosis S-HMSCs tidak menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan kelompok sham. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian S-HMSCs mampu menurunkan ekspresi gen p16 setara dengan kondisi normal tanpa induksi STZ.

Pada data deskriptif ekspresi gen p16 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Hasil uji normalitas salah satu kelompok mendapatkan p value <0.05 dan homogenitas >0.05 . Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal sehingga dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dengan p value <0.05 dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.5 dan tabel 5.4. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok sham dan kelompok perlakuan, tetapi tidak signifikan antar kelompok perlakuan.

5.1.4. Efek Pemberian Secretome Mesenchymal Stem Cell HIPOKSIA (S-HMSCs) Terhadap Ekspresi p21 pada Jaringan Otak Tikus Model DM Tipe 1

p21 adalah target utama aktivitas p53 dan terkait dengan kerusakan DNA dan sebagai CDK *inhibitor* yang menghambat aktivitas CDK-2 dan CDK-4 dibawah regulasi p53, dan menghentikan siklus sel pada fase G_1 .

Peningkata ekspresi p21 terjadi selama stabiliasi p53 yang menyebabkan fase awal terhentinya siklus sel. Sebelum secara permanen dikontrol oleh p16 melalui p38 dan ERK signaling⁵. Induksi STZ terbukti meningkatkan ekspresi gen p21. Pada pemberian S-HMSCs ekspresi gen p21 berkurang tergantung dosis (Gambar 5.6). Hal ini menunjukkan bahwa S-HMSCs mengatur regulasi senescence sel dengan mendownregulasi ekspresi p21.



Gambar 5.6. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA p21 pada jaringan otak masing-masing kelompok perlakuan. *Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Tabel 5.5. Uji Mann Whitney ekspresi mRNA p21 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
K	SHAM	0.002*
	P1	0.002*
	P2	0.002*
SHAM	P1	0.002*
	P2	0.002*
P1	P2	0.002*

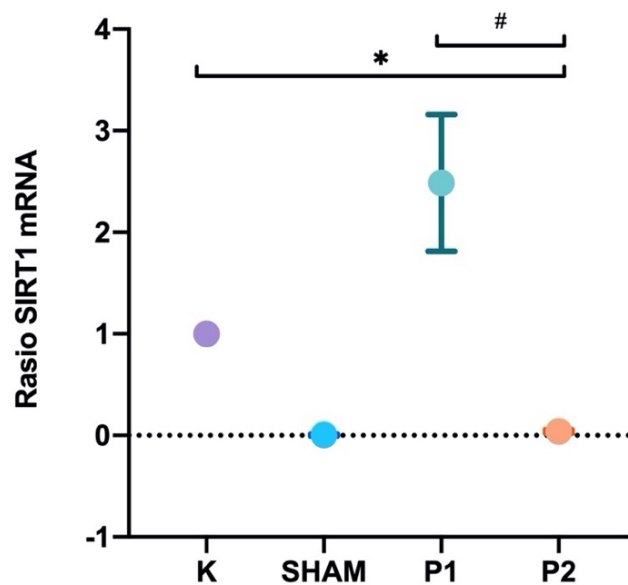
*Uji Mann Whitney : *mean difference significant $P < 0.05$*

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs 500 μ L dan 1000 μ L secara berturut-turut menurunkan ekspresi gen p21 hingga 0,64 dan 0,95 kali lipat lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Kedua perlakuan dosis memberikan perbedaan yang signifikan dalam menurunkan ekspresi gen p21 dibanding kontrol dan kelompok sham. Pada data deskriptif ekspresi gen p21 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Hasil uji normalitas salah satu kelompok mendapatkan p value <0.05 dan homogenitas >0.05 . Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal sehingga dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dengan p value <0.05 dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.6 dan tabel 5.5. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok sham dan kelompok perlakuan.

5.1.5. Efek Pemberian Secretome Mesenchymal Stem Cell HIPOKSIA (S-HMSCs) Terhadap Ekspresi SIRT1 pada Jaringan Otak Tikus Model DM Tipe 1

SIRT1 adalah kelompok *silent information regulator type 1* sebagai komponen penting dalam memodulasi pertumbuhan dendrit, akson, plastisitas neuron, dan fungsi kognitif, serta perlindungan terhadap degenerasi saraf terkait penuaan seluler dan penurunan kognitif yang memainkan peran penting dalam perkembangan penyakit neurodegeneratif, seperti AD dan PD. SIRT1 juga terlibat dalam penuaan dan umur melalui

peningkatan *Brain-specific Sirt1-overexpressing* (BRASTO) spesifik otak yang menjadi penanda peningkatan rentang hidup pada tikus. SIRT1 memainkan peran aktif dalam pertahanan seluler terhadap stres oksidatif dan fungsinya dipengaruhi oleh keberadaan ROS melalui modifikasi pasca-translasi serta menginduksi *endogenous anti-oxidant system* melalui faktor transkripsi FOXO^{8,45,46}.



Gambar 5.7. Hasil RT-PCR menunjukkan rasio tingkat ekspresi mRNA SIRT1 pada jaringan otak masing-masing kelompok perlakuan.

*Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sham dan perlakuan ($p < 0.05$) dan # menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Tabel 5.6. Uji Mann Whitney ekspresi mRNA SIRT1 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
K	SHAM	0.002*
	P1	0.002*
	P2	0.002*
SHAM	P1	0.002*
	P2	0.002*
P1	P2	0.002*

Uji Mann Whitney : *mean difference significant $P < 0.05$

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa pemberian S-HMSCs 500 μ L dan 1000 μ L secara berturut-turut meningkatkan ekspresi gen SIRT1 hingga 2,48 dan 0,04 lebih tinggi dibandingkan kelompok sham. pemberian S-HMSCs 500 μ L meningkatkan ekspresi 3,48 kali dibanding kontrol tetapi 0,96 kali lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan antar semua kelompok terjadi secara signifikan.

Pada data deskriptif ekspresi gen SIRT1 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Hasil uji normalitas salah satu kelompok mendapatkan p value <0.05 dan homogenitas <0.05 . Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal sehingga dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dengan p value <0.05 dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.7 dan tabel 5.6. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok sham dan kelompok perlakuan.

5.2. Pembahasan

Diabetes adalah salah satu penyakit metabolik yang memiliki pengaruh terhadap terjadinya kondisi neurodegeneratif serta penurunan kinerja dan fungsi kognitif dengan kelainan struktural di otak^{10,81}. Penelitian ini menggunakan Hewan uji tikus jantan galur wistar karena termasuk vertebra mamalia. Hewan uji diinduksi dengan STZ dosis 65mg/kgBB intraperitoneal dan dilakukan validasi pada hari ke-2, 5, dan 7 dengan

mengukur kadar gula darah, kriteria inklusi tercapai dengan kadar gula darah 200 mg/dl. Bahan aktif streptozotocin yang diinjeksikan akan menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel beta pankreas yang berimplikasi pada penurunan akumulasi sel beta yang akan menyebabkan terjadinya kondisi hiperglikemik⁸². Penggunaan STZ ini memimik mekanisme DM tipe 1 pada manusia dimana terjadi proses *autoimmunity* yakni sel beta pankreas mengekspresikan glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody (GAD65A), insulin autoantibody (IAA), islet cell autoantibody (ICA), zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A). Autoantigen ini merilis epitop-epitop yang kemudian ditangkap oleh antigen presenting cell (AgPC) seperti makrofag dan sel dendritik. Sel-sel AgPC ini kemudian merilis immunogenic signal, molekul adhesi dan IL12 yang akan mengaktifasi Th1. Th1 yang teraktifasi akan merilis IL-2, IFN γ , dan TNF β yang akan mengaktifasi autoreaktif CD8⁺ dan makrofag yang akan merilis perforin dan granzym serta cytokine pro inflamasi yang akan menghancurkan beta sel dan menyebabkan terjadinya hiperglikemia.

Kondisi patologis ini selanjutnya memicu kerusakan oksidatif mitokondria, yang dapat mengakibatkan apoptosis dan/atau nekrosis yang diinduksi oleh stres oksidatif yang berimplikasi pada penghambatan neurogenesis⁸³. Lebih lanjut, hiperglikemia pada diabetes juga memicu disfungsi saraf yang berkaitan dengan aktivasi NF-kB sebagai faktor transkripsi ekspresi sitokin pro-inflamasi. Selain itu, jalur NF-kB juga terlibat sebagai sistem molekuler kunci pada peradangan otak patologis termasuk

apoptosis neuron⁸⁴⁻⁸⁶. Kondisi ini peningkatan reaktif oksigen nitrogen spesies (RONS) yang dihasilkan akan merusak mtDNA atau bersinergi dengan modifikasi enzim telomerase reverse transcriptase (TERT) dan aktivitas jalur p53 dan Ras yang memicu terjadinya upregulasi senescence sel yang ditandai dengan meningkatnya ekspresi p16 dan p21 dan berimplikasi pada tingginya SASP seperti IL-1, TNF α , IL-6 serta faktor inflamasi lain sehingga situasi tersebut akan mengupregulasi ekspresi CD38 sebagai pendegradasi koenzym NAD⁺ yang akan memicu penurunan SIRT1^{3,38,41}. Penelitian terkini membuktikan bahwa *Mesenchymal Stem Cell* dengan prekondisi hipoksia mensekresikan beragam sitokin anti-inflamasi serta *growth factor* seperti IL-10, VEGF, PDGF, HGF, dan FGF^{64,66,74}. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi dosis S-HMSCs dalam bentuk injeksi terhadap ekspresi CD38, p16, p21 dan SIRT1 yang berperan pada kondisi neurodegenatif tikus model diabetes. Penelitian ini melakukan pengukuran ekspresi CD38 yakni *surface marker* yang juga terlibat dengan begitu banyak kondisi fisiologis maupun patologis, selain itu CD38 adalah pendegradasi utama *Nikotinamide Adenin Dinukleotida* (NAD⁺) yang terlibat pada hampir 400 reaksi di dalam jaringan mamalia^{26,87}. Pada penelitian sebelumnya diungkapkan bahwa TNF- α dan IL-6 adalah penginduksi kuat peningkatan ekspresi CD38⁸⁸⁻⁹¹.

Pada penelitian ini didapatkan bahwa terdapat penurunan ekspresi CD38 secara signifikan pada perlakuan dosis S-HMSCs 500 μ L dan 1000 μ L dibanding kontrol. *Soluble molecule* yang terkandung dalam *secretome* S-

HMSCs seperti IL-10 dan TGF- β akan menekan SASP yang disekresikan oleh *senescence* sel melalui penghambatan faktor transkripsi NF- κ B⁷⁴. Lebih lanjut, *anti-inflammatory factor secretome* yang dihasilkan oleh MSCs dengan prekondisi hipoksia ini juga menekan *reaktifokxygen nitrogen spesies* (RONS) akibat kondisi hiperglikemik di otak^{4,66,92}. Penurunan ekspresi CD38 pada penelitian ini juga seiring dengan penurunan akumulasi sel *senescence* di otak yang digambarkan dengan penurunan ekspresi gen p16 dan p21⁴¹.

Ekspresi p16 dan p21 yang berkorelasi dengan peningkatan *senescence* sel ini menginduksi NADase CD38 melalui SASP yang disekresikan seperti TNF- α dan IL-6 melalui aktivasi NF- κ B⁶. Pada penelitian ini pemberian S-HMSCs secara signifikan dan tergantung dosis dalam menurunkan ekspresi gen p16 dan p21. Pada pemberian dosis S-HMSCs 500 μ L dapat menurunkan ekspresi gen p16 sebagai *cyclin-dependent kinase inhibitor*, yang mengontrol transisi sel dari fase G1 ke S sehingga sel kehilangan kapasitasnya untuk berproliferasi, karena penghentian siklus sel yang ireversibel lebih besar dibanding dosis 1000 μ L dan secara signifikan terhadap kelompok kontrol. Selanjutnya, pada pemberian dosis S-HMSCs 1000 μ L dapat menurunkan ekspresi gen p21 sebagai target utama aktivitas p53 dan terkait dengan kerusakan DNA lebih besar dari dosis 500 μ L dan secara signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian S-HMSCs dapat menurunkan akumulasi *senescence* sel melalui downregulasi gen p16 and p21. Hal ini membuktikan bahwa *secretome* S-HMSCs memiliki potensi untuk menjadi agen *senolytic*

dengan cara menekan SASP melalui supresi jalur NF- κ B sehingga mencegah terjadinya peningkatan ekspresi CD38 serta menghambat terbentuknya sel *senescence* baru yang terkait seperti sel *senescence* yang diinduksi ROS, disfungsi mitokondria, kerusakan DNA serta sel *senescence* parakrin dari SASP.

Pada penelitian ini terjadi fenomena menarik yakni peningkatan ekspresi gen SIRT1 pada dosis S-HMSCs 500 μ L secara signifikan dibanding sham dan dosis 1000 μ L, selain itu peningkatan ekspresi gen SIRT1 juga terjadi pada kelompok kontrol. Meski mekanisme SIRT1 hingga saat ini belum sepenuhnya jelas, penelitian terdahulu mengungkapkan fungsi SIRT1 memainkan peran aktif dalam pertahanan seluler terhadap stres oksidatif dan fungsinya dipengaruhi oleh keberadaan ROS melalui modifikasi pasca-translasi dan menginduksi *endogenous anti-oxidant system* melalui factor transkripsi FOXO⁹³. Lebih lanjut, SIRT1 mempromosikan pemanjangan telomer melalui penghambatan *telomere reverse transkriptase* (TERT) dimediasi oleh aktivasi c-Myc sehingga menghambat terbentuknya *senescence* sel⁹⁴. Seiring waktu, terjadi downregulasi SIRT1 pada kondisi lingkungan inflamasi. Terjadinya peningkatan ekspresi SIRT1 pada dosis S-HMSCs 500 μ L berdasarkan hasil penelitian ini disebabkan oleh penurunan ekspresi CD38 dan sel *senescence*. Berdasarkan penelitian terdahulu penghambatan ekspresi CD38 memperbaiki mitokondria oksidatif stress melalui restorasi NAD⁺/NADH rasio, hal ini akan mengupregulasi ekspresi SIRT1 sebagai gen yang teraktivasi oleh NAD⁺. Sebaliknya, pada dosis S-

HMSCs 1000 μ L tidak terdapat peningkatan ekspresi SIRT yang signifikan adalah fenomena menarik yang bisa dieksplorasi lebih lanjut pada penelitian selanjutnya.

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelemahan Penelitian ini adalah tidak dilakukannya pemeriksaan fungsi kognitif untuk mengonfirmasi efek yang ditimbulkan dari kondisi neurodegeneratif seperti pemeriksaan *Morris Water Maze test*. Hal tersebut tidak dilakukan karena keterbatasan alat pemeriksaan. Selain itu juga tidak dilakukan pemeriksaan ekspresi NAD⁺ sebagai koenzym yang akan tereduksi akibat peningkatan CD38 serta tidak mengamati aktivitas molekuler sel neuron secara *in vivo* karena keterbatasan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian S-HMSCs dosis 500 μ L dan 1000 μ L berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi CD38 pada jaringan otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ.
2. Terdapat penurunan ekspresi gen p16 pada jaringan otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ lebih banyak pada dosis 1000 μ L dibandingkan 500 μ L.
3. Terdapat penurunan ekspresi gen p21 pada jaringan otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ lebih banyak pada dosis 1000 μ L dibandingkan 500 μ L.
4. Terdapat peningkatan ekspresi gen SIRT1 pada jaringan otak tikus model DM tipe 1 yang diinduksi STZ pada dosis 500 μ L dan kontrol dibandingkan dosis 1000 μ L dan sham.

6.2. Saran

Berdasarkan keterbatasan penelitian yang telah dijelaskan diatas kami menyarankan :

1. Perlu dilakukan pemeriksaan fungsi kognitif pada penelitian selanjutnya terkait fungsi degeneratif untuk menyambung benang merah pada penelitian ini.

2. Perlu dilakukan pengamatan kadar koenzym NAD⁺ dan aktivasi jalur NF-kB sebelum dan setelah pemberian S-HMSCs.
3. Perlu dilakukan analisis proteomik menyeluruh terhadap kandungan S-HMSCs untuk mengetahui secara presisi kandungan secretome dan dosis yang akan digunakan pada penelitian selanjutnya untuk melakukan eksplorasi lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yi SS, Hwang IK, Kim DW, et al. The chronological characteristics of SOD1 activity and inflammatory response in the hippocampi of STZ-induced type 1 diabetic rats. *Neurochem Res*. 2011;36(1):117-128. doi:10.1007/s11064-010-0280-6
2. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;9(a028035):1-22.
3. Guerreiro S, Privat A laire, Bressac L, Toulorge D. CD38 in Neurodegeneration and Neuroinflammation. Published online 2020.
4. Liyanagamage DSNK, Martinus RD. Role of Mitochondrial Stress Protein HSP60 in Diabetes-Induced Neuroinflammation. *Mediators Inflamm*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/8073516
5. Baker DJ, Petersen RC. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: Evidence and perspectives. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(4):1208-1216. doi:10.1172/JCI95145
6. Chini C, Hogan KA, Warner GM, et al. The NADase CD38 is induced by factors secreted from senescent cells providing a potential link between senescence and age-related cellular NAD⁺ decline. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;513(2):486-493. doi:10.1016/J.BBRC.2019.03.199
7. Wang LF, Cao Q, Wen K, et al. CD38 Deficiency Alleviates D-Galactose-Induced Myocardial Cell Senescence Through NAD⁺/Sirt1 Signaling Pathway. *Front Physiol*. 2019;10. doi:10.3389/FPHYS.2019.01125
8. Ng F, Wijaya L, Tang BL. SIRT1 in the brain — connections with aging-associated disorders and lifespan. 2015;9(March):1-13. doi:10.3389/fncel.2015.00064
9. Herskovits AZ, Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Nature Publishing Group*. 2013;23(6):746-758. doi:10.1038/cr.2013.70
10. Toth C. *Diabetes and Neurodegeneration in the Brain*. Vol 126. 1st ed. Elsevier B.V.; 2014. doi:10.1016/B978-0-444-53480-4.00035-7
11. Klimek P, Kautzky-Willer A, Chmiel A, Schiller-Frühwirth I, Thurner S. Quantification of Diabetes Comorbidity Risks across Life Using Nation-Wide Big Claims Data. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(4). doi:10.1371/journal.pcbi.1004125
12. Sima AAF. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol*. 2010;47(4):279-293. doi:10.1007/S00592-010-0218-0
13. Mijnhout GS, Scheltens P, Diamant M, et al. Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition [1]. *Diabetologia*. 2006;49(6):1447-1448. doi:10.1007/s00125-006-0221-8

14. Overcoming gaps in the treatment of neurodegenerative disease. *EBioMedicine*. 2020;60. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103088
15. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: Insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2013;1834(11):2380-2384. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.032
16. Zilka N, Zilkova M, Kazmerova Z, Sarissky M, Cigankova V, Novak M. Mesenchymal stem cells rescue the Alzheimer's disease cell model from cell death induced by misfolded truncated tau. *Neuroscience*. 2011;193:330-337. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.06.088
17. Xia J, Minamino S, Kuwabara K, Arai S. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *Biosci Trends*. 2019;13(4):299-307. doi:10.5582/bst.2019.01226
18. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(6). doi:10.1152/AJPLUNG.2001.280.6.L1196
19. Beretta M, Gualtierotti R, Ingegnoli F, Levi V. Running title: Inhibition of microglial activation by ADSCs through S1P down-regulation. *Stem Cells Dev*. 2016;25(14):1-41.
20. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia [version 3 ; peer review : 1 approved , 1 approved with reservations]. Published online 2021:1-18.
21. Kessler B, Rinchai D, Kewcharoenwong C, et al. Interleukin 10 inhibits pro-inflammatory cytokine responses and killing of *Burkholderia pseudomallei*. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7(1):1-11. doi:10.1038/srep42791
22. Luarte A, Bátiz LF, Wyneken U, Lafourcade C. Potential Therapies by Stem Cell-Derived Exosomes in CNS Diseases: Focusing on the Neurogenic Niche. *Stem Cells Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/5736059
23. Staff NP, Jones DT, Singer W. Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(5):892-905. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.001
24. Blanc K le, Rasmusson I, Go C. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes. 2004;25:307-315.
25. Usselman CWNSSJRB. The Pharmacology of CD38/NADase: An emerging target for cancer and aging diseases. *Physiol Behav*. 2017;176(3):139-148. doi:10.1016/j.tips.2018.02.001.The
26. Morandi F, Airoidi I, Marimpietri D, Bracci C, Faini AC, Gramignoli R. CD38, a Receptor with Multifunctional Activities: From Modulatory Functions on Regulatory Cell Subsets and Extracellular Vesicles, to a Target for Therapeutic Strategies. *Cells*. 2019;8(12). doi:10.3390/cells8121527

27. Konen JM, Fradette JJ, Gibbons DL. The Good, the Bad and the Unknown of CD38 in the Metabolic Microenvironment and Immune Cell Functionality of Solid Tumors. *Cells*. 2019;9(1). doi:10.3390/cells9010052
28. Tominaga K. The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*. 2015;5(1):27743. doi:10.3402/pba.v5.27743
29. Castillo X, Castro-Obregón S, Gutiérrez-Becker B, et al. Re-thinking the etiological framework of neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2019;13(JUL):1-25. doi:10.3389/fnins.2019.00728
30. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001
31. Chandeck C, Mooi WJ. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv Anat Pathol*. 2010;17(1):42-48. doi:10.1097/PAP.0B013E3181C66F4E
32. Aribi M. Autoimmunity and Immunotherapy of Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Published online November 25, 2011. doi:10.5772/20674
33. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'arca D. Review Article ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. Published online 2016. doi:10.1155/2016/3565127
34. Guillon J, Petit C, Toutain B, Guette C, Lelièvre E, Coqueret O. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle*. 2019;18(19):2385-2397. doi:10.1080/15384101.2019.1652047
35. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab*. 2016;23(2):303. doi:10.1016/J.CMET.2015.11.011
36. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978-990. doi:10.1038/ncb2784
37. Palmer AK, Gustafson B, Kirkland JL, Smith U. Cellular senescence : at the nexus between ageing and diabetes. Published online 2019.
38. Covarrubias AJ, Kale A, Perrone R, et al. Senescent cells promote tissue NAD⁺ decline during ageing via the activation of CD38⁺ macrophages. *Nat Metab*. 2020;2(11):1265-1283. doi:10.1038/s42255-020-00305-3
39. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010;5:99-118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144
40. Vazquez-Villaseñor I, Garwood CJ, Heath PR, Simpson JE, Ince PG, Wharton SB. Expression of p16 and p21 in the frontal association cortex of ALS/MND

brains suggests neuronal cell cycle dysregulation and astrocyte senescence in early stages of the disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46(2):171-185. doi:10.1111/nan.12559

41. Chinta SJ, Woods G, Rane A, Demaria M, Campisi J, Andersen JK. Cellular senescence and the aging brain. *Exp Gerontol.* 2015;68:3-7. doi:10.1016/J.EXGER.2014.09.018
42. Chini CCS, Peclat TR, Warner GM, et al. CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD⁺ and NMN levels. *Nat Metab.* 2020;2(November). doi:10.1038/s42255-020-00298-z
43. Xu J, Jackson CW, Khoury N, Escobar I, Perez-pinzon MA. Brain SIRT1 Mediates Metabolic Homeostasis and Neuroprotection. 2018;9(November):1-16. doi:10.3389/fendo.2018.00702
44. Singh P, Hanson PS, Morris CM. SIRT1 ameliorates oxidative stress induced neural cell death and is down - regulated in Parkinson ' s disease. *BMC Neurosci.* Published online 2017:1-13. doi:10.1186/s12868-017-0364-1
45. Herskovits AZ, Guarente L. Review SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence. *Neuron.* 2014;81(3):471-483. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.028
46. Jiao F, Gong Z. Review Article The Beneficial Roles of SIRT1 in Neuroinflammation- Related Diseases. 2020;2020.
47. Kerner W. Definition , Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. Published online 2014:384-386.
48. Idris H, Hasyim H, Utama F. Analysis of Diabetes Mellitus Determinants in Indonesia : A Study from the Indonesian Basic Health Research 2013. 2013;49(4):291-298.
49. Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KMV, et al. Projection of Diabetes Burden Through 2050 Impact of changing demography and disease prevalence in the U.S.
50. Manschot SM, Biessels GJ, Rutten GEHM, Kessels RCP, Gispen WH, Kappelle LJ. Peripheral and central neurologic complications in type 2 diabetes mellitus: No association in individual patients. *J Neurol Sci.* 2008;264(1-2):157-162. doi:10.1016/j.jns.2007.08.011
51. Rajamani U. Causes of Neurodegeneration in Diabetes : Possible Culprits and Therapeutic Targets Brain Disorders & Therapy. 2014;3(4). doi:10.4172/2168-975X.1000130
52. Checkoway H, Lundin JI, Kelada SN. Neurodegenerative diseases. *IARC Sci Publ.* 2011;(163):407-419. doi:10.1071/rdv24n1ab251
53. Brands AMA, Biessels GJ, De Haan EHF, Kappelle LJ, Kessels RPC. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2005;28(3):726-735. doi:10.2337/DIACARE.28.3.726

54. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 2013;36(10):587-597. doi:10.1016/j.tins.2013.07.001
55. Coker LH, Shumaker SA. Type 2 diabetes mellitus and cognition: an understudied issue in women's health. *J Psychosom Res.* 2003;54(2):129-139. doi:10.1016/S0022-3999(02)00523-8
56. Kalmijn S, Feskens EJM, Launer LJ, Stijnen T, Kromhout D. Glucose intolerance, hyperinsulinaemia and cognitive function in a general population of elderly men. *Diabetologia.* 1995;38(9):1096-1102. doi:10.1007/BF00402181
57. Gregg EW, Yaffe K, Cauley JA, et al. Is diabetes associated with cognitive impairment and cognitive decline among older women? Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med.* 2000;160(2):174-180. doi:10.1001/ARCHINTE.160.2.174
58. Gold SM, Dziobek I, Sweat V, et al. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50(4):711-719. doi:10.1007/S00125-007-0602-7
59. Schmidt R, Launer LJ, Pajak A, et al. Magnetic Resonance Imaging of the Brain in Diabetes. :6-11.
60. Kamada H, Yu F, Nito C, Chan PH. Influence of Hyperglycemia on Oxidative Stress and Matrix Metalloproteinase-9 Activation After Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats Relation to Blood-Brain Barrier Dysfunction. Published online 2007. doi:10.1161/01.STR.0000258041.75739.cb
61. Pugazhenth S, Qin L, Reddy PH. Biochimica et Biophysica Acta Common neurodegenerative pathways in obesity , diabetes , and Alzheimer ' s disease ☆. *BBA - Molecular Basis of Disease.* 2017;1863(5):1037-1045. doi:10.1016/j.bbadis.2016.04.017
62. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, et al. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells.* 2019;12(2):218. doi:10.15283/IJSC18034
63. Scott S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Quality. *Bio-Techne.* Published online 2015:5-6.
64. dr Agung Putra CH, Si Med M, Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina.* 2019;38(3):164-171. doi:10.18051/UNIVMED.2019.V38.164-171
65. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol.* 2019;10(JUN). doi:10.3389/FIMMU.2019.01191
66. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, 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(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049
67. 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). doi:10.1186/S12967-014-0260-8
 68. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019;8(5):467. doi:10.3390/CELLS8050467
 69. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552. doi:10.4252/WJSC.V6.I5.552
 70. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol*. 2013;6(6):1-3. doi:10.4161/cib.26631
 71. Xiong LL, Li Y, Shang FF, et al. Chondroitinase administration and pcDNA3.1-BDNF-BMSC transplantation promote motor functional recovery associated with NGF expression in spinal cord-transected rat. *Spinal Cord*. 2016;54(12):1088-1095. doi:10.1038/SC.2016.55
 72. Vishnubhatla I, Corteling R, Stevanato L, Hicks C, Sinden J. The Development of Stem Cell-Derived Exosomes as a Cell-Free Regenerative Medicine. *J Circ Biomark*. 2014;3(1). doi:10.33393/JCB.2014.2043
 73. Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J, von Zglinicki T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mech Ageing Dev*. 2018;170:30-36. doi:10.1016/J.MAD.2017.08.005
 74. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Research* 2021 10:228. 2021;10:228. doi:10.12688/f1000research.51191.3
 75. Cantó C, Auwerx J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: All you need is NAD⁺? *Pharmacol Rev*. 2012;64(1):166-187. doi:10.1124/pr.110.003905
 76. Vingtdeux V, Giliberto L, Zhao H, et al. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(12):9100-9113. doi:10.1074/JBC.M109.060061/ATTACHMENT/E99F48DC-5392-4D45-907D-619B7290459A/MMC1.PDF
 77. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2007;26(13):3169-3179. doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7601758
 78. Qin W, Yang T, Ho L, et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(31):21745-21754.

doi:10.1074/JBC.M602909200/ATTACHMENT/55F24936-0C5A-4B75-81A4-8D1FE257A007/MMC1.ZIP

79. Jing YH, Chen KH, Kuo PC, Pao CC, Chen JK. Neurodegeneration in streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinology*. 2013;98(2):116-127. doi:10.1159/000350435
80. Aksoy P, White TA, Thompson M, Chini EN. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(4):1386-1392. doi:10.1016/J.BBRC.2006.05.042
81. Moheet A, Mangia S, Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1353(1):60-71. doi:10.1111/NYAS.12807
82. Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015;8:181. doi:10.2147/DMSO.S82272
83. Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/102158
84. Mattson MP, Camandola S. NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001;107(3):247-254. doi:10.1172/JCI11916
85. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Diabetic Neuropathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959(1):368-383. doi:10.1111/J.1749-6632.2002.TB02108.X
86. Alvarez-Nölting R, Arnal E, Barcia JM, Miranda M, Romero FJ. Protection by DHA of Early Hippocampal Changes in Diabetes: Possible Role of CREB and NF- κ B. *Neurochemical Research* 2011 37:1. 2011;37(1):105-115. doi:10.1007/S11064-011-0588-X
87. Hogan KA, Chini CCS, Chini EN. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1-12. doi:10.3389/fimmu.2019.01187
88. Guedes AGP, Jude JA, Paulin J, Kita H, Lund FE, Kannan MS. Role of CD38 in TNF- α -induced airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(2). doi:10.1152/AJPLUNG.00367.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH50020851010006.JPEG
89. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*. 2008;88(3):841-886. doi:10.1152/PHYSREV.00035.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0030824760011.JPEG
90. Barata H, Thompson M, Zielinska W, et al. The Role of Cyclic-ADP-Ribose-Signaling Pathway in Oxytocin-Induced Ca²⁺ Transients in Human Myometrium Cells. *Endocrinology*. 2004;145(2):881-889. doi:10.1210/EN.2003-0774

91. Lee CU, Song EK, Yoo CH, Kwak YK, Han MK. Lipopolysaccharide induces CD38 expression and solubilization in J774 macrophage cells. *Molecules and Cells* 2012 34:6. 2012;34(6):573-576. doi:10.1007/S10059-012-0263-3
92. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-412. doi:10.2337/DIAB.40.4.405
93. Ministrini S, Puspitasari YM, Beer G, Liberale L, Montecucco F, Camici GG. Sirtuin 1 in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Aging. *Front Physiol*. 2021;12:1589. doi:10.3389/FPHYS.2021.733696/BIBTEX
94. de Bonis ML, Ortega S, Blasco MA. SIRT1 is necessary for proficient telomere elongation and genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2(5):690-706. doi:10.1016/J.STEMCR.2014.03.002