

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*
CELL TERHADAP KADAR INSULIN TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1
(Studi Eksperimental In Vivo Sekretom Mesenchymal *Stem Cell* pada Kultur
Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar)**

Skripsi

Untuk memenuhi persyaratan
Mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun Oleh:

Akhdan Baghaskara R.

30.101.800011

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2021**

SKRIPSI
PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL CELL* TERHADAP
KADAR INSULIN TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1

Yang dipersiapkan dan disusun oleh
Akhdan Baghaskara R.
30101800011

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I


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

Penguji I


dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A

Pembimbing II

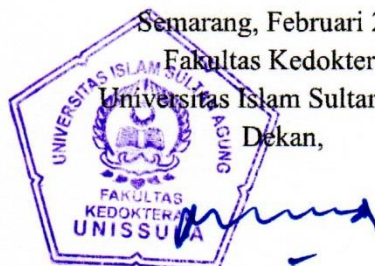

dr. Eko Setiawan Sp.B

Penguji II


dr. Perez Wahyu Purnasari, M.Biomed

Semarang, Februari 2022

Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
Dekan,



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF.

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Akhdan Baghaskara R.

NIM : 30101800011

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul:

**“PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*
CELL TERHADAP KADAR INSULIN TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1
(Studi Eksperimental In Vivo Sekretom Mesenchymal Stem Cell pada Kultur
Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar)”**

Adalah sepenuhnya penelitian yang saya lakukan sendiri tanpa melakukan tindakan plagiasi. Apabila saya terbukti melakukan plagiasi, saya siap menerima sanksi yang berlaku.

Semarang, Februari 2022
Yang menyatakan,



Akhdan Baghaskara R.

PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa dan Nabi Nya, Muhammad Saw. yang senantiasa memberikan bimbingan, kemudahan, dan syafaatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas skripsi sebagai syarat kelulusan dalam studi kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung dengan judul “PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP KADAR INSULIN TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1”

Penulis menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak yang telah memberi bantuan, bimbingan, dorongan, dan petunjuk sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan baik. Ucapan terimakasih penulis diberikan kepada :

1. Kedua orang tua saya tercinta Ibunda Sri Murtiningsih dan Ayahanda Rahmat Santosa, kakak saya Atsmarina Widyadari dan adik saya Amelia Dzakiyah R. yang telah memberikan dukungan sehingga Skripsi ini selesai.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si, Med dan dr. Eko Setiawan Sp.B, selaku dosen pembimbing I dan II yang telah berkenan membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Seluruh staff Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah membantusetiap

kesulitan dalam penulisan.

5. Terimakasih kepada sahabat-sahabat tersayang seperti Setiawan Fritz Gerald, Anisa Dwi Tyastuti, Anggita Sabila F., Aulia Adzumar Adzra, IntanPermatasari, M.Ikhlususl Amal, M. Afif Alwan, Farid Hilmi T., Hifni Azizdkk. yang telah menjadi *support system*, dan semangat saya dalam menyelesaikan tugas ini, terimakasih juga kepada semua sahabat dan teman-teman saya yang akan terlalu banyak jika disebutkan satu per satu.
6. Terimakasih kepada semua pihak yang telah ikut membantu saya atas terselesainya Skripsi ini.

Semoga Allah SWT, membalas semua kebaikan serta bantuan yang telah diberikan. Penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Semarang, Februari 2022

Akhdan Baghaskara R.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
INTISARI	xvi
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	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Diabetes Mellitus	6
2.1.1. Definisi.....	6
2.1.2. Klasifikasi	6
2.2. Diabetes Tipe 1	9
2.2.1. Definisi.....	9
2.2.2. Etiologi.....	9
2.2.3. Patofisiologi	10
2.3. Diabetes Tipe 2	11
2.3.1. Definisi.....	11

2.3.2.	Etiologi.....	11
2.3.3.	Patofisiologi.....	12
2.4.	Diabetes Gestasional.....	13
2.4.1.	Definisi.....	13
2.4.2.	Etiologi.....	13
2.4.3.	Patofisiologi.....	14
2.5.	Diabetes Jenis Lain.....	14
2.5.1.	Definisi.....	14
2.5.2.	Etiologi.....	15
2.6.	Diagnosis Diabetes Mellitus	15
2.6.1.	A1C	15
2.6.2.	Glukosa Plasma Puasa/ <i>fasting plasma glucose</i> (FPG)	16
2.6.3.	Tes Toleransi Glukosa Oral / Oral Glucose Tolerance Test (OGTT).....	16
2.6.4.	Gula Darah Sewaktu (GDS).....	16
2.7.	Insulin.....	17
2.7.1.	Definisi.....	17
2.7.2.	Struktur	17
2.7.3.	Sintesis	18
2.8.	Fisiologi Pengaturan Glukosa Darah.....	19
2.9.	Faktor yang Mempengaruhi Kadar Insulin	21
2.10.	Streptozotocin	21
2.11.	Mesenchymal <i>Stem Cell</i>	22
2.11.1.	Definisi.....	22
2.11.2.	Fungsi.....	23
2.11.3.	Sumber	24
2.11.4.	Karakteristik	25
2.12.	Sekretom.....	26
2.12.1.	Definisi.....	26
2.12.2.	Komposisi	26
2.13.	Modifikasi Pendorong Sekret Mesenchymal <i>Stem Cell</i>	27

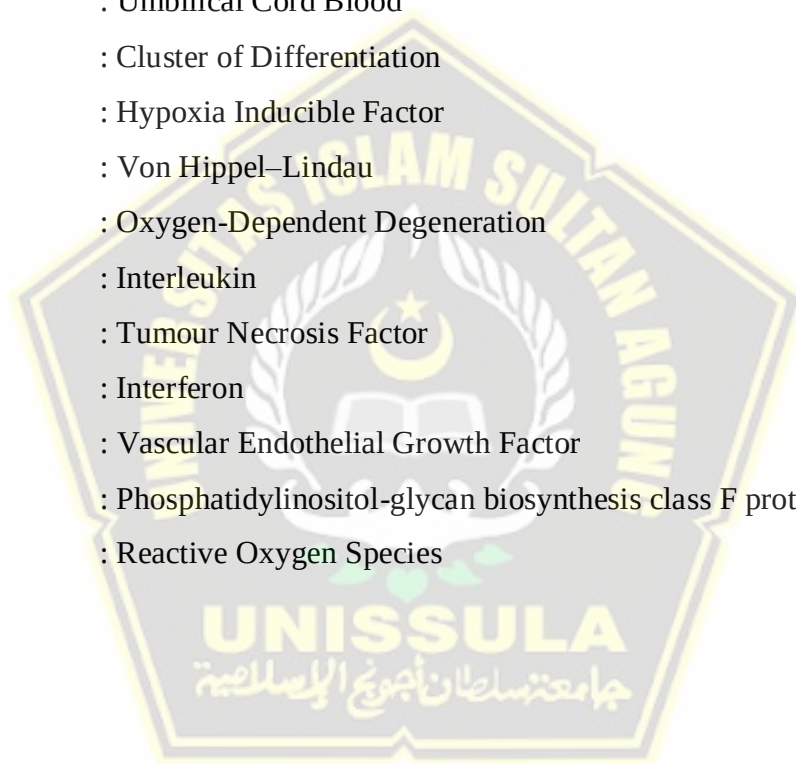
2.14.	Hipoksia.....	27
2.14.1.	Definisi.....	27
2.14.2.	Mekanisme Fisiologi Selular	27
2.15.	Hubungan Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell Terhadap Kadar Insulin Pada Kerusakan Islet.....	29
2.16.	Kerangka Teori	30
2.17.	Kerangka Konsep.....	31
2.18.	Hipotesis.....	32
BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	33
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	33
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional.....	33
3.2.1.	Variabel Penelitian	33
3.2.2.	Definisi Operasional	34
3.3.	Populasi dan Sampel Penelitian	34
3.3.1.	Populasi.....	34
3.3.2.	Sampel Penelitian.....	35
3.3.3.	Besar Sampel	35
3.4.	Instrumen dan Bahan.....	36
3.4.1.	Instrumen	36
3.4.2.	Bahan	36
3.5.	Prosedur dan Teknik Penelitian	37
3.5.1.	Teknik Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord Tikus.....	37
3.5.2.	Proses Persiapan Passage	38
3.5.3.	Proses Passage Sel.....	38
3.5.4.	Proses Validasi Sel	39
3.5.5.	Proses Pemanenan Sel.....	40
3.5.6.	Proses Penghitungan Sel.....	40
3.5.7.	Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom	41
3.5.8.	Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1	42
3.5.9.	Perlakuan pada Hewan Coba	44

3.5.10. Analisis Kadar Insulin Menggunakan ELISA.....	44
3.6. Tempat dan Waktu Penelitian.....	47
3.6.1. Tempat Penelitian.....	47
3.6.2. Waktu Penelitian	47
3.7. Analisis Data	48
3.8. Alur Penelitian	49
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	50
4.1. Hasil Penelitian	50
4.1.1. Kadar Gula Darah Tikus.....	50
4.1.2. Histopatologi Pankreas Tikus.....	51
4.1.3. Morfologi <i>Stem Cell</i>	52
4.1.4. Uji diferensiasi adipogneik	53
4.1.5. Uji diferensiasi osteogenik	54
4.1.6. Uji flowcytometry terhadap marker MSC	55
4.1.7. Insulin	56
4.2. Pembahasan.....	62
4.2.1. Beda penelitian terdahulu	71
4.2.2. Keterbatasan Penelitian.....	72
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	73
5.1. Kesimpulan	73
5.2. Saran	73
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN	86

DAFTAR SINGKATAN

DM	: Diabetes Mellitus
DMT1	: Diabetes Mellitus Tipe 1
DMT2	: Diabetes Mellitus Tipe 2
GDM	: Gestational Diabetes Mellitus
MSC	: Mesenchymal Stemcell
STZ	: Streptozotocin
MODY	: Maturity-Onset Diabetes of The Young
ADA	: American Diabetes Association
HNF-1a	: Hepatocyte Nuclear Factor-1a
ZAC	: Zinc Finger Protein Regulating Apoptosis and Cycle Arrest
HYMAI	: Hydatiform Mole Associated and Imprinted Transcript
KCNJ11	: Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11
GAD	: Glutamic Acid Decarboxylase
HLA	: Human Leukocyte Antigen
CTLA-4	: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeats
FoxP3	: Forkhead box P3
PTPN22	: Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22
AIRE	: Autoimmune Regulator
STAT3	: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
HIP14	: Huntingtin-Interacting Protein 14
ERBB3	: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3
IFIH1	: Interferon Induced With Helicase C Domain 1
IAA	: Insulin Autoantibodies
IA2	: Islet Antigen 2
FPG	: Fasting Plasma Glucose
OGTT	: Oral Glucose Tolerance Test
GDS	: Gula Darah Sewaktu
SRP	: Signal Recognition Protein

ER	: Endoplasmic Reticulum
RER	: Roush Endoplasmic Reticulum
TGN	: Trans-Golgi Network
ATP	: Adenosine Triphosphate
EZH2	: Enhancer Zeste Homolog 2
NK	: Natural Killer
AMP	: Antimicrobial Peptide
BM	: Bone Marrow
AT	: Adepocyte Tissue
UCB	: Umbilical Cord Blood
CD	: Cluster of Differentiation
HIF	: Hypoxia Inducible Factor
VHL	: Von Hippel–Lindau
ODD	: Oxygen-Dependent Degeneration
IL	: Interleukin
TNF	: Tumour Necrosis Factor
IFN	: Interferon
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
PIGF	: Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein
ROS	: Reactive Oxygen Species



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Nilai A1C	15
Tabel 2.2. Nilai Glukosa Plasma Puasa	16
Tabel 2.3. Nilai Toleransi Glukosa Oral	16
Tabel 3.1. Definifi Operasional	34
Tabel 4.1. Kadar Gula Darah Tikus	51
Tabel 4.2. Deskripsi Kadar Insulin Tiap Minggu.....	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Kerangka Teori.....	31
Gambar 2.2.	Kerangka Konsep	31
Gambar 3.1.	Skema rancangan penelitian penelitian post-test only group	33
Gambar 4.1.	Perbandingan pankreas kelompok sham/sehat (A) dengan pankreas kelompok kontrol (B).	51
Gambar 4.2.	Perbandingan pankreas kelompok P1 (C) dengan pankreas kelompok P2 (D).	52
Gambar 4.3.	Perbandingan jumlah sel islet pada seluruh kelompok.	52
Gambar 4.4.	Uji validasi MSCs dengan bentuk menyerupai fibroblas pada perbesaran mikroskop 200x. Tampak gambaran MSCs yang melekat pada permukaan plastik dengan konfluensi 80%.	53
Gambar 4.5.	Uji validasi MSCs diferensiasi adipogenik: Perbesaran 200x....	54
Gambar 4.6.	Uji validasi MSCs diferensiasi osteogenic; perbesaran 200x....	55
Gambar 4.7.	Deteksi marker CD90.1, CD29, CD45, dan CD31 menggunakan <i>flowcytometry</i>	55
Gambar 4.8.	Kadar Insulin pada kelompok; Sham : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, K : subyek induksi diabetes tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek induksi diabetes yang diberikan perlakuan injeksi IP sekretom <i>Hypoxia</i> -MSC 0,5 cc, P2 : subyek induksi diabetes yang diberi perlakuan injeksi IP sekretom <i>Hypoxia</i> -MSC 1 cc.	57
Gambar 4.9.	Sham di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14	58
Gambar 4.10.	Sham di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21	59
Gambar 4.11.	Kontrol di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14.....	59
Gambar 4.12.	Kontrol di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21.....	60

Gambar 4.13.	Perlakuan 1 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14.....	60
Gambar 4.14.	Perlakuan 1 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21.....	61
Gambar 4.15.	Perlakuan 2 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14.....	61
Gambar 4.16.	Perlakuan 2 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21.....	62
Gambar 4.17.	Mekanisme IL-10 dalam menghentikan proses inflamasi yang ditimbulkan TNF- α dan IFN- γ pada kasus diabetes tipe 1.	69
Gambar 4.18.	Mekanisme regenerasi sel β oleh sekretom	71



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Penelitian.....	86
Lampiran 2. Surat Keterangan Selesai Penelitian	87
Lampiran 3. Surat <i>Ethical Clearance</i>	88
Lampiran 4. Hasil SPSS.....	89
Lampiran 5. Kegiatan Perawatan dan Perlakuan Hewan Coba	97
Lampiran 6. Surat Undangan Ujian Skripsi.....	98



INTISARI

Diabetes tipe 1 adalah kelainan yang ditunjukkan oleh hiperglikemia akibat defisiensi insulin dan ketoasidosis akibat proses auto imun pada islet β -pankreas. Kematian dini akibat penyakit diabetes tipe 1 mencapai 3-18 kali dari angka harapan hidup di masing-masing negara. Mesenchymal *Stem Cell* (MSC) telah diuji dapat meningkatkan jumlah islet beta pankreas melalui penekanan kerusakan inflamasi dan penolakan antigen yang dimediasi kekebalan. Selain itu, MSC yang dikondisikan hipoksia telah terbukti dapat mensekresikan sekretom dengan tingkat yang lebih tinggi. Terapi sekretom MSC hadir sebagai alternatif dari terapi MSC yang memiliki beberapa keunggulan karena dengan tidak adanya sel, maka tidak ada risiko terjadinya penolakan imun. Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan peningkatan kadar insulin tikus model diabetes pada kelompok perlakuan dengan sekretom *Hypoxia-MSC* yang dibandingkan dengan kontrol. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus hingga September 2021 pada *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Universitas Islam Sultan Agung. Penelitian ini dilakukan menggunakan model rancangan “*post test only control group design*” dengan menggunakan 24 hewan coba tikus yang dirandomisasi menjadi 4 kelompok meliputi kelompok : Sham (tanpa perlakuan), kontrol (STZ 65mg/kgBB), P1 (0,5 cc sekretom *Hypoxia-MSC*), P2 (1 cc sekretom *Hypoxia-MSC*). Induksi diabetes menggunakan STZ dilakukan 1 kali pada awal 3 minggu pemeliharaan tikus. Sedangkan pemberian terapi sekretom *Hypoxia-MSC* dilakukan 1 kali setiap awal minggu dan dilakukan pengambilan sampel serum pada setiap akhir minggu, untuk pengukuran kadar insulin menggunakan ELISA selama 3 minggu penelitian setelah induksi diabetes. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan signifikan baik pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 terhadap kelompok kontrol pada minggu ke 1 hingga 3 ($P < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terapi sekretom *Hypoxia-MSC* dapat meningkatkan kadar insulin pada model diabetes tipe 1.

Kata Kunci: MSC, Hipoksia, Sekretom *Hypoxia-MSC*, Insulin.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Mellitus dalam perspektif medis adalah gangguan kondisi metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai akibat dari insufisiensi insulin parsial atau total (Egan, 2018). Diabetes mellitus diklasifikasikan menjadi tipe 1, tipe 2, dan gestasional (Husein et al., 2016). Diabetes tipe 1 adalah penyakit yang ditandai oleh hiperglikemia akibat defisiensi insulin dan ketoasidosis karena proses auto imun pada islet β -pankreas (Freeman, 2018; Kahanovitz et al., 2017). Data tahunan dari Amerika Serikat mulai tahun 2001 hingga 2015 menunjukkan sekitar 22,9 kasus diabetes tipe 1 per 100.000 orang penduduk terjadi pada orang-orang di bawah usia 65 tahun (Freeman, 2018). Berdasarkan data Ikatan Dokter Anak Indonesia (IDAI), sebaran data kasus anak DM tipe 1 di Indonesia pada tahun 2000 adalah 0,00388 per 100.000 penduduk, kemudian meningkat pada tahun 2010 menjadi 0,02819 per 100.000 penduduk (Pulungan, 2013). Angka kematian dini akibat penyakit diabetes tipe 1 mencapai 3-18 kali dari angka harapan hidup di masing-masing negara. Penyakit ginjal stadium akhir (ESRD), adalah penyebab utama kematian pada pasien diabetes hingga usia 35 tahun, diikuti penyakit kardiovaskular (CVD) setelah usia 35 tahun (Secrest et al., 2014). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa orang dengan diabetes tipe 1 memiliki risiko lebih tinggi terkena penyakit kardiovaskular seperti infark miokard, gagal

jantung, dan atrial fibrilasi dibandingkan dengan pasien diabetes tipe 2 (Y. Bin Lee et al., 2019).

Terapi ekstrak insulin merupakan kemajuan pengobatan dimana rekayasa analog insulin dapat meningkatkan kontrol diabetes dan mengurangi ataupun menunda dari komplikasi pasien (Quianzon & Cheikh, 2012; Secrest, Washington, & Orchard, 2014). Namun terapi ini masih dianggap kurang optimal terkait masalah frekuensi injeksi, dosis, maupun absorpsi (Aghazadeh & Nostro, 2017). Efek samping lainnya yang ditimbulkan adalah efek penurunan glukosa yang tidak stabil yang menyebabkan hipoglikemia berkepanjangan. Terapi berikutnya yang umum diterapkan adalah transplantasi pankreas. Namun terapi ini memiliki keterbatasan yaitu sedikitnya pendonor dan respon imun yang tidak diharapkan terhadap jaringan asing (Pathak et al., 2019).

Mesenchymal Stem Cell (MSC) adalah sel stromal multipoten yang memiliki kemampuan untuk meregenerasi jaringan yang rusak (Kuntardjo et al., 2019). MSC telah diuji dapat meningkatkan jumlah islet beta pankreas melalui penekanan kerusakan inflamasi dan penolakan antigen yang dimediasi kekebalan (Katuchova et al., 2015). Terapi MSC juga tidak menimbulkan efek samping seperti hipoglikemik pada penggunaannya sebagai terapi alternatif untuk pasien diabetes tipe 1. (Li et al., 2021).

Walaupun sebagian besar penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa transplantasi tunggal MSC aman dan tidak menginduksi respon imun namun, pemberian MSC berulang dapat menghasilkan produksi auto-

antibodi. Selain itu, *fetal bovine serum* (FBS) yang digunakan dalam media kultur MSC dapat menyebabkan respons imun pada beberapa pasien (Musiał-wysocka et al., 2019).

Sekretom adalah sekret MSC berupa faktor trofik, sitokin imunomodulator, kemokin, faktor pertumbuhan, protein, dan vesikel ekstraseluler (Ahangar & Mills, 2020; Eleuteri & Fierabracci, 2019). Kemampuan regeneratif MSC melalui aksi parakrinnya, telah membuka strategi baru terapi bebas sel untuk pengobatan yang bersifat regeneratif (González-González et al., 2020). Penggunaan sekretom sendiri tanpa MSC memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggunaan *Stem Cell*. Sekretom dapat diproduksi, dikemas, dan diangkut dengan lebih mudah, dan karena tidak ada sel, maka tidak ada kekhawatiran terjadinya penolakan imun (D. Edward, Lavar; Secres, 2018).

Studi terbaru yang dilakukan oleh (Waseem et al., 2016) menunjukkan bahwa dalam memperbaiki sel β pankreas yang rusak, sekretom MSC memicu proliferasi dan angiogenesis pada sel β pankreas yang pada awalnya kurang optimal (Waseem et al., 2016). Aktivitas parakrin dari sekretom dapat meregulasi kadar glukosa darah melalui persinyalan molekul anti-inflamasi, anti-apoptosis, dan sitoprotektif (Al-Azzawi et al., 2020).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Ferreira et al., 2018) salah satu strategi untuk meningkatkan potensi MSC sebagai terapi adalah pengkondisian MSC dalam keadaan hipoksia di awal kultur yang menunjukkan peningkatannya dalam efek regeneratif dan *survival* dari sel tersebut. Selain

itu terapi MSC hipoksia, secara histologis dapat meningkatkan regenerasi sel β pankreas lebih signifikan dibandingkan MSC normoksik (tanpa pengondisian awal) setelah ditransplantasikan ke tikus model diabetes (Waseem et al., 2016). Penelitian lebih lanjut, menunjukan bahwa MSC yang dikondisikan hipoksia akan mensekresikan sekretom dengan tingkat yang lebih tinggi (Ferreira et al., 2018).

Penelitian menggunakan sekretom kaitannya dengan diabetes tipe 1 telah dilakukan sebelumnya dimana studi yang dilakukan oleh (Hashemi et al., 2020) pada tikus yang diinduksi diabetes tipe 1 menggunakan STZ dengan terapi menggunakan *Conditioned Media* (sekretom) dosis 0,5 ml melalui injeksi IP 2 kali seminggu dan diambil sampel darahnya untuk pengukuran kadar gula lewat vena ekor, menunjukan penurunan kadar gula secara signifikan dibandingkan kontrol ($P < 0,05$) terjadi setelah minggu ke 4, 5, dan 6 pasca injeksi.

Berdasarkan risiko komplikasi DM tipe 1 dan potensi dari sekretom MSC yang telah disebutkan, maka diperlukan penelitian untuk mengeksplorasi kemampuan sekretom dalam terapi DM tipe 1, dimana kultur MSC hipoksia dilakukan untuk meningkatkan potensi terapi dari sekretom (sekretom *hypoxia-MS*C).

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar insulin tikus model diabetes tipe 1.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh dari sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar insulin pada tikus model diabetes tipe 1.

1.3.2. Tujuan Khusus

Membuktikan peningkatan kadar insulin tikus model diabetes pada kelompok perlakuan dengan sekretom *Hypoxia-MSC* dosis 0,5 cc dan 1 cc yang dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan sekretom *Hypoxia-MSC* terhadap kadar insulin pada tikus model diabetes tipe 1.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi dan acuan bagi pembaca mengenai penelitian secara *in vivo* tentang pengaruh sekretom dari *Hypoxia-MSC* terhadap kadar insulin tikus model diabetes tipe 1.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Definisi

Diabetes Mellitus (DM) adalah suatu penyakit metabolik yang diakibatkan oleh karena disfungsi kerja insulin, destruksi beta pankreas dalam sekresi insulin, ataupun keduanya yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia). Hiperglikemia kronis yang diakibatkan oleh diabetes dikaitkan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ, terutama pembuluh darah, mata, ginjal, jantung, dan saraf. (Diabetes, 2010). DM merupakan penyakit dengan kelainan pengaturan kadar glukosa darah dengan potensi terjadinya hiperglikemia. Penyakit ini diklasifikasikan dalam berbagai sub-tipe seperti *maturity-onset diabetes of the young (MODY)*, diabetes neonatal, diabetes gestasional, diabetes tipe 1, diabetes tipe 2, dan diabetes diinduksi steroid. Namun dari seluruh jenis sub-tipe diabetes, DM tipe 1 dan 2 adalah yang utama (Sapra & Bhandari, 2021).

2.1.2. Klasifikasi

Klasifikasi yang hingga kini paling diterima yaitu klasifikasi menurut *American Diabetes Association* (Care & Suppl, 2021) :

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

MODY 3 (Kromosom 12, HNF-1a), MODY 1 (Kromosom 20, HNF-4a), MODY 2 (Kromosom 7, glukokinase), Bentuk MODY lain yang sangat langka (misalnya, MODY 4: Kromosom 13, faktor promotor insulin-1; MODY 6: Kromosom 2, NeuroD1; MODY 7: Kromosom 9, karboksil ester lipase), Diabetes neonatal transien (paling sering cacat pencetakan ZAC / HYAMI pada 6q24), Diabetes neonatal permanen (paling umum gen KCNJ11 yang mengkode subunit Kir6.2 dari saluran KATP sel- β), DNA mitokondria.

- B. Cacat genetik dalam kerja insulin :

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

C. Penyakit pankreas eksokrin :

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

D. Endokrinopati :

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

E. Diinduksi obat atau bahan kimia :

Vacor, Pentamidin, Asam nikotinat, Glukokortikoid, Hormon tiroid, Diazoksida, b-Agonis adrenergic, Tiazid, Dilantin, γ -Interferon.

F. Infeksi :

Rubella bawaan, Sitomegalovirus, Lainnya.

G. Bentuk diabetes dimediasi kekebalan yang jarang :

Stiff-man syndrome , antibodi reseptor anti-insulin.

H. Sindrom genetik lainnya terkadang berhubungan dengan diabetes:

Sindrom Down, Sindrom Klinefelter, Sindrom Turner, Sindrom Wolfram, Ataksia Friedreich, Huntington chorea, Sindrom Laurence-Moon-Biedl, Distrofi miotonik, Porphyrin, Sindrom Prader-Willi.

2.2. Diabetes Tipe 1

2.2.1. Definisi

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

1. Diabetes dimediasi sistem imun. Wujud dari diabetes ini dulunya disebut juga dengan istilah diabetes onset remaja ataupun diabetes bergantung pada insulin, yang diakibatkan oleh karena kerusakan sel-sel pankreas secara autoimun. Autoantibodi terhadap islet, autoantibodi terhadap insulin, autoantibodi untuk *tyrosine phosphatases IA-2* dan *IA-2b* dan autoantibodi untuk GAD (GAD65) adalah marker dari kelainan imunitas pada diabetes tipe 1.
2. Diabetes idiopatik. Bentuk dari tipe ini adalah diabetes yang tidak diketahui pasti penyebabnya. Beberapa orang dapat mengalami kadar rendah insulin dalam darah yang meningkatkan kerentanannya terhadap ketoasidosis tanpa ditemukannya bukti kelainan kekebalan (autoimunitas) seperti pada diabetes tipe 1. (Association, 2014)

2.2.2. Etiologi

Diabetes tipe 1 biasanya hadir pada individu tanpa riwayat keluarga. Hanya 10-15% pasien yang memiliki kerabat tingkat pertama atau kedua dengan penyakit ini. Risiko seumur hidup untuk

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

Adanya autoantibodi pankreas yang bersirkulasi menunjukkan bahwa individu tersebut berisiko atau telah mengembangkan DMT1. Antibodi ini termasuk (Speight & Pouwer, 2019) : antibodi sitoplasma sel pulau/islet *cell cytoplasmic antibodies* (ICA), antibodi terhadap insulin/insulin *autoantibodies* (IAA), asam glutamat dekarboksilase/*glutamic acid decarboxylase* (GAD65) , insulinoma-associated 2 (IA-2), antibodi protein tirosin fosfatase dan zinc transporter8 (ZnT8).

2.2.3. Patofisiologi

Diabetes Mellitus tipe 1 dihasilkan dari penghancuran sel penghasil insulin di pankreas yang disebut sel beta oleh sistem imun adaptif. Proses ini didorong oleh interaksi yang tidak sepenuhnya dipahami antara genetika dan lingkungan dari seseorang. Faktor genetik yaitu, individu dengan ekspresi berlebih dari *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dari kelas HLA DR4, DQ8, dan DQ2 yang

meningkatkan kerentanannya terdapat pada sekitar 90% pasien DMT1) dan satu atau lebih faktor lingkungan menyebabkan pengenalan komponen sel beta sebagai autoantigen yang salah dikenali oleh sistem kekebalan sebagai benda asing yang mengarah ke serangan autoimun (Giwa et al., 2020).

2.3. Diabetes Tipe 2

2.3.1. Definisi

Diabetes tipe 2 atau juga dikenal sebagai Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2) merupakan penyakit dengan ciri utama penurunan respon jaringan terhadap insulin (resistensi insulin). Dalam kondisi awal diabetes tipe 2, untuk menjaga homeostasis glukosa dalam tubuh, maka penurunan sensitifitas insulin dikompensasi dengan peningkatan produksi insulin. Produksi insulin akan menurun seiring waktu dengan dibarengi penurunan pada efektifitas insulin yang pada akhirnya menjadi diabetes tipe 2. Diabetes tipe 2 memiliki 90% proporsi pada keseluruhan kasus diabetes dan memiliki prevalensi tertinggi pada orang-orang pada usia lebih dari 45 tahun (Koeck et al., 2015).

2.3.2. Etiologi

Dalam faktor risiko Diabetes DMT2 meskipun kecenderungan individu terhadap DMT2 yang disebabkan oleh faktor risiko yang tidak dapat dimodifikasi (etnis dan riwayat keluarga / kecenderungan

genetik) memiliki dasar genetik yang kuat, bukti dari studi epidemiologi menunjukkan bahwa banyak kasus DMT2 dapat dicegah dengan memperbaiki faktor risiko utama yang dapat dimodifikasi (obesitas, aktivitas fisik yang rendah dan pola makan yang tidak sehat).

1. Pola Makan, Obesitas, Aktivitas Fisik dan Genetik

Faktor-faktor tersebut berkontribusi pada pengembangan risiko DMT2, seperti : faktor gaya hidup modern yang mendorong terjadinya obesitas (diet), gaya hidup dengan aktivitas fisik pasif / tidak banyak bergerak, obesitas, indeks massa tubuh [BMI] ≥ 30 kg / m² (faktor risiko terkuat terjadinya DMT2), sosioekonomi, kecenderungan genetik secara langsung, interaksi genetik dengan lingkungan (Galicia-Garcia et al., 2020).

2.3.3. Patofisiologi

Patofisiologi dari penyakit ini merupakan gangguan fungsi loop umpan balik antara kerja insulin dan sekresi insulin yang menghasilkan kadar glukosa darah yang tinggi secara abnormal. Dalam kasus disfungsi sel, sekresi insulin berkurang, mengganggu kemampuan tubuh dalam mempertahankan kadar glukosa fisiologis. Di sisi lain, resistensi insulin berkontribusi pada peningkatan produksi glukosa di hati dan penurunan pengambilan glukosa baik di otot, hati, dan jaringan adiposa. Pada awal kedua proses tersebut terjadi dalam patogenesis perkembangan penyakit, disfungsi sel biasanya lebih

parah daripada resistensi insulin yang terjadi. Namun, ketika disfungsi sel dan resistensi insulin muncul, hiperglikemia akan terjadi peningkatan yang mengarah pada perkembangan DMT2 (Galicia-Garcia et al., 2020).

2.4. Diabetes Gestasional

2.4.1. Definisi

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) merupakan komplikasi kehamilan di mana wanita yang sebelumnya tidak memiliki riwayat diabetes, mengalami hiperglikemia kronis selama masa kehamilan. Dalam kebanyakan kasus, hiperglikemia ini adalah akibat dari gangguan toleransi glukosa akibat disfungsi sel β pankreas dengan latar belakang resistensi insulin kronis. (Plows et al., 2018).

2.4.2. Etiologi

Dalam studi terkini beberapa faktor risiko GDM secara konsisten terus bermunculan. Faktor risiko yang termasuk antara lain: kelebihan berat badan / obesitas, kenaikan berat badan pada kehamilan yang berlebihan, diet model *Western*, etnis, polimorfisme genetic, usia ibu lanjut, lingkungan/kondisi intrauterine (berat lahir rendah atau tinggi), riwayat keluarga GDM, riwayat personal GDM, penyakit resistensi insulin lainnya, seperti polycystic ovarian syndrome (PCOS) (Plows et al., 2018).

2.4.3. Patofisiologi

Diabetes mellitus gestasional (GDM) adalah bentuk diabetes yang berkembang selama kehamilan. Hal ini ditandai dengan gangguan kemampuan untuk memetabolisme karbohidrat, biasanya karena kekurangan insulin, atau resistensi insulin. Kondisi tersebut menghilang setelah melahirkan bayi. Namun, dalam sejumlah besar kasus, ia kembali beberapa tahun kemudian sebagai kasus diabetes mellitus tipe 2. Ada bukti yang menunjukkan bahwa laktogen plasenta dan kerusakan insulin yang cukup besar oleh plasenta berperan dalam memicu GDM (Moini, 2019).

2.5. Diabetes Jenis Lain

2.5.1. Definisi

Selain diabetes tipe 1, tipe 2, dan gestasional, ada berbagai jenis diabetes lainnya. Sekitar 2% orang menderita diabetes jenis lain ini. Ini termasuk berbagai jenis diabetes monogenik, diabetes terkait fibrosis kistik, dan diabetes yang disebabkan oleh sindrom langka. Obat-obatan tertentu seperti steroid dan antipsikotik dapat menyebabkan diabetes jenis lain, serta pembedahan atau ketidakseimbangan hormon (“Other types of diabetes | Diabetes UK,” n.d.).

2.5.2. Etiologi

Ada berbagai jenis diabetes yang tidak umum dan berbeda dari jenis lainnya, yang disebabkan oleh infeksi, obat-obatan, endokrinopati, kerusakan pankreas, dan cacat genetik. Bentuk diabetes yang tidak terkait ini termasuk dalam "Jenis Khusus Lainnya" dan diklasifikasikan secara terpisah (Husein et al., 2016).

2.6. Diagnosis Diabetes Mellitus

Tes diabetes harus dilakukan pada fasilitas kesehatan (seperti klinik atau laboratorium). Jika dalam riwayat pemeriksaan gula, ditemukan bahwa kadar gula darah pasien sangat tinggi, atau jika seseorang dengan gejala klasik (polidipsi, poliuri, dan polifagi) memiliki salah satu tes diabetes positif, maka tes kedua untuk mendiagnosis diabetes bisa tidak perlu dilakukan. American Diabetes Association mengelompokkan tingkat diabetes berdasarkan jenis tes yang diterapkan ("Diagnosis | ADA," n.d.) :

2.6.1. A1C

Tes A1C mengukur gula darah rata-rata selama dua hingga tiga bulan terakhir. Keuntungan diagnosis dengan cara ini adalah tidak diperlukannya berpuasa atau minum apa pun.

Diabetes didiagnosis pada A1C lebih dari atau sama dengan 6,5%

Tabel 2.1. Nilai A1C

Nilai	A1C
Normal	<5,7%
Pre-diabetes	5,7%-6,4%
Diabetes	>= 6,5%

2.6.2. Glukosa Plasma Puasa/ *fasting plasma glucose (FPG)*

Tes ini memeriksa kadar gula darah puasa. Puasa artinya setelah tidak makan atau minum (kecuali air mineral) minimal 8 jam sebelum dilakukan pemeriksaan. Tes ini biasanya dilakukan pada pagi hari, sebelum sarapan.

Diabetes didiagnosis pada gula darah puasa lebih dari atau sama dengan 126 mg / dl

Tabel 2.2. Nilai Glukosa Plasma Puasa

Nilai	Glukosa plasma puasa
Normal	<100 mg/dl
Pre-diabetes	100 mg/dl – 125 mg/dl
Diabetes	$\geq$ 126 mg/dl

2.6.3. Tes Toleransi Glukosa Oral / Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

OGTT adalah tes yang memeriksa kadar gula darah sebelum dan dua jam setelah minum minuman manis khusus. Tes ini memberi gambaran bagaimana tubuh seseorang memproses gula.

Diabetes didiagnosis pada 2 jam gula darah lebih dari atau sama dengan 200 mg / dl

Tabel 2.3. Nilai Toleransi Glukosa Oral

Nilai	Tes Toleransi Glukosa Oral
Normal	<140 mg/dl
Pre-diabetes	140 mg/dl – 199 mg/dl
Diabetes	$\geq$ 200 mg/dl

2.6.4. Gula Darah Sewaktu (GDS)

Tes ini adalah pemeriksaan darah setiap saat sepanjang hari ketika seseorang mengalami gejala diabetes yang parah.

Diabetes didiagnosis dengan gula darah lebih dari atau sama dengan 200 mg / dl.

2.7. Insulin

2.7.1. Definisi

Insulin adalah hormon yang mengatur kadar gula (glukosa) dalam darah yang diproduksi oleh sel β pulau Langerhans di pankreas. Insulin disekresikan ketika kadar glukosa darah meningkat, seperti setelah makan. Ketika kadar glukosa darah turun, sekresi insulin berhenti, dan hati melepaskan glukosa ke dalam darah (Utiger, 2020). Insulin adalah peptida heterodimerik yang dihubungkan oleh tiga ikatan disulfida dimana Insulin memainkan peran penting selain dari metabolisme karbohidrat namun juga dalam regulasi anabolik protein dan lipid, pertumbuhan somatik, dan proliferasi sel selama perkembangan (Andoh, 2016).

2.7.2. Struktur

Insulin adalah hormon peptida yang terdiri dari 51 asam amino yang didistribusikan di antara dua rantai peptida A dan B dan dihubungkan oleh ikatan disulfida (Vargas et al., 2018). Molekul insulin manusia terdiri dari dua rantai polipeptida, satu rantai A dan satu rantai B yang masing-masingnya mengandung 21 dan 30 residu asam amino. Kedua rantai ini dihubungkan oleh SS (CysA7-CysB7 dan CysA19-CysA20) dengan ikatan disulfida, dan pada rantai A

terdapat ikatan disulfida tambahan yang menghubungkan CysA6 dan CysA11. Insulin memiliki berat molekul sebesar 6000 Da dan 51 asam amino pada hampir semua spesies, termasuk manusia. (Dağışan & Erbaş, 2021).

2.7.3. Sintesis

Insulin disekresikan dengan terdiri dari 51 asam amino dengan berat molekul 5,8 kDa. Gen insulin mengkode prekursor 110-asam amino yang dikenal sebagai preproinsulin. Seperti protein lainnya yang disekresikan, preproinsulin mengandung *hydrophobic N-terminal signal peptide*, yang berinteraksi dengan partikel pengenalan *signal recognition particles* (SRP). SRP memfasilitasi translokasi preproinsulin melintasi membran retikulum endoplasma kasar (RER) ke dalam lumen. Proses ini terjadi melalui saluran/kanal penghantar peptida, di mana sinyal peptida dari preproinsulin dibelah oleh peptidase sinyal untuk menghasilkan proinsulin (Fu et al., 2012).

Setelah translokasi ke dalam retikulum endoplasma (ER), peptida sinyal dihapus, sehingga mengubah preproinsulin menjadi proinsulin, dan ikatan disulfida terbentuk antara rantai B dan A. Setelah keluar dari RE, proinsulin bergerak melalui kompleks Golgi ke jaringan trans-Golgi (TGN) untuk disortir ke dalam organel tertutup membran yang disebut granula sekretori. Pembelahan C-peptida di kompartemen ini mengubah proinsulin menjadi insulin matang, yang terdiri dari rantai B dan A saja. Insulin matang disimpan

di dalam granula sekretori sampai mereka menyatu dengan membran plasma untuk melepaskan insulin, atau didegradasi secara intraseluler melalui autofagi, ataupun pemindahan langsung ke lisosom, yang dikenal sebagai krinofagi (Vasiljević et al., 2020).

2.8. Fisiologi Pengaturan Glukosa Darah

Pankreas adalah kunci dari regulasi pencernaan makronutrien untuk menjaga homeostasis energi dengan melepaskan berbagai enzim pencernaan dan hormon. Pankreas terdiri dari organ sekretorik dimana sebagian besar terdiri dari sel asinar — atau eksokrin — yang mengeluarkan jus pancreas (*pancreatic juice*) yang mengandung berbagai enzim pencernaan, seperti lipase pankreas, amilase, dan tripsinogen, ke dalam saluran utama pankreas (duktus pankreatikus) dan saluran aksesori pancreas (duktus aksesorius). Sebaliknya, hormon pankreas dilepaskan dengan cara endokrin, yaitu sekresi secara langsung ke dalam aliran darah. Sel-sel endokrin berkumpul bersama, sehingga membentuk apa yang disebut pulau/islet Langerhans, yang merupakan struktur kecil seperti pulau di dalam jaringan pankreas eksokrin yang hanya mencakup 1-2% dari seluruh organ (Röder et al., 2016).

Islet Langerhans manusia terdiri dari sekitar 30% sel α penghasil glukagon, sekitar 60% sel β penghasil insulin, dengan sisanya sekitar 10% terdiri dari sel- δ (penghasil somatostatin), sel γ - atau sel PP (penghasil polipeptida pankreas), dan sel- ϵ (penghasil ghrelin). Seluruh sel-sel endokrin ini didistribusikan secara acak dalam islet (Da Silva Xavier, 2018). Masing-masing hormon memiliki fungsi berbeda.

Sel endokrin mengeluarkan masing-masing hormonnya sebagai respons terhadap sinyal eksternal, seperti *intake* dari nutrisi ataupun stres melalui jalur pensinyalan humoral, hormonal ataupun saraf. Proses molekuler yang mendasari penerjemahan rangsangan ke dalam pelepasan hormon disebut dengan *stimulus-secretion coupling* atau dapat diartikan sebagai eksositosis yang bergantung pada rangsangan dari suatu zat tertentu, seperti pelepasan insulin pada sel β dipengaruhi oleh stimulasi dari glukosa (Röder et al., 2016).

Tubuh mampu mengatur kadar glukosa darah dalam kisaran normal yang ketat, yaitu antara 70–100 mg/dl dalam 1-3 jam setelah makan dengan hormon tertentu. Glukosa post absorptif dalam sirkulasi darah dibuang oleh jaringan splanknikus seperti hati dan jaringan gastrointestinal, serta jaringan perifer utama — otot rangka dan jaringan adiposa. Dua hormon penting, insulin dan glukagon, yang diproduksi di pankreas endokrin, memainkan peran penting dalam regulasi homeostasis glukosa darah. Insulin hormon, yang dihasilkan dari sel beta pankreas sebagai respons terhadap glukosa darah tinggi, memfasilitasi pengangkutan glukosa ke dalam sel untuk dimetabolisme sebagai media produksi adenosine triphosphate (ATP) dan/atau untuk disimpan sebagai glikogen; oleh karena itu, konsentrasi glukosa darah dengan cepat kembali ke level preprandial dalam waktu singkat. Hormon glukagon, yang diproduksi oleh sel alfa pankreas ketika glukosa darah rendah, merangsang hati untuk melepaskan glukosa yang tersimpan di dalam selnya, sehingga meningkatkan glukosa darah ke tingkat normal (Yang, 2014).

2.9. Faktor yang Mempengaruhi Kadar Insulin

American Diabetes Association (ADA) mengelompokkan beberapa faktor yang dapat meingkatkan dan menurunkan dari kadar insulin (Association, 2018) :

1. Faktor yang Meningkatkan kadar insulin : konsumsi makanan berkarbohidrat yang terlalu banyak, kedaan aktivitas fisik yang kurang, efek samping dari obat-obatan seperti antipsikotik dan steroid, keadaan sakit, keadaan stress, nyeri, baik singkat maupun berkepanjangan seperti akibat terbakar panas matahari, menstruasi, Dehidrasi
2. Faktor yang dapat menurunkan kadar insulin : konsumsi makanan yang sedikit atau makan dengan rendah karbohidrat, konsumsi alcohol pada perut kosong, pemakaian medikasi insulin baik injeksi maupun oral yang terlalu banyak, efek samping obat, aktivitas fisik yang meningkat dari biasanya

2.10. Streptozotocin

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

Diabetes yang disebabkan oleh suntikan STZ tunggal sering disebut sebagai diabetes tipe 1 yang disebabkan oleh kerusakan sebagian pankreas oleh STZ. Hiperglikemia kronis dan glukotoksisitas yang sesuai adalah mekanisme patogenik utama diabetes dan komplikasinya. Model hewan diabetes yang diinduksi streptozotocin (STZ) adalah platform yang berguna untuk memahami glukotoksisitas sel β pada diabetes (Wu & Yan, 2015).

2.11. Mesenchymal Stem Cell

2.11.1. Definisi

Mesenchymal Stem Cell (MSC) adalah sel yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jenis tipe sel tertentu. MSC memiliki dua karakter utama, yaitu pembaruan diri (*self-renewal*) yang terus-menerus dan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel dewasa yang terspesialisasi. *Human Mesenchymal Stemcells* (hMSCs) adalah sel induk non-hematopoietik, multipoten dengan kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi garis keturunan mesodermal seperti osteosit, adiposit dan kondrosit serta garis keturunan ektodermal (neurosit) dan endodermal (hepatosit) (Ullah et al., 2015).

Terdapat dua kelas utama MSC, yaitu : MSC pluripotent, yang dapat menjadi sel apa pun dalam tubuh orang dewasa, dan multipoten yang memiliki kemampuan terbatas dalam berubah menjadi populasi sel jenis tertentu (Biehl & Russell, 2009).

2.11.2. Fungsi

1. Kemampuan Diferensiasi

MSC memiliki kapabilitas untuk memperbarui diri sambil mempertahankan multipotensinya. Penelitian menunjukkan bahwa β -catenin, melalui regulasi EZH2, adalah molekul sentral dalam mempertahankan sifat "*stemness*" dari MSC. Tes standar untuk memastikan multipotensi adalah diferensiasi sel menjadi osteoblas, adiposit dan kondrosit serta miosit (Sen et al., 2020). MSC bersifat multipoten, artinya mereka dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel mesenkim, termasuk diantaranya yaitu : sel endotel, osteoblas, kondrosit, fibroblas, tenosit, sel otot polos pembuluh darah, mioblas, dan neuron (Berebichez-Fridman et al., 2017).

2. Immunomodulator

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

kuat melalui interaksi sel-sel, antara MSC dan limfosit ataupun produksi faktor molekul terlarut (Zhao et al., 2016).

3. Antimikrobia

MSC memberikan efek antimikroba yang kuat baik melalui mekanisme secara langsung maupun tidak langsung, yang sebagian besar dimediasi oleh sekresi peptida dan protein antimikroba (AMPs) (Alcayaga-Miranda et al., 2017). Sejauh ini, MSC telah diketahui mengekspresikan empat jenis AMP : cathelicidin LL-37 (Sutton et al., 2016), human β -defensin-2 (hBD-2) (Sung et al., 2016), hepcidin (Alcayaga-Miranda et al., 2015), dan lipocalin-2 (Lcn2) (Gupta et al., 2012), yang terjadi modulasi lebih lanjut selama infeksi dan inflamasi.

2.11.3. Sumber

MSC dapat diisolasi dari berbagai sumber dalam tubuh manusia, dimana pemilihan sumber yang ideal didasarkan pada karakteristik logistik, praktis dan in vitro (Stanko, Kaiserova, Altanerova, & Altaner, 2014).

Sumber MSC yang sudah diteliti hingga kini yaitu : sumsum tulang/ Bone Marrow (BM), jaringan lemak/ Adipocyte Tissue (AT), pulpa gigi, jaringan yang berasal dari kelahiran (*Birth-derived tissues*): (Umbilical cord (UCB), warthon jelly, kondrosit), cairan amnion dan plasenta, darah tepi, cairan synovium dan synovial, endometrium, kulit, otot

Untuk pememilihan sumber sel yang memadai, harus dilakukan pertimbangan kesulitan dalam mendapatkan sampel dan potensi efek merugikan dari pengambilan sel pada donor (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).

2.11.4. Karakteristik

International Society for Cellular Therapy telah mengusulkan kriteria minimum untuk ciri-ciri MSC :

1. harus menunjukkan sifat perlekatannya pada plastik dalam kultur standar
2. memiliki seperangkat penanda permukaan sel tertentu, pada *Human Mesenchymal Stem Cells* yaitu :
 - a. cluster of differentiation (CD) 73, CD90, CD105 dengan total populasi $\geq 95\%$
 - b. sedikit mengekspresikan CD14, CD34, CD45 dan antigen leukosit manusia-DR (HLA- DR) dengan total populasi $\leq 2\%$
3. sedangkan penanda pada MSC tikus : populasi positif pada marker CD90.1 dan CD29, namun negatif pada CD 45 dan 31
4. memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi secara in vitro menjadi adiposit, kondrosit, dan osteoblas.

Seluruh karakteristik tersebut berlaku untuk semua MSC, meskipun terdapat sedikit perbedaan karakteristik MSC yang diisolasi

dari sumber jaringan yang berbeda (Dominici et al., 2006; Rahimi et al., 2021; Ullah et al., 2015).

2.12. Sekretom

2.12.1. Definisi

Sekretom merupakan sekret dari MSC. Sekretom MSC kaya akan faktor terlarut, termasuk di dalamnya yaitu terdapat sitokin, kemokin, molekul imunomodulator, dan faktor pertumbuhan. Sekretom dengan kandungan molekul-molekulnya dapat memperbaiki jaringan yang rusak dengan memodulasi dan mendorong pembentukan jaringan baru (Benavides-Castellanos et al., 2020; Madrigal, Rao et al., 2014).

2.12.2. Komposisi

Komposisi dari sekretom MSC telah diteliti untuk diidentifikasi molekul mana saja yang menjadi kunci dan bertanggung jawab atas potensi terapeutik dari MSC, dimana tujuan akhirnya adalah substitusi dari terapi berbasis sel (MSC) menjadi terapi tanpa sel untuk mencapai efek yang diharapkan. Molekul faktor utama yang terdeteksi dalam sekretom MSC (Ferreira et al., 2018): BMP, CCL5/RANTES, EGF, FGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, ICAM, IDO, IGF, IL-10, IL-6, IL-8, LIF, MCP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, PDGF, PGE2, TGF- β , TIMP-1, TIMP-2, VEGF.

2.13. Modifikasi Pendorong Sekret Mesenchymal Stem Cell

Terdapat beberapa bukti yang menunjukkan bahwa modifikasi MSC dapat meningkatkan efek terapeutik sekretomnya. Berbagai rangsangan dan kondisi yang telah dikembangkan antara lain (Vizoso et al., 2017):

1. kultur sel dalam kondisi hipoksia, meningkatkan produksi faktor pertumbuhan dan molekul anti-inflamasi;
2. rangsangan pro-inflamasi, menginduksi sekresi lebih tinggi dari faktor-faktor yang berhubungan dengan imunitas;
3. kultur pada sistem tiga dimensi, yaitu kultur sferoid, meningkatkan produksi faktor anti-inflamasi dan anti-tumor
4. rekayasa mikropartikel.

2.14. Hipoksia

2.14.1. Definisi

Hipoksia adalah kondisi pengiriman oksigen yang tidak adekuat pada sel dan jaringan tubuh, keadaan semacam ini sering dijumpai pada proses fisiologi maupun penyakit (Pavlacky & Polak, 2020). Hipoksia digambarkan sebagai keadaan rendah oksigen yang dapat memaksa sel dan jaringan untuk dapat beradaptasi (Hawkins et al., 2013).

2.14.2. Mekanisme Fisiologi Selular

Ketergantungan kuat pada oksigen untuk homeostasis metabolik dan kelangsungan hidup menyebabkan evolusi awal mekanisme molekuler yang memungkinkan sel, jaringan, dan

organisme untuk beradaptasi dengan hipoksia. Respon adaptif ini terutama diatur oleh keluarga faktor transkripsi yang disebut *hypoxia-inducible factors* (HIFs) (Fabian, 2019).

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

Dalam hipoksia, bagaimanapun, subunit HIF- α lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerisasi dengan HIF-1 β dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi peralihan dari metabolisme bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik (Fabian, 2019). HIF-1 α diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 α dan HIF-3 α diekspresikan pada jaringan yang lebih terbatas dan pada tahap perkembangan, seperti paru-paru janin atau endotel vaskular yang berkembang. Dalam

merefleksikan pola ekspresi jaringan spesifik mereka, HIF-1 α memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respons terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 α dan HIF-3 α memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen (Chen et al., 2020).

2.15. Hubungan Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell Terhadap Kadar Insulin Pada Kerusakan Islet

Sekret dari *Mesenchymal Stem Cell*, yaitu sekretom mengandung berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin, sehingga dapat digunakan sebagai terapi alternatif yang baik untuk terapi berbasis *Stem Cell* (Joseph et al., 2020). MSC telah diketahui perannya dalam meningkatkan regenerasi jaringan yang terluka dengan kapasitasnya untuk berdiferensiasi menjadi beberapa jenis jaringan. Namun, dibanding diferensiasinya menjadi jaringan baru, aktivitas parakrin lah yang paling mungkin terlibat besar dalam efek terapeutik MSC. Penelitian terbaru telah melaporkan bahwa MSC yang dikondisikan dengan hipoksia meningkatkan kemampuan parakrin mereka (Ishiuchi et al., 2020).

Pada penyakit DM tipe 1, sitokin IL-1 β , TNF α dan IFN γ yang disekresikan oleh makrofag dan sel T memiliki peran besar dalam proses kerusakan sel. Sitokin-sitokin tersebut adalah penginduksi utama stres sel β yang bertanggung jawab atas tingkat kematian sel β hewan pengerat dan manusia pada model eksperimental dari DM1 (Vincenz et al., 2011).

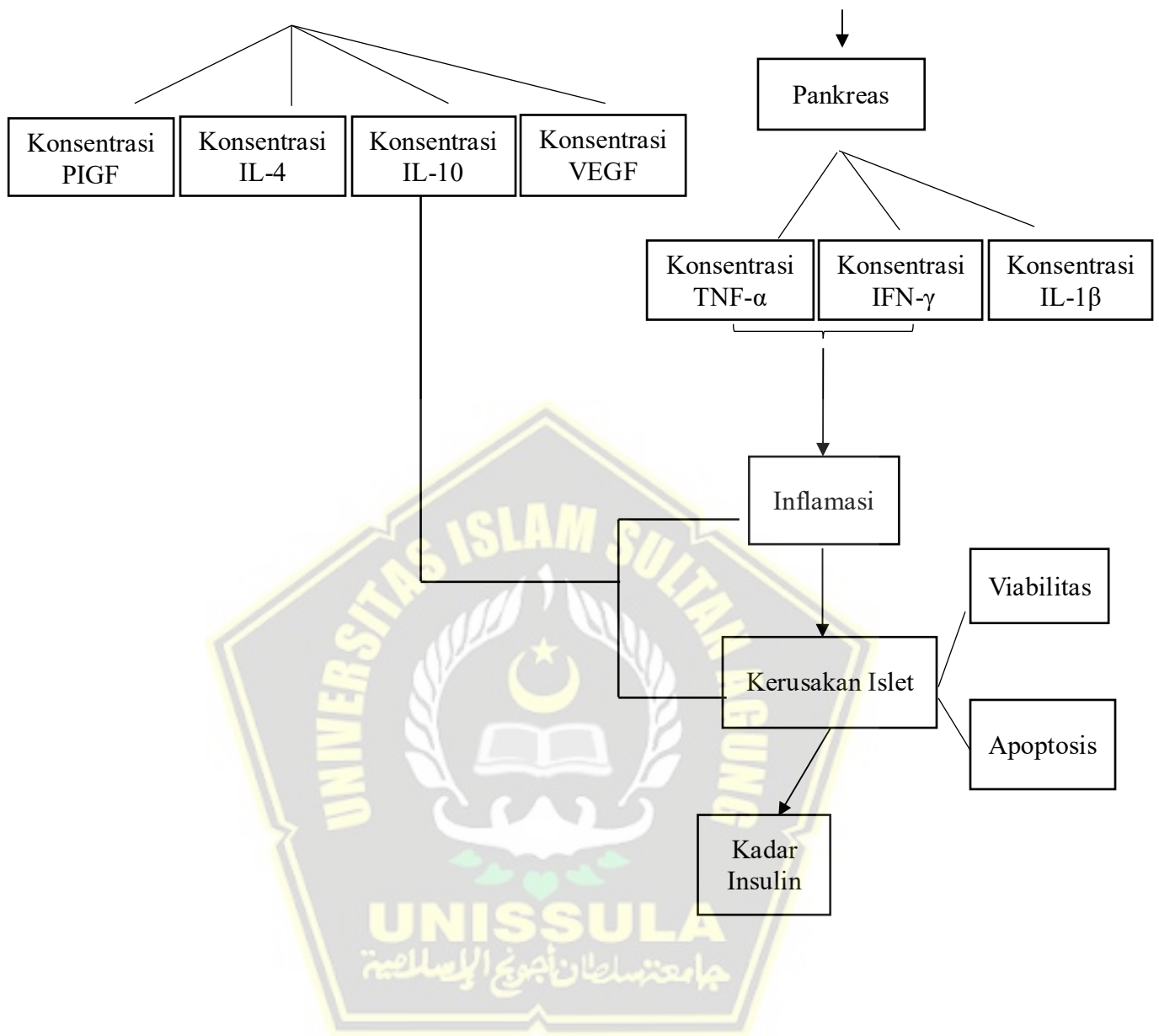
Sekretom mengandung berbagai faktor anti-inflamasi yang diduga dapat memberikan efikasi pada sel islet DM tipe 1, diantaranya yaitu IL-4, IL-10, VEGF dan PIGF. Hasil penelitian menunjukkan ditemukan bahwa dari berbagai sitokin antiinflamasi, IL-10 adalah kandidat sitokin yang memiliki efek paling signifikan dalam meningkatkan viabilitas sel islet yang diinduksi sitokin pro-apoptotik TNF α dan IFN γ dan menurunkan apoptosis yang terjadi, namun efek serupa tidak ditemukan pada sel yang diinduksi IL-1 β . Secara keseluruhan sekretom dapat memberikan perbaikan sekresi insulin pada sel islet yang sebelumnya rusak (Al-Azzawi et al., 2020).

Perlakuan prakondisi pada MSC dengan *pre-treatment* hipoksia meningkatkan efek imunomodulator MSC dengan meningkatkan sekresi sitokin dan faktor terlarut yang terkait dengan imunosupresi dari MSC (Saparov et al., 2016). Pada MSC yang berasal dari gingiva (G-MSC) hipoksia memodulasi profil sitokin, dengan merangsang produksi sitokin anti-inflamasi, seperti IL-10, menggeser profil sitokin ke arah mediator anti-inflamasi (Jiang et al., 2015).

2.16. Kerangka Teori

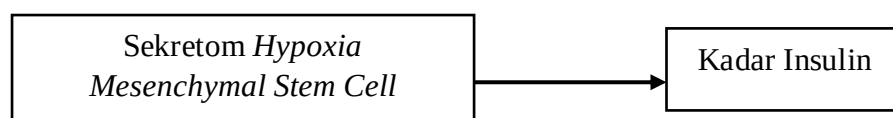
Sekretom
Hypoxia-MSC

DM Tipe 1



Gambar 2.1. Kerangka Teori

2.17. Kerangka Konsep



Gambar 2.2. Kerangka Konsep

2.18. Hipotesis

Terdapat pengaruh sekretom Hypoxia Mesenchymal *Stem Cell* terhadap kadar insulin pada diabetes mellitus tipe 1.

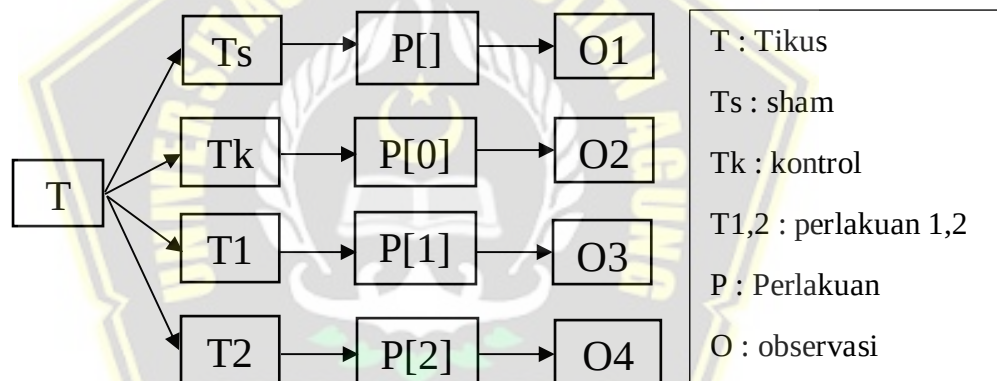


BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan model rancangan “*post test only control group design*” dengan menggunakan hewan coba tikus pada eksperimental laboratorik in vivo dan in vitro (gambar 3.1). Rancangan ini digunakan, karena pada penelitian ini menilai pengaruh sekretom *hypoxia-MSC* pada kelompok penelitian dengan cara membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kontrol.



Gambar 3.1. Skema rancangan penelitian penelitian post-test only group

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel Penelitian

3.2.1.1. Variabel bebas

Dosis Mesenchymal Sekretom Hypoxia Mesenchymal

Stem Cell.

3.2.1.2. Variabel tergantung

Kadar insulin dalam darah

3.2.2. Definisi Operasional

Tabel 3.1. Definifi Operasional

Variabel	Definisi Operasional dan cara Pengukuran	Unit/Satuan
Variabel Bebas	Serial Dosis Sekretom MSC Hipoksia adalah pemberian sekretom yang diambil melalui ultrafiltrasi 5-300 kDa dengan dosis 0,5 cc dan 1 cc pada kelompok percobaan secara intra peritoneal pada awal minggu pertama, kedua, dan ketiga.	ml (cc)
Variabel Terikat	Kadar insulin adalah kadar serum insulin yang diambil dari vena orbita tikus galur wistar yang diambil pada akhir minggu pertama, kedua, dan ketiga dan diukur kadarnya menggunakan metode ELISA.	mIU/L

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi

3.3.1.1. Populasi Target

Populasi target dari penelitian yang akan dilakukan adalah tikus putih jantan galur Wistar.

3.3.1.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* di *Integrated Biomedical Laboratory (IBL)*, Fakultas Kedokteran

UNISSULA yang dipilih secara acak dengan mempertimbangkan kriteria inklusi dan eksklusi.

3.3.2. Sampel Penelitian

3.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih galur Wistar jantan
2. Tikus putih galur Wistar yang sehat.
3. Tikus putih galur Wistar usia 8-10 minggu.
4. Tikus putih galur Wistar dengan berat badan 250-300 gram.

3.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus putih galur wistar yang memiliki kelainan anatomis.
2. Tikus putih galur wistar yang sebelumnya pernah digunakan untuk penelitian lain sebelumnya

3.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

1. Tikus mati selama penelitian
2. Tikus putih galur wistar yang mengalami infeksi berat saat penelitian

3.3.3. Besar Sampel

Penentuan besar sampel dihitung dengan menggunakan kriteria menurut World Health Organization (WHO) untuk penelitian yaitu sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Pada penelitian ini setiap

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

$$\text{Besar sampel} = \text{Jumlah kelompok penelitian} \times 6$$

$$\text{ekor/kelompok} = 4 \times 6 \text{ ekor} = 24 \text{ ekor tikus jantan galur wistar.}$$

3.4. Instrumen dan Bahan

3.4.1. Instrumen

Alat yang digunakam dalam penelitian ini terdiri dari : *Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip), pipette filler, conical tube (15 ml, 50 ml), cryotube 1 ml, Pinset, CO2 cylinder, scissor, scalpel dan bisturi, thermostirrer, beaker glass, aluminium foil, dish, flask, sentrifugator, chamber, oxygen meter, CO2 Incubator, tabung CO2, imunocytochemistry, biosafety cabinet class 2, hotplate stirrer, disposable pipet, heparin tube, inverted microscope, cell counter, Rat INS(Insulin) Elisa Kit, 37°C incubator, tabung microcentrifuge 1,5 ml, alumunium foil, jarum suntik 3-ml, jarum suntik 23-G, alat ukur glukosa digital, kandang tikus.*

3.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : *Mesenchymal Stem Cell, serum tikus putih galur wistar, NaCl 0.9%, FBS, Medium dMEM, alkohol 70%, fungizon 0.5%, streptomisin-penicilin 1% (penstrep), PBS, deionized atau distilled water, tikus*

jantan Wistar: ~150 hingga 200 g, berusia 8 hingga 10 minggu, makanan standar hewan pengerat (Harlan), 50 mM natrium sitrat (enzyme grade; Fisher) pH 4,5, streptozotocin (STZ; Sigma), 10% (b / v) sukrosa (Sigma), 50 mM.

3.5. Prosedur dan Teknik Penelitian

3.5.1. Teknik Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord* Tikus

Seluruh proses dilakukan di dalam biosafety cabinet class 2, menggunakan alat dan prinsip kerja teknik yang steril;

Umbilical cord diambil dari tempat penyimpanan maupun langsung dari tikus, kemudian dicuci menggunakan PBS. Kemudian *Wharton jelly* dipisahkan dari pembuluh darah *umbilical cord*. *Wharton jelly* diambil dan dicacah menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. Setelah itu cacahan *Wharton jelly* diletakan secara merata dalam *flask* T25. Sekitar 2-3 menit *Wharton jelly* akan melekat pada dasar *flask*. Selanjutnya, dilakukan perendaman dengan 1cc medium. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5%,. Medium pada *flask* dibuang dan diganti sejumlah medium yang dibuang selama tiga hari sekali dalam kurun waktu 10-15 hari. Pertumbuhan sel diamati menggunakan Inverted microscope. Dilakukan kembali inkubasi ulang pada suhu 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5%. Selama tiga hari sekali, medium pada *flask* dibuang, lalu diganti sejumlah medium yang dibuang. Prosedur yang sama, terus dilakukan hingga mencapai *Stem Cells* konfluens 80%.

3.5.2. Proses Persiapan *Passage*

- 3.5.2.1. Jika sel sudah konfluens 80%, Seluruh medium dibuang, kemudian dicuci dengan PBS ke dalam *flask* sejumlah medium yang dikeluarkan, setelah itu PBS dibuang
- 3.5.2.2. Menambah 2 cc tripsin sintetik (triple), lalu didiamkan selama 5 menit, setelah itu dilakukan tapping pada *flask* untuk melepaskan perlekatan sel di dasar flask.
- 3.5.2.3. Menambahkan 4 cc medium inhibitor tripsin sintetik sebanyak 4 cc.
- 3.5.2.4. Memindahkan sel dan medium dari *flask* T25 ke dalam tube 15 cc dan melakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 1900 rpm.
- 3.5.2.5. *Supernatant* dibuang lalu ditambahkan 2 cc PBS pada *pellet* yang tersisa, lalu dilakukan resuspensi, kemudian *sentrifuge* selama 8 menit dengan putaran 1900 rpm.
- 3.5.2.6. *Supernatant* dibuang dan ditambahkan 1 cc medium komplit pada *pellet* yang tersisa di dasar tabung, kemudian hitung sel dilakukan.

3.5.3. Proses *Passage* Sel

- 3.5.3.1. Menambahkan medium komplit dengan ukuran 1 cc medium komplit / 1.500.000sel ke dalam tube sesuai jumlah hitungan sel sebelumnya.

3.5.3.2. 1 cc sel dan medium dimasukkan dalam *flask* T25. Kemudian dikultur dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama 1 hari.

3.5.3.3. Mambahkan medium komplit ke dalam flask sebanyak 9 cc.

3.5.3.4. Inkubasi dilakukan dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama tiga hari.

3.5.3.5. Seluruh medium dibuang untuk kemudian dimasukkan medium komplit baru sebanyak jumlah medium yang dibuang, setelah itu diinkubasi kembali dengan kondisi yang sama.

3.5.3.6. Proses serupa diulang selama tiga hari sekali hingga sel konfluen 80% dalam *flask*.

3.5.3.7. Setiap 80% sel konfluen, dipindah ke *flask* yang baru dan dihitung tiap fase perpindahan sebagai *passage* I, II, dan seterusnya

3.5.3.8. Proses kultur dilakukan hingga *passage* ke IV-VI.

3.5.4. Proses Validasi Sel

3.5.4.1. Melakukan prosedur flowsitometri untuk pembacaan marker dari *Stem Cells* CD90.1, CD29, CD45, CD31 dengan populasi yang bernilai positif pada CD90.1 dan CD29, dan negatif pada CD45 dan CD31.

3.5.4.2. Melakukan tes kemampuan diferensiasi *Stem Cells* menjadi kondrosit, adiposit, dan osteosit dengan menggunakan medium spesifik tertentu secara *in vitro*.

3.5.5. Proses Pemanenan Sel

3.5.5.1. Pemanenan sel dilakukan pada *passage* ke-IV.

3.5.5.2. Ketika sel sudah konfluens 80% dalam *flask*, seluruh medium dibuang, lalu dicuci menggunakan PBS ke dalam *flask* sejumlah medium yang dibuang, setelah itu PBS dibuang.

3.5.5.3. 2 cc tripsin sintetik (triple) ditambahkan dan diamkan selama 5 menit, kemudian dilakukan teknik tapping pada *flask* untuk melepaskan sel yang menempel di dasar *flask*.

3.5.5.4. 4 cc medium inhibitor tripsin sintetik ditambahkan.

3.5.5.5. Seluruh sel dan medium pada *flask* dipindah ke dalam *tube* 15 cc, lalu dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan perputaran 1900 rpm.

3.5.5.6. *Supernatant* dibuang kemudian ditambahkan 2 cc PBS, dilanjutkan dengan proses resuspensi, dan sentrifugasi selama 8 menit dengan perputaran 1900 rpm.

3.5.5.7. *Supernatant* dibuang kemudian ditambahkan 1 cc medium komplit pada pellet yang tersisa di dasar tabung. Hitung sel kembali dilakukan.

3.5.6. Proses Penghitungan Sel

3.5.6.1. 10µl sel dimasukkan ke dalam *cryotube*.

- 3.5.6.2. Ditambahkan 90µl *triptofan blue* ke dalam *cryotube*.
- 3.5.6.3. 10µl dari campuran dari *cryotube* dipipet ke bilik hitung yang ditutup *deck glass*.
- 3.5.6.4. Pengamatan dilakukan menggunakan *inverted microscope*, dan dihitung pada 4 bilik hitung.
- 3.5.6.5. Perhitungan menggunakan rumus perhitungan jumlah sel:

$$\frac{\sum n}{4} \times 10^4 \times \text{Pengenceran}$$

3.5.7. Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom

- 3.5.7.1. Chamber disiapkan di awal prosedur.
- 3.5.7.2. MSC yang sudah ada dalam well dimasukkan ke dalam chamber.
- 3.5.7.3. *Oxygen meter* disiapkan dalam chamber.
- 3.5.7.4. Chamber ditutup dan dipastikan rapat.
- 3.5.7.5. CO₂ dialirkan ke dalam chamber melalui selang.
- 3.5.7.6. *Oxygen meter* diamatai hingga oksigen dalam chamber mencapai kadar O₂ 5%.
- 3.5.7.7. Selama 24 jam dilakukan inkubasi.
- 3.5.7.8. *Oxygen meter* chamber secara berkala diawasi untuk memastikan kadar oksigen tetap dalam kadar 5%.
- 3.5.7.9. Pengambilan sekretom *hypoxia-MSC* dilakukan menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) sehingga mendapatkan *secretome MSC* dengan ukuran 10-50kDa

3.5.8. Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1

3.5.8.1. Sekitar 5 hari sebelum percobaan dimulai, kandang dua sampai lima tikus jantan pada suhu $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban $55\% \pm 5\%$, dengan siklus terang-gelap selama 12 jam (cahaya pada jam 8 : 00 dan mati pada pukul 20:00).

Tikus diberi akses menuju makanan dan air secara bebas.

3.5.8.2. Semua tikus ditimbang secara akurat sampai 1 g. Tikus secara acak disebar menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (jumlah tikus harus sama untuk setiap kelompok).

3.5.8.3. Pada percobaan hari 1, semua tikus dipuasakan selama 6 sampai 8 jam sebelum perlakuan STZ. Minum diberikan seperti biasa.

3.5.8.4. Buffer natrium sitrat 50 mM (pH 4,5) disiapkan, lalu 1 ml buffer ditempatkan ke dalam masing-masing tabung microcentrifuge 1,5 ml dan ditutup tabung dengan aluminium foil.

3.5.8.5. Segera sebelum injeksi, STZ dilarutkan dalam 50 mM buffer natrium sitrat (pH 4,5) hingga konsentrasi akhir 10 mg / ml.

Larutan STZ harus disiapkan secara baru untuk setiap injeksi dan diinjeksikan dalam 5 menit setelah larut.

3.5.8.6. Menggunakan spuit 3-ml dan jarum 23-G, larutan STZ diinjeksi secara intraperitoneal pada 65 mg / kg untuk kelompok perlakuan. Buffer sitrat dengan volume yang sama

(pH 4,5) dimasukan secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol.

3.5.8.7. Tikus dikembalikan ke kandangnya. Makanan diberikan seperti biasa dan air sukrosa 10%.

3.5.8.8. Pada hari percobaan ke-2, air sukrosa 10% diganti menjadi air biasa

3.5.8.9. Untuk penelitian yang melibatkan DM Tipe 1 tahap awal:

Pada hari percobaan ke-10, semua tikus dipuasakan selama 6 sampai 8 jam. Kadar glukosa darah diuji dari sampel vena di ekor menggunakan alat cek kadar gula digital. Jika hewan diabetes digunakan untuk menilai mekanisme tahap awal DMT1 atau untuk skrining senyawa untuk pengobatan diabetes tahap awal, model divalidasi untuk studi lebih lanjut ketika hiperglikemia ditemukan pada tikus yang diinjeksi STZ (yaitu, kadar glukosa darah >150 mg / dl dan / atau secara statistik lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kontrol). Biasanya penentuan kadar glukosa darah cukup untuk mendiagnosis diabetes, sehingga tidak perlu dilakukan pengukuran kadar insulin.

3.5.8.10. Kadar glukosa puasa untuk hiperglikemia ringan harus >150 mg / dl dan / atau menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik pada tikus yang disuntik STZ dibandingkan dengan tikus kontrol.

3.5.8.11. Pada minggu ke-3 sebagian besar tikus yang diinjeksi STZ akan mengalami diabetes berat dengan tingkat glukosa darah > 250 sampai 600 mg / dl. Jika >60% tikus yang diinjeksi STZ masih tidak menunjukkan hiperglikemia, maka diperiksa kembali apakah ada masalah dalam percobaan.

3.5.9. Perlakuan pada Hewan Coba

Kelompok perlakuan dibagi menjadi empat kelompok :

- 3.5.9.1. Kelompok Sham : tikus sehat diinjeksi NaCl
- 3.5.9.2. Kelompok Kontrol : tikus model diabetes tanpa perlakuan yang diinjeksi NaCl
- 3.5.9.3. Kelompok P1 : tikus model diabetes dengan injeksi sekretom *Hypoxia-MS* 0,5 cc
- 3.5.9.4. Kelompok P2 : tikus model diabetes dengan injeksi sekretom *Hypoxia-MS* 1 cc

3.5.10. Analisis Kadar Insulin Menggunakan ELISA

Pengenceran sampel dan reagen harus tercampur dengan sempurna. Sebelum menambahkan TMB ke dalam sumuran, substrat TMB diseimbangkan selama 30 menit pada suhu 37 ° C. Direkomendasikan untuk memplot kurva standar untuk setiap pengujian. Selanjutnya langkah yang dilakukan adalah :

- 3.5.10.1. Menetapkan standar, sampel uji (diencerkan setidaknya 1/2 dengan *Sample Dilution Buffer*), sumuran kontrol

(*blank*) yang masing-masing pada *plate* nya telah dilapisi antibodi dan kemudian, dicatat posisinya. Mencuci *plate* 2 kali sebelum menambahkan sumuran standar, sampel dan kontrol (*blank*)

3.5.10.2. Menyiapkan Standar: Aliquot 100ul dari *zero tube*, tube ke-1, tube ke-2, tube ke-3, tube ke-4, tube ke-5, tube ke-6 dan *Sample Dilution Buffer (blank)* ke dalam sumuran standar.

3.5.10.3. Menambahkan Sampel: memasukan 100ul sampel yang diencerkan dengan benar ke dalam sumuran sampel uji.

3.5.10.4. Inkubasi: menutup *plate* dengan penutup dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 90 menit.

3.5.10.5. Mencuci: Melepas penutup dan membuang isi *plate*, kemudian *plate* dicuci 2 kali dengan *Wash Buffer*. Sumuran tidak boleh dibiarkan mengering sepenuhnya.

3.5.10.6. Antibodi berlabel biotin: Menambahkan larutan antibodi berlabel biotin 100ul ke dalam sumuran di atas (standar, sampel uji, dan sumur kosong). Menambahkan larutan di bagian bawah setiap sumuran tanpa menyentuh dinding samping, menutup *plate* dan menginkubasi pada suhu 37 ° C selama 60 menit.

- 3.5.10.7. Mencuci: melepas penutup, dan *plate* dicuci 3 kali dengan *Wash Buffer*, dan *Wash Buffer* dibiarkan tetap berada di dalam sumuran selama 1-2 menit.
- 3.5.10.8. *HRP-Streptavidin Conjugate* (SABC): Menambahkan 100µl larutan SABC ke dalam setiap sumur, *plate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 30 menit.
- 3.5.10.9. Mencuci: Melepas penutup dan dilakukan pencucian 5 kali dengan *Wash Buffer*, kemudian *Wash Buffer* dibiarkan tetap di dalam sumuran selama 1-2 menit.
- 3.5.10.10. Substrat TMB: Menambahkan 90 µl substrat TMB ke masing-masing sumuran, tutup *plate* dan diinkubasi pada suhu 37 ° C dalam gelap selama 10-20 menit. (Waktu reaksi dapat dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan perubahan warna sebenarnya, tetapi tidak lebih dari 30 menit. Menghentikan reaksi ketika gradien yang tampak muncul di sumur standar.)
- 3.5.10.11. Penghentian: Menambahkan 50µl *Stop Solution* ke setiap sumur. Warnanya akan langsung menguning. Urutan penambahan *Stop Solution* harus sama dengan larutan substrat TMB.

Pengukuran OD: Membaca O.D. absorbansi pada 450nm di *Microplate Reader* segera setelah menambahkan *Stop Solution*.

3.6. Tempat dan Waktu Penelitian

3.6.1. Tempat Penelitian

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

3.6.2. Waktu Penelitian

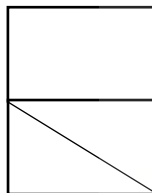
Penelitian dilakukan pada bulan Agustus-September 2021.

Agustus 2021

Minggu	Senin	Selasa	Rabu	Kamis	Jumat	Sabtu
1 Penyuntikan STZ	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22 Induksi STZ selesai	23 Cek Gula Penyuntikan 1 sekretom HMSC	24	25	26	27	28
29	30 Cek Gula. Pengambilan darah 1	31 Penyuntikan 2 sekretom HMSC				

September 2021

Minggu	Senin	Selasa	Rabu	Kamis	Jumat	Sabtu
			1	2	3	4
			(1)	(2)	(3)	(4)
5	6	Cek Gula. Pengambilan darah 2	Penyuntikan 3 sekretom HMSC	9	10	11
(5)	(6)	(7)	(8)	(1)	(2)	(3)
12	13	14	15	16	17	18
(4)	(5)	(6)	Cek Gula. Pengambilan darah 3			
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30		



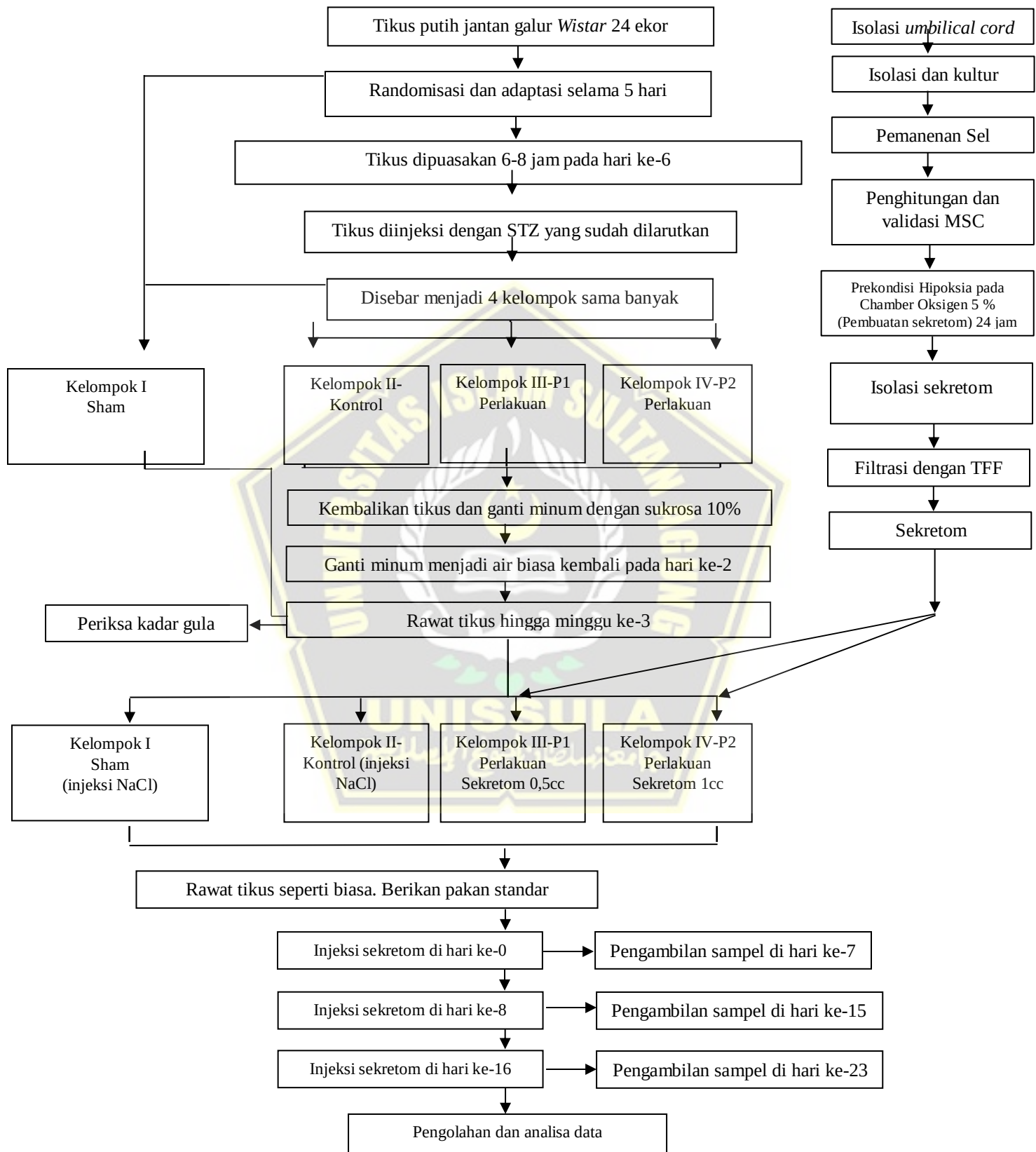
= hari perlakuan/ pengambilan sampel

= masa induksi STZ

3.7. Analisis Data

Data kadar insulin yang diperoleh dari penelitian diproses dan diolah secara statistik menggunakan *IBM SPSS Statistics* untuk dilakukan uji deskriptif dan normalitas Saphiro-Wilk. Setelah itu dilakukan uji homogenitas *Leuvene Statistic*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan pengujian *one-way ANOVA* dan uji *post hoc LSD*. Apabila data terdistribusi normal namun tidak homogen, maka dilanjutkan dengan pengujian *one-way ANOVA* dan uji *post hoc Games-Howell* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Sedangkan apabila data tidak normal dari awal maka pengujian dilakukan secara non-parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis dilanjutkan Mann-Whitney.

3.8. Alur Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama 1 bulan penuh pada Agustus 2021 hingga 7 September 2021, menggunakan subjek hewan model diabetes melitus tipe 1. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan peningkatan kadar insulin pada kelompok hewan model DM tipe 1 yang diberikan hipoksia sekretom MSC. Desain penelitian ini adalah post test only control group dengan replikasi sebanyak 6 kali. Sistematika hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambaran umum, hasil, dan pembahasan. Hasil kemudian disajikan dalam bentuk data deksriptif untuk nilai variabel penelitian dan diakhiri dengan data analisis untuk hasil akhirnya.

4.1. Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini meliputi validasi terjadinya diabetes pada tikus berupa kadar gula darah dan gambaran histopatologi pankreas tikus, validasi MSC berupa kemampuan diferensiasi dan ekspresi *Cluster of Differentiation* (CD), dan data kadar insulin 3 minggu penelitian.

4.1.1. Kadar Gula Darah Tikus

Sampel gula darah diambil melalui vena ekor tikus pada sore hari setelah dipuasakan (tidak dilakukan pemberian pakan standard pada pagi hari penelitian).

Tabel 4.1. Kadar Gula Darah Tikus

Kadar gula darah (mg/dl)	kontrol	P1	P2
1	561	600	510
2	393	576	600
3	600	600	600
4	600	600	520
5	572	510	576
6	480	600	600

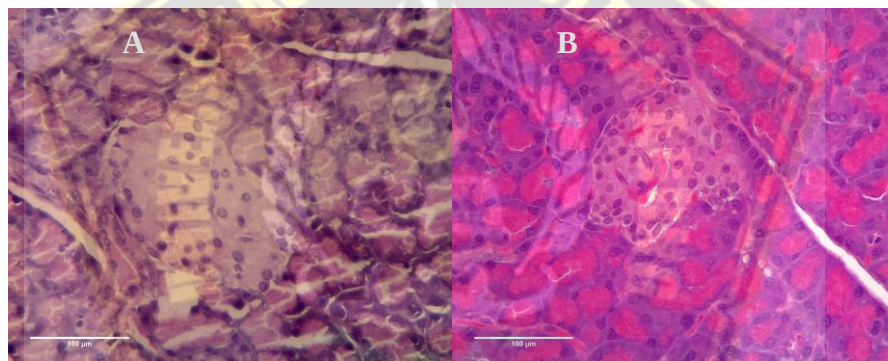
Keterangan :

Batas kadar gula puasa tikus wistar diabetes = >150 mg/dl (Furman, 2021)

Batas kadar gula tikus wistar normal = 50-135 mg/dl (Santoso et al., 2020)

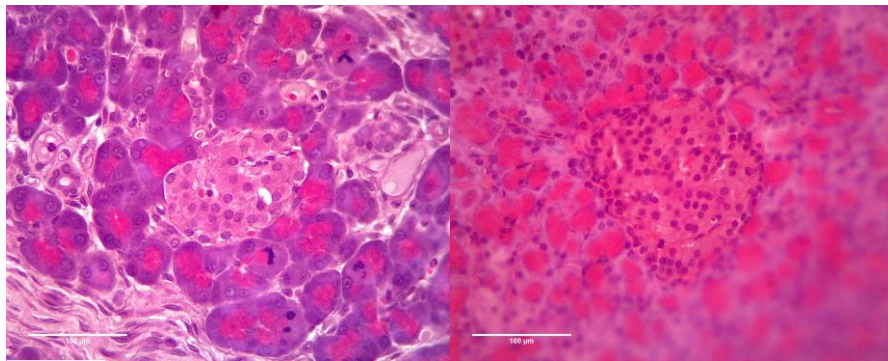
4.1.2. Histopatologi Pankreas Tikus

Seluruh pemeriksaan dilakukan dengan pengecatan hematoksin-eosin (HE) dengan perbesaran 100x.



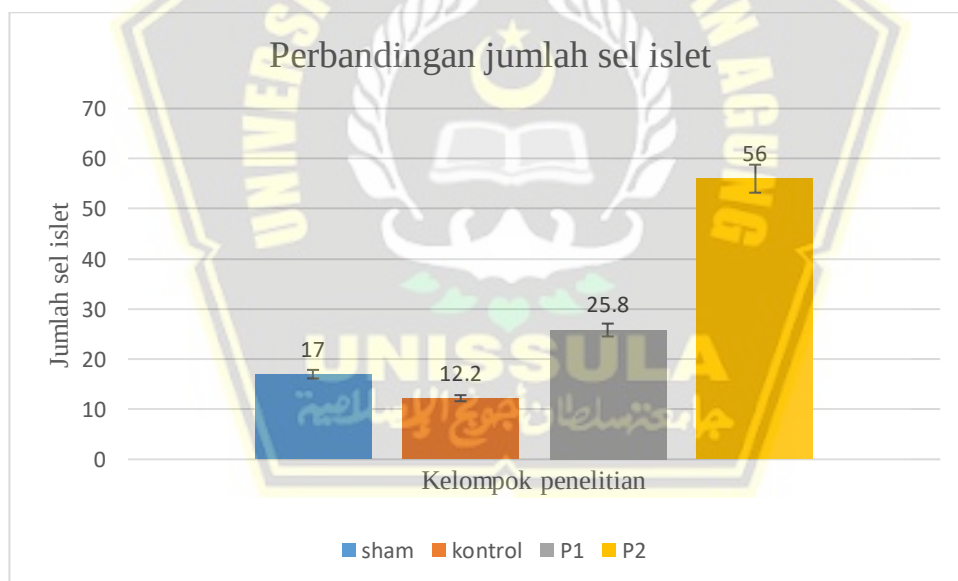
Gambar 4.1. Perbandingan pankreas kelompok sham/sehat (A) dengan pankreas kelompok kontrol (B).

Pada pewarnaan HE, pulau langerhans ditunjukkan dengan sekelompok sel berwarna lebih terang. Dengan skala yang sama (100x) nampak perbedaan ukuran pulau langerhans kelompok sham lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Gambar 4.2. Perbandingan pankreas kelompok P1 (C) dengan pankreas kelompok P2 (D).

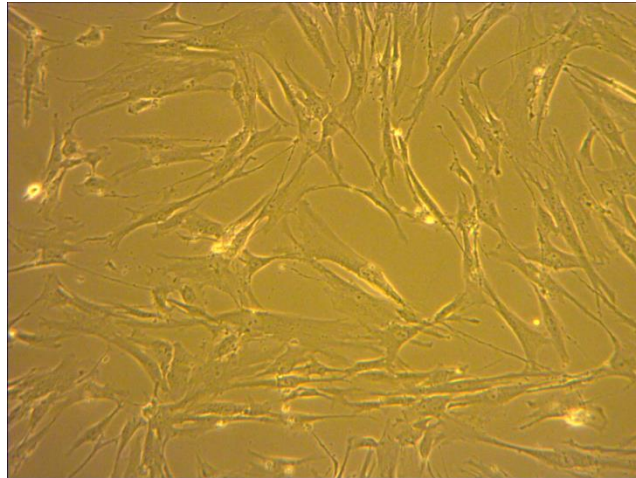
Dengan skala yang sama (100x) nampak perbedaan ukuran pulau langerhans kelompok P2 (1 cc) lebih besar dibandingkan dengan kelompok P1 (0,5 cc). Selain itu populasi sel islet pada kelompok P2 nampak lebih massif dibandingkan seluruh kelompok.



Gambar 4.3. Perbandingan jumlah sel islet pada seluruh kelompok.

4.1.3. Morfologi *Stem Cell*

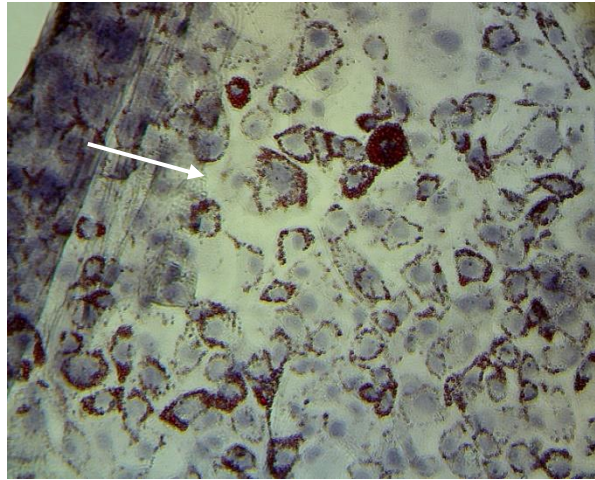
Sel Mesenchymal *Stem Cell* yang dibiakan dalam medium DMEM dan diamati menggunakan mikroskop inveter.



Gambar 4.4. Uji validasi MSCs dengan bentuk menyerupai fibroblas pada perbesaran mikroskop 200x. Tampak gambaran MSCs yang melekat pada permukaan plastik dengan konfluensi 80%.

4.1.4. Uji diferensiasi adipogenik

Sel Mesenchymal *Stem Cell* dibiakkan dalam medium induksi adipogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop inverter. Sel-sel menyerupai mesenkim yang melekat pada mulanya tumbuh sebagai sel dengan bentuk bintang kemudian berkembang menjadi sel fibroblastoid multi-polar. Setelah dilakukan induksi diferensiasi adipogenik, bentuknya berubah menyerupai adiposit. Kemampuan diferensiasi adipogenik merupakan kriteria identifikasi untuk MSC.

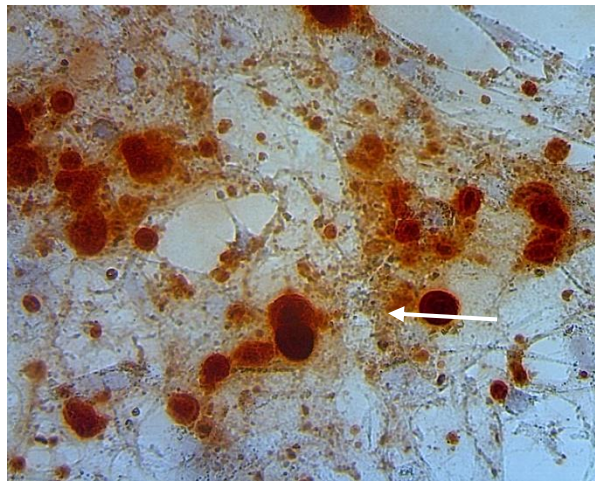


Gambar 4.5. Uji validasi MSCs diferensiasi adipogenik: Perbesaran 200x

Tampak gambaran MSCs yang berdiferensiasi adipogenik ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O*.

4.1.5. Uji diferensiasi osteogenik

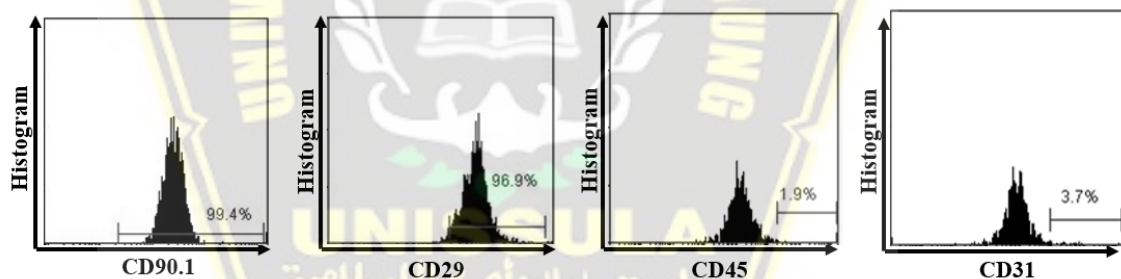
Sel dibiakkan dalam medium induksi osteogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop inverter. Awalnya sel-sel mirip mesenkim yang melekat tumbuh sebagai sel berbentuk gelendong, berkembang menjadi sel fibroblastoid multi-polar. Setelah dilakukan induksi diferensiasi osteogenik, bentuknya berubah menyerupai osteosit. Kemampuan diferensiasi osteogenik merupakan kriteria identifikasi untuk MSC.



Gambar 4.6. Uji validasi MSCs diferensiasi osteogenic; perbesaran 200x.

Tampak gambaran MSCs yang berdiferensiasi osteogenic ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarid Red*.

4.1.6. Uji flowcytometry terhadap marker MSC



Gambar 4.7. Deteksi marker CD90.1, CD29, CD45, dan CD31 menggunakan *flowcytometry*.

Validitas MSC ditunjukkan dengan nilai positif pada CD90.1 dan CD29, sedangkan negatif pada CD45 dan CD31. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi CD.90.1 99,4% dan CD29 96,9%.

4.1.7. Insulin

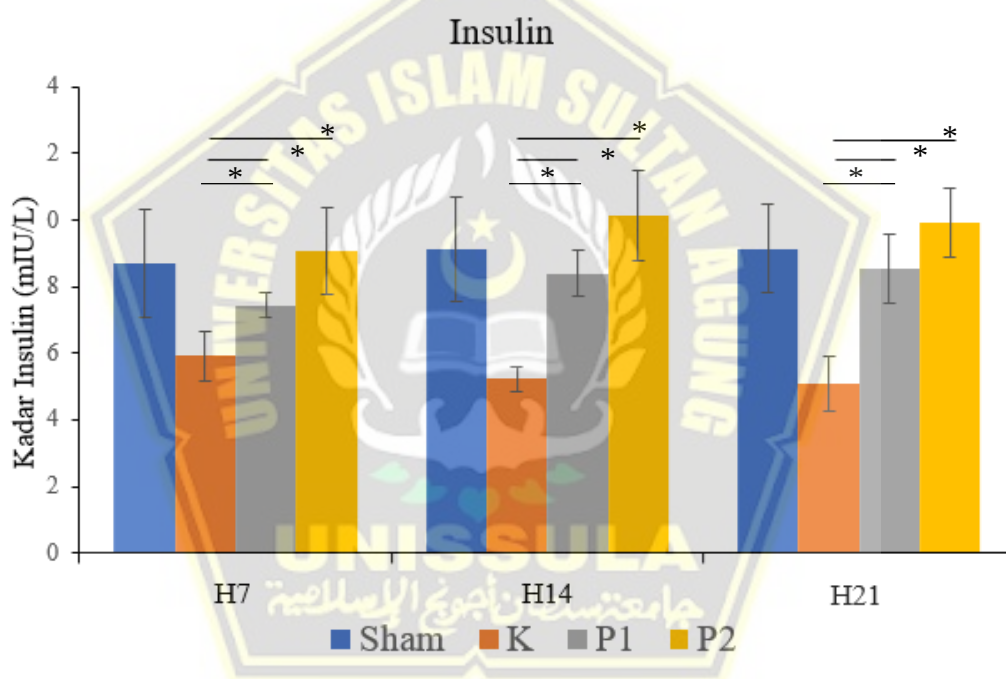
Pengujian kadar insulin menggunakan metode ELISA diperoleh data berupa kadar insulin. Uji insulin bertujuan untuk mengetahui kadar insulin pada tubuh pasien. Terdapat beberapa kondisi yang berhubungan dengan penurunan kadar insulin yang terkait dengan penghancuran sel beta meliputi: pasca pankreatektomi, pankreatitis kronis, destruksi autoimun, dan diabetes tipe 1 (Mansoor, 2001). Dengan kemampuan sekretom meningkatkan viabilitas sel islet pada pankreas yang dapat meningkatkan sekresi insulin yang dirangsang glukosa (Al-Azzawi et al., 2020), maka diharapkan kadar insulin pada penelitian meningkat pada kadarnya sesuai fisiologis tubuh.

Dalam uji deskriptif kadar insulin diuji normalitasnya menggunakan Saphiro-Wilk dan pengujian homogenitasnya menggunakan *Leuvene Statistic*. Hasil dari uji normalitas didapatkan data normal ($P > 0,05$). Sedangkan pada pengujian homogenitas, didapatkan varian tidak homogen di hari ke 7 dengan $P < 0,05$. Data yang normal namun tidak homogen dilakukan uji ANOVA dengan Games Howell. Data uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar insulin yang signifikan di antara semua kelompok ($P < 0,05$) sejak H7 sampai H21. Hasil dari rerata kadar insulin diikuti uji post-hoc ditunjukkan oleh (tabel 4.1) dan (gambar 4.5) berikut. Dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa pada perlakuan 1 dan perlakuan 2 terdapat peningkatan kadar insulin secara signifikan sejak

H7 hingga H21 dibandingkan kelompok kontrol ($P < 0,05$). Sedangkan kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 tidak terjadi peningkatan kadar insulin yang signifikan secara statistik dibandingkan kelompok sham, maupun antar keduanya ($P > 0,05$).

Tabel 4.2. Deskripsi Kadar Insulin Tiap Minggu

Kelompok	H7	H14	H21
	Rerata $\pm$ SD		
Sham	8,71 $\pm$ 1,64	9,11 $\pm$ 1,57	9,15 $\pm$ 1,33
Kontrol	5,92 $\pm$ 0,73	5,22 $\pm$ 0,37	5,10 $\pm$ 0,83
P1	7,45 $\pm$ 0,38	8,40 $\pm$ 0,70	8,53 $\pm$ 1,03
P2	9,09 $\pm$ 1,30	10,13 $\pm$ 1,35	9,93 $\pm$ 1,04

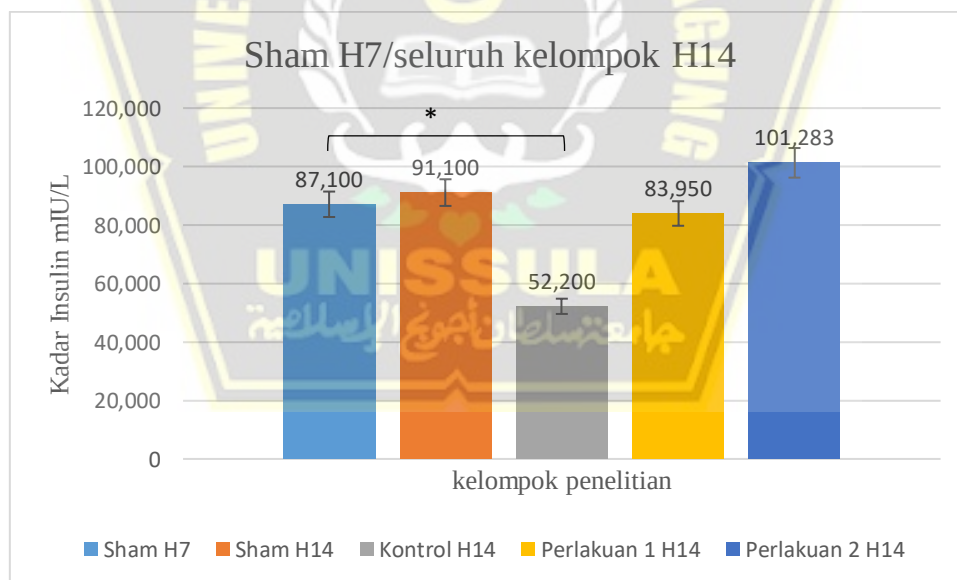


Gambar 4.8. Kadar Insulin pada kelompok; Sham : subyek yang dibiarkan dalam keadaan sehat tanpa perlakuan, K : subyek induksi diabetes tanpa perlakuan terapi, P1 : subyek induksi diabetes yang diberikan perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia-MSC* 0,5 cc, P2 : subyek induksi diabetes yang diberi perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia-MSC* 1 cc.

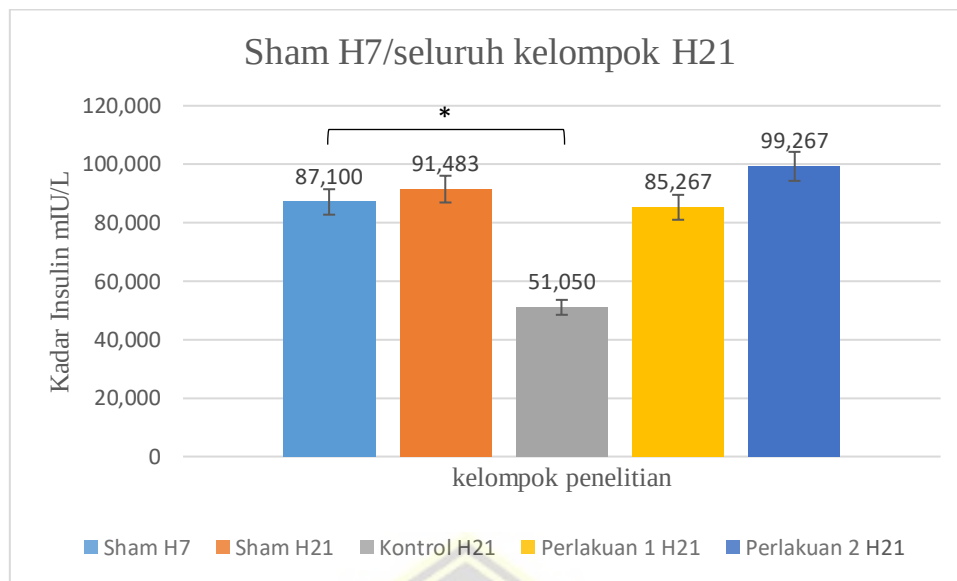
Kadar insulin tikus tiga minggu pengukuran (H7, H14, H21) pada kelompok sham, kontrol, P1, dan P2 setelah injeksi IP sekretom

Hypoxia-MS berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antar kelompok ($P < 0,05$). Kelompok yang memiliki perbedaan signifikan berdasarkan analisis *post-hoc* yaitu kelompok P1 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K pada tiga minggu berurutan ($P = 0,009; 0,000, 0,000$), kelompok P2 lebih tinggi dibandingkan kelompok K pada tiga minggu berurutan ($P = 0,004; 0,001; 0,000$) dan kelompok K yang mengalami penurunan signifikan terhadap kelompok sham pada tiga minggu berurutan ($P = 0,027; 0,005; 0,001$).

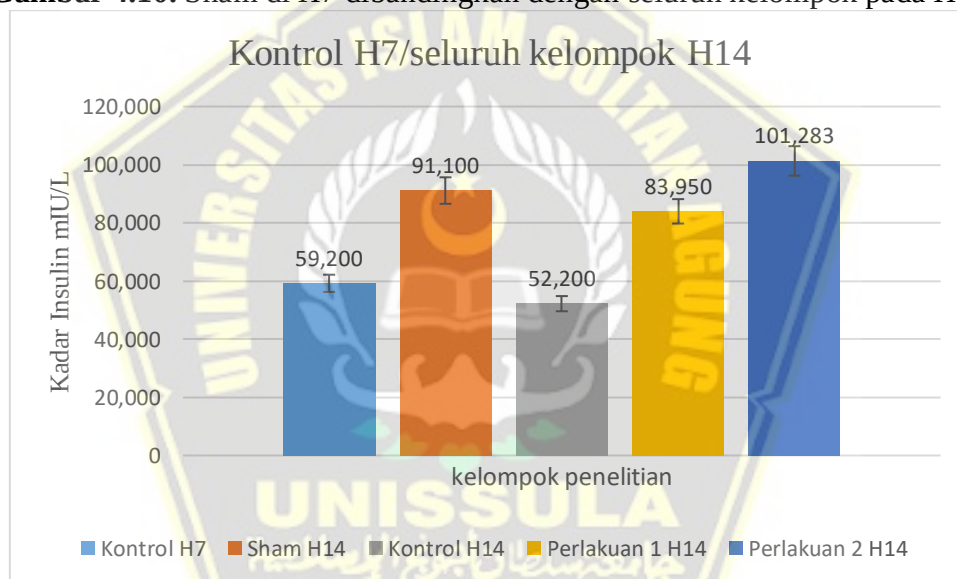
Selain dilakukan pengukuran kadar insulin antar kelompok dalam minggu yang sama, pada penelitian ini dilakukan pengukuran *post hoc* untuk lintas minggu dengan hasil sebagai berikut :



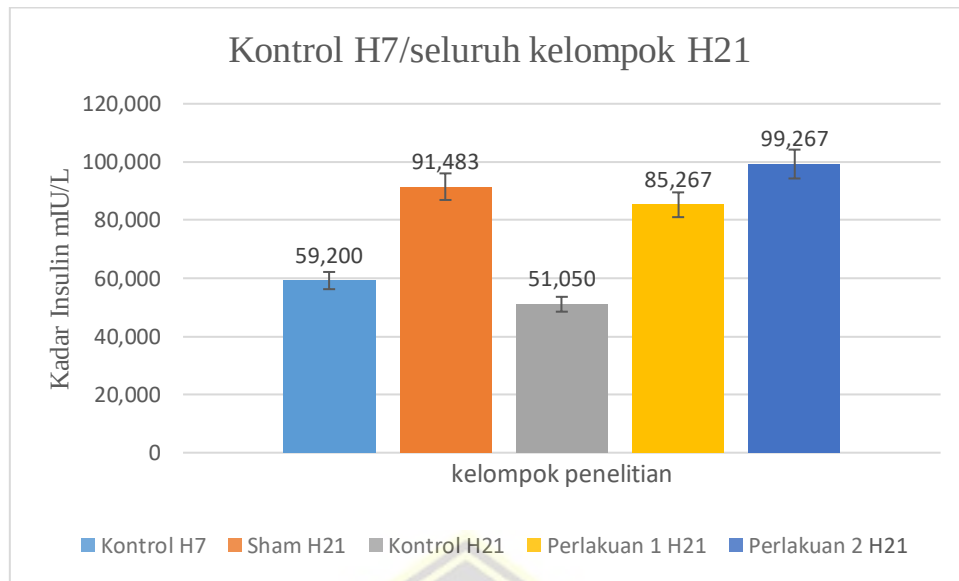
Gambar 4.9. Sham di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14



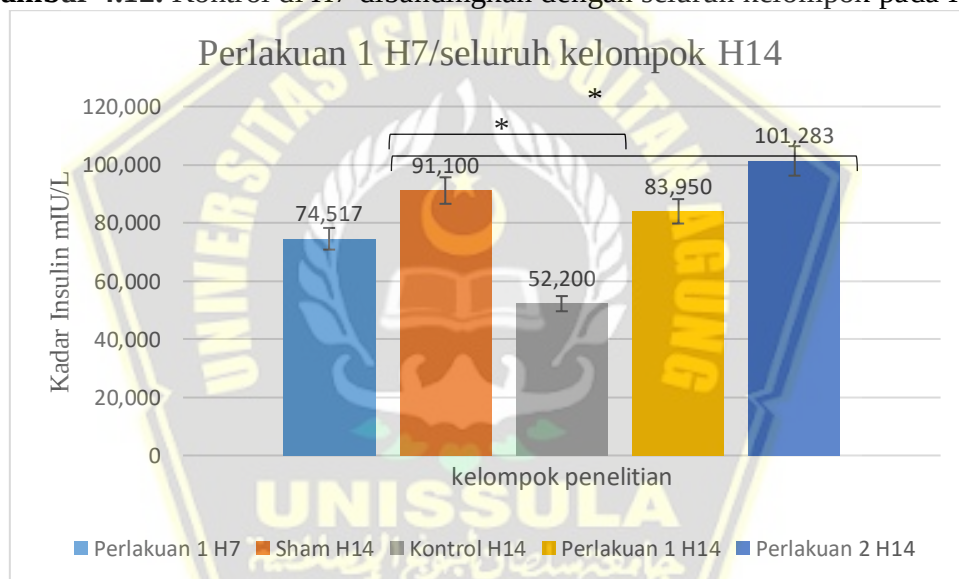
Gambar 4.10. Sham di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21



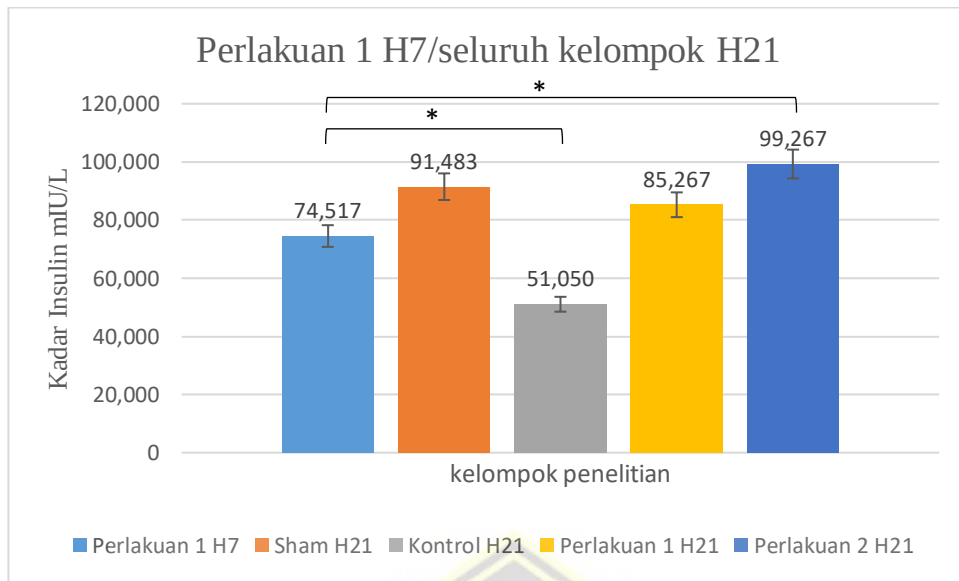
Gambar 4.11. Kontrol di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14



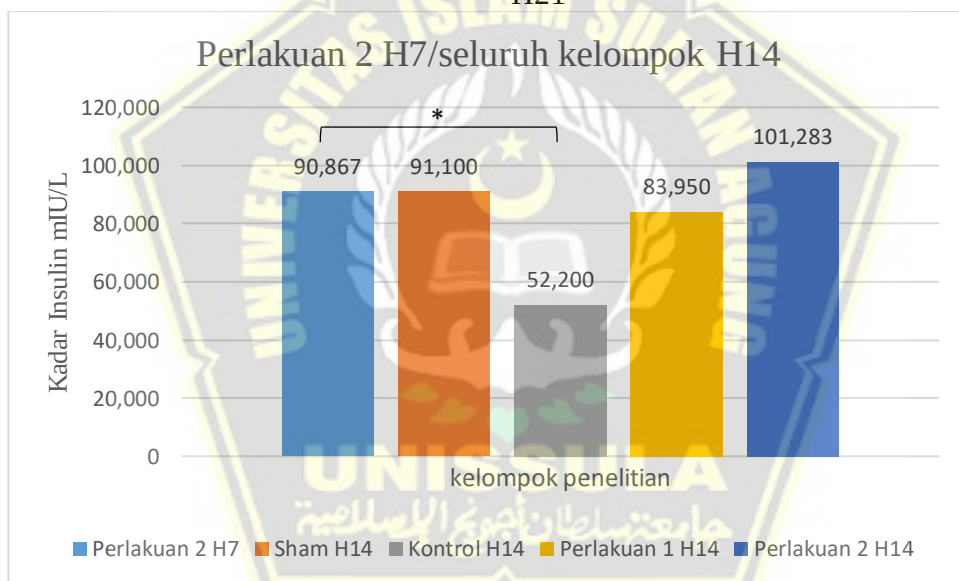
Gambar 4.12. Kontrol di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21



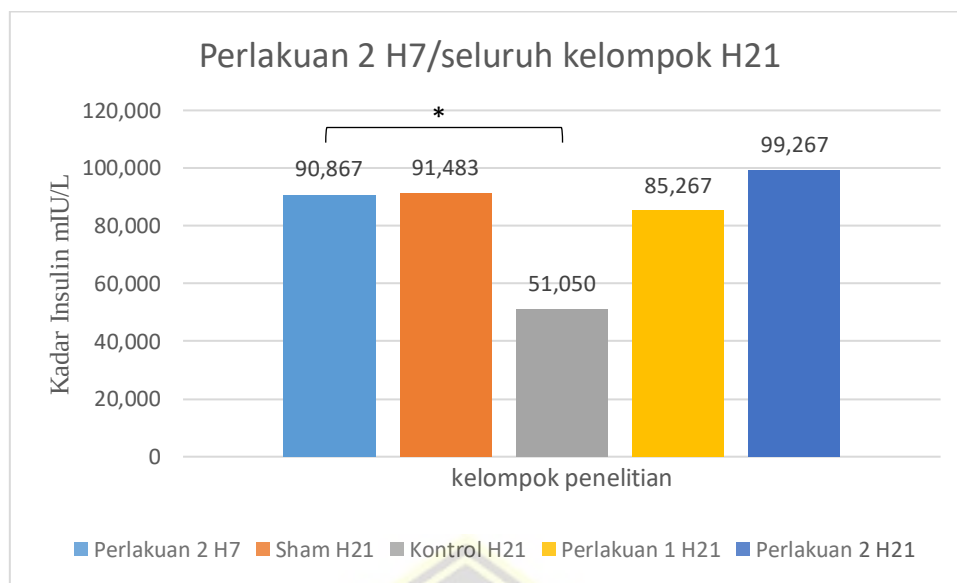
Gambar 4.13. Perlakuan 1 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14



Gambar 4.14. Perlakuan 1 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21



Gambar 4.15. Perlakuan 2 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H14



Gambar 4.16. Perlakuan 2 di H7 dibandingkan dengan seluruh kelompok pada H21

4.2. Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain post-test only control group yaitu membandingkan efek pemberian sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar insulin pada tikus model diabetes tipe 1. Penelitian dilakukan selama empat puluh dua hari dimulai dari induksi diabetes menggunakan STZ selama duapuluh satu hari, dilanjutkan perlakuan selama duapuluh satu hari di tiap awal minggu dan pengambilan sampel darah di akhir minggu. Kelompok penelitian ini meliputi empat kelompok penelitian, yang terdiri dari dua kelompok perlakuan, kelompok satu mendapat injeksi dengan kadar 0,5 ml, sedangkan kelompok dua mendapat injeksi dengan kadar 1 ml sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*, selanjutnya kelompok kontrol yang hanya dibiarkan diabetes tanpa perlakuan dan kelompok sham yang berisi tikus sehat tanpa perlakuan atau

induksi apapun. Penelitian ini menggunakan kelompok kontrol positif disamping kontrol negatif untuk memastikan bahwa kadar insulin hanya disebabkan efek sekretom, bukan senyawa pelarut. Selama perjalanan penelitian tidak didapatkan kondisi sampel yang tidak diharapkan.

Sekretom hipoksia didapatkan dengan mengekstrak sekret MSC yang sudah mengalami hipoksia. MSC yang layak digunakan adalah yang telah tervalidasi dengan melihat kemampuan diferensiasinya menjadi kondrosit, adiposit, atau osteosit dan ekspresi *Cluster of Differentiation* (CD) dari CD90, CD105, CD34, CD73 dengan total >95% dari populasi. MSC yang telah tervalidasi kemudian dilakukan proses hipoksia selama 24 jam lalu diambil sekretnya dengan *tangential flow filtration* (TFF).

Diabetes Mellitus Tipe 1 (DMT1) adalah suatu penyakit yang muncul akibat dari penghancuran secara autoimun pada sel endokrin pankreas, yang menyebabkan defisiensi insulin (Paschou et al., 2018). DMT1 disebabkan oleh sel-T sebagai hasil dari interaksi kompleks antara faktor lingkungan, genom, metabolisme, dan sistem kekebalan yang bervariasi antara individu (Freeman, 2018). Pemberian insulin eksogen masih menjadi pengobatan sebagai *gold standard* diabetes khususnya (tetapi tidak eksklusif) untuk DMT1. Pasien DMT1 memiliki kadar insulin yang rendah, pemberian insulin secara eksogen berfungsi untuk membantu tubuh melakukan metabolismenya. Namun pemberian bolus insulin eksogen pada pasien diabetes dapat menghasilkan serangkaian puncak, baik hiperglikemia maupun hipoglikemia, tanpa pengaturan kadar glukosa darah fisiologis yang konstan dan harmonis.

Pergantian puncak hiper dan hipoglikemia memberi peluang pada tingkat siklus tinggi atau rendahnya glukosa darah, dengan konsekuensi pada mikrosirkulasi yang meningkatkan risiko pengembangan efek samping jangka panjang utama diabetes, seperti nefropati dan neuropati (Donzelli, 2020). Transplantasi islet primer menawarkan pendekatan yang efektif untuk merawat pasien dengan DMT1. Namun, strategi ini terhambat oleh tantangan seperti ketersediaan donor islet yang terbatas, kematian sel islet yang ekstensif, dan engraftment vaskular islet yang buruk setelah transplantasi (Pathak et al., 2019).

Imunomodulator adalah molekul yang merangsang sistem kekebalan tubuh baik sebagai agonis atau antagonis. Immunomodulator telah menjadi perhatian terkait regulasi respon imun dalam penghindaran interaksi yang merugikan antara sistem imun dan sel pankreas. (Sravanthi & Kumar, 2017). Baru-baru ini telah dipastikan bahwa efek terapi dari MSC dilakukan terutama oleh faktor bioaktif terlarut dan vesikel ekstraselularnya, yaitu sekretom (Rahimi et al., 2021). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi sekretom *Hypoxia*-MSC dapat meningkatkan kadar insulin pada tikus yang mengalami penurunan kadar insulin akibat induksi STZ. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar insulin baik pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 terhadap kelompok kontrol mulai minggu pertama hingga ke-tiga. Peningkatan tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan 2 di hari ke-14 dengan kadar insulin $10,13 \pm 1,35$ mIU/L (lihat tabel 4.1), sedangkan peningkatan terendah terjadi pada kelompok perlakuan 1 yaitu $7,45 \pm 0,38$ mIU/L pada hari

ke-7 (lihat tabel 4.1). Semua peningkatan yang telah disebutkan bernilai signifikan secara statistik ($P < 0,05$). Efikasi terapi sekretom *Hypoxia-MS* juga ditunjukkan dengan tidak signifikannya peningkatan kadar insulin pada kelompok perlakuan 1 dan 2 terhadap kelompok sham (tikus sehat) secara statistik ($P > 0,05$) yang menunjukkan peningkatan kadar insulin masih dalam batas aman fisiologis (lihat gambar 4.5). Peningkatan kadar insulin secara keseluruhan ditunjukkan lebih tinggi pada kelompok perlakuan 2 (konsentrasi 1 cc) dibandingkan perlakuan 1 (konsentrasi 0,5 cc), namun tidak didapatkan beda signifikan diantara keduanya. Hal ini menunjukkan pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 secara statistik memberikan efikasi yang sama.

Walaupun efikasi dari kelompok P1 dan P2 sama pada setiap minggu seperti yang telah disebutkan sebelumnya, perbandingan dari P1 dan P2 nampak berbeda pada P1 minggu pertama dibandingkan dengan P2 minggu kedua dan ketiga, dimana kadar insulin kelompok P2 meningkat secara signifikan dibandingkan P1 ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pada minggu berikutnya setelah satu minggu pertama, kelompok P2 mengalami peningkatan efikasi dibandingkan minggu sebelumnya.

Alasan dilakukannya tiga minggu waktu penelitian berkaitan dengan regenerasi pankreas tikus secara fisiologi setelah kerusakan karena STZ. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, induksi STZ dosis rendah (50 mg/kg berat badan), menunjukkan bahwa setelah induksi STZ pada tikus neonatus, hanya hewan jantan yang mengembangkan diabetes secara nyata pada kehidupan dewasa, dimana 70% dari seluruh tikus ini pulih pada 15

minggu setelah munculnya diabetes (Risbud & Bhonde, 2002). Sedangkan penelitian yang baru saja telah dilakukan menunjukkan bahwa dengan terapi sekretom H-MSC dapat meningkatkan kadar insulin secara signifikan dan konsisten selama 3 minggu penelitian.

Sekretom memainkan peran multifaktorial dalam regulasinya terhadap inflamasi. Sekretom dapat mengubah profil sekresi sel dendritik yang mengarah pada peningkatan produksi sitokin anti inflamasi seperti IL-10 dan penurunan produksi sitokin inflamasi seperti IFN- γ (Al-Azzawi et al., 2020). IL-10 yang dikandung sekretom memiliki peran multifaktorial yang dapat melakukan inhibisi sitokin proinflamasi baik melalui penghentian jalur kanonik NF- κ B yang diinduksi TNF- α oleh SOCS-3 maupun pembatalan transkripsi STAT-1 yang diinduksi IFN oleh STAT-3. IL-10 bekerja dengan meningkatkan fosforilasi STAT3 dan mengatur ekspresi *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-3 yang akan mencegah translokasi nuklir NF- κ B (Hovsepian et al., 2013). Selain itu jalur persinyalan IL-10 yang dimediasi STAT3 juga membatalkan presentasi antigen HLA-DR yang diinduksi IFN tanpa bergantung pada jalur pensinyalan NF- κ B klasik (Chan et al., 2010).

TNF- α , IL-1 β , dan IFN-g adalah sitokin yang dapat bekerja secara sinergis selama peradangan sel- β , yang mengarah pada penghancuran sel- β pankreas (Atkinson et al., 2012). Pada penelitian yang dilakukan (Al-Azzawi et al., 2020) sekretom merangsang peningkatan signifikan pada pelepasan insulin sel islet penghasil insulin yang diinduksi dengan 1 g/ml IFN- γ , 100 ng/ml TNF- α selama 24 jam sebelum paparan akut terhadap glukosa. Sebuah

studi sebelumnya menunjukkan bahwa sinergisme IFN- γ /TNF- α merupakan molekul efektor yang terlibat dalam diabetes autoimun. (Xu et al., 2015).

TNF- α dapat mengaktifkan NF- κ B dan merekrut monosit yang memproduksi makrofag M1 dan M2 yang mendorong penghancuran sel β pankreas (Suryavanshi & Kulkarni, 2017). Data terbaru menunjukkan bahwa NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) dapat merangsang pembentukan sel T yang autoreaktif, dan hiperaktivitas sel monosit dan dendritik yang menghasilkan perubahan sekresi sitokin dan presentasi antigen, yang pada akhirnya berkontribusi pada inisiasi diabetes tipe 1 (Zhao et al., 2011). NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang dapat menginduksi ekspresi berbagai gen pro-inflamasi, termasuk sitokin dan kemokin, dan juga berperan dalam regulasi inflamasi. Aktivasi NF- κ B berkontribusi pada proses patogen berbagai penyakit inflamasi (T. Liu, Zhang, Joo, & Sun, 2017). Keluarga NF- κ B terdiri dari lima anggota protein yang beranggotakan : NF- κ B1 (disebut p50), NF- κ B2 (disebut p52), RelA (disebut p65), RelB, dan c-Rel yang saling berinteraksi satu sama lain untuk membentuk homodimerisasi atau heterodimerisasi (Napetschnig & Wu, 2013). Aktivasi NF- κ B (nuklear faktor- κ B) dimediasi oleh dua jalur pensinyalan utama, jalur kanonik dan non-kanonik, yang berbeda dalam mekanisme pensinyalan dan fungsi biologis (Sun, 2017). Dalam jalur kanonik, kompleks IKK kinase yang terdiri dari subunit katalitik IKK α , IKK β , dan subunit pengatur NF- κ B essential modulator (NEMO), adalah komponen inti dari kaskade pensinyalan NF- κ B. Stimulasi dari berbagai reseptor seperti seperti reseptor seperti *Toll Like*

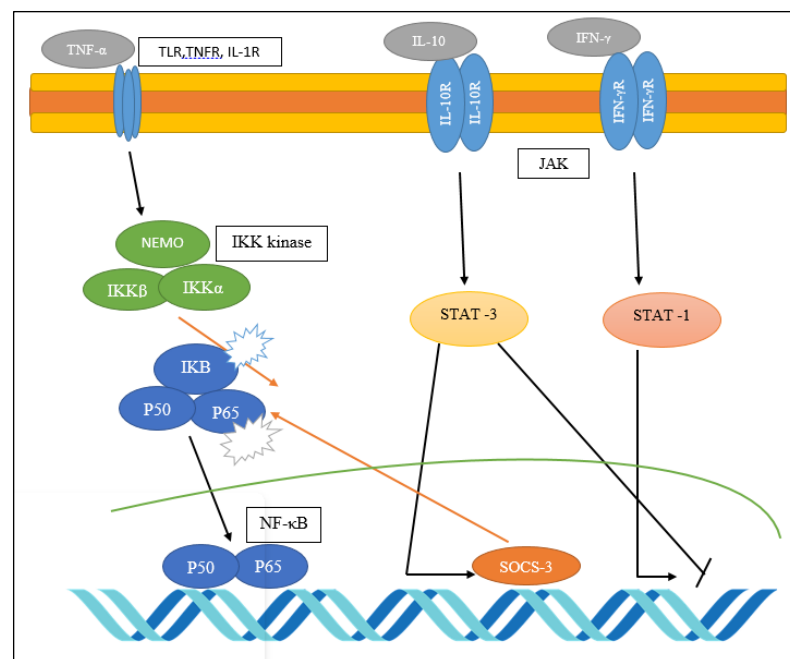
Receptor (TLR) dan reseptor TNF (TNFR), dapat mengaktivasi jalur persinyalan NF- κ B. Mekanisme utama aktivasi NF- κ B kanonik adalah degradasi I κ B α . Dalam proses ini, IKK memfosforilasi I κ B α dan mengarah ke ubiquitinasi melalui mesin degradasi proteasome yang bergantung pada ligase SCF β TrCP. Akibatnya, NF- κ B dilepaskan dan ditranslokasi dari sitoplasma ke nukleus, di mana ia mengikat DNA dan mengatur transkripsi gen untuk melakukan kerjanya (Peng et al., 2020).

Kandungan IL-10 pada sekretom dapat meregulasi jalur JAK-STAT melalui SOCS-3 yang diaktivasi IL-10 (X. Liu et al., 2012). Dalam penelitian yang dilakukan (Hovsepian et al., 2013) menunjukkan SOCS-3 diperlukan untuk penghambatan oleh IL-10 terhadap NF- κ B. IL-10 mampu mengaktifkan STAT3 yang pada gilirannya akan mengaktifkan protein SOCS-3 yang melibatkan atenuasi persinyalan pro-inflamasi. Penelitian yang dilakukan (Sood et al., 2019) menemukan jalur penghambatan dimana persinyalan dapat NF- κ B dihambat melalui mediasi SOCS3 yang mengarahkan degradasi p65 yang dimediasi ubiquitin.

Selain TNF- α , menurut (Yunjuan et al., 2019) IFN- γ memainkan peran penting dalam patogenesis diabetes tipe 1. Persinyalan melalui jalur JAK-STAT oleh IFN- γ pada sel T CD8 $^{+}$, berkontribusi dalam penghancuran sel β pankreas pada diabetes tipe 1 (Ge et al., 2020). *Janus kinase-signal transducer of activation* (JAK-STAT) merupakan jalur persinyalan yang digunakan oleh beragam sitokin, interferon, faktor pertumbuhan, dan molekul terkait untuk menyediakan mekanisme cepat di mana faktor ekstraseluler dapat mengontrol

suatu ekspresi gen tertentu (O'Shea et al., 2015). Mekanisme pengaktifan jalur JAK-STAT diawali dengan JAK yang diaktifkan oleh stimulasi berbagai macam sitokin, salah satunya IFN- γ yang kemudian dilanjutkan fosforilasi STAT yang menghasilkan dimerisasi dan translokasi STAT menuju nukleus untuk memodulasi beragam persinyalan inflamasi dan aktivasi makrofag (Morris et al., 2018; Seif et al., 2017).

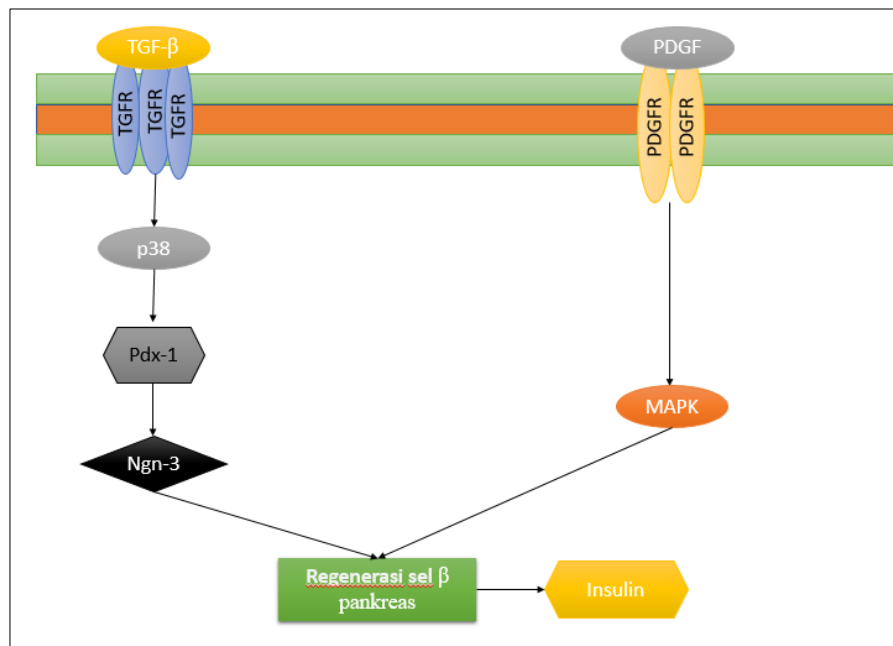
Model yang diusulkan (Chan et al., 2010) menyatakan IL-10 memiliki peran dalam penghambatan sinyal JAK-STAT oleh IFN- γ yang dimediasi STAT3. STAT3 bertindak sebagai mediator dalam jalur pensinyalan JAK-STAT yang diinduksi IL-10. Jalur pensinyalan IL-10 yang dimediasi STAT3 membatalkan presentasi antigen yang diinduksi IFN- γ dari HLA-DR.



Gambar 4.17. Mekanisme IL-10 dalam menghentikan proses inflamasi yang ditimbulkan TNF- α dan IFN- γ pada kasus diabetes tipe 1. Terapi DMT1 harus secara bersamaan baik mengatasi intoleransi imun maupun memperbaiki kembali massa sel beta, yang serupa dengan

penyembuhan luka (Cobo-vuilleumier & Gauthier, 2020). Telah disebutkan sebelumnya bahwa IL-10 merupakan immunomodulator penting dalam terapi DMT1. Bersamaan dengan hal tersebut peran regeneratif sekretom dalam terapi DMT1 dilakukan oleh TGF- β dan PDGF yang merupakan molekul penting sekretom dalam pembentukan sel β pankreas.

TGF- β dengan jalur persinyalan *mitogen-activating protein kinase* (MAPK) berinteraksi dengan reseptornya menimbulkan proses kaskade persinyalan p38, ERK dan JNK (Huang & Chen, 2012). P38 dari jalur MAPK yang teraktivasi menghasilkan kenaikan regulasi neurogenin3 (Ngn-3) dan ekspresi *pancreatic and duodenal homeobox-1* (PDX-1) (Dadheech et.al, 2015; Zhou et al., 2013). Ngn-3 dan PDX-1 adalah faktor transkripsi yang memiliki peran penting dalam diferensiasi, regenerasi, dan pembentukan sel β pankreas (Kubo et al., 2011). PDGF dengan jalur persinyalan serupa (MAPK) juga berperan dalam proses regenerasi dan proliferasi terhadap sel β pankreas (Benthuisen et.al., 2016). Pada akhirnya proliferasi pada sel β pankreas dapat membawa pada kenaikan kembali kapasitas sekresi insulin (Boland, Rhodes, & Grimsby, 2017).



Gambar 4.18. Mekanisme regenerasi sel β oleh sekretom

Berdasarkan sifat imunomodulator dan regeneratif sekretom yang telah dijelaskan, penelitian ini selaras dengan penelitian yang sebelumnya telah dilakukan (Al-Azzawi et al., 2020) dan (Boland et al., 2017) dimana sekretom dapat menghambat terjadinya inflamasi berlebih yang timbul pada pasien diabetes tipe 1 dan meningkatkan proliferasi dari sel β pankreas yang rusak, yang pada akhirnya dapat meningkatkan sekresi insulin oleh sel β pankreas.

Oleh karena itu penelitian ini dapat membuktikan peningkatan insulin oleh sekretom Hypoxia-MSC pada tikus yang mengalami diabetes tipe 1.

4.2.1. Beda penelitian terdahulu

Pada penelitian sebelumnya terdapat penelitian mengenai terapi injeksi sekretom normoksik terhadap *insulin positive cells* melalui intra peritoneal pada tikus diabetes yang diinduksi STZ dengan hasil bahwa terapi kelompok injeksi sekretom intraperitoneal

meningkatkan jumlah *insulin positive cells* secara signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol (Hashemi et al., 2020).

4.2.2. Keterbatasan Penelitian

- 4.2.2.1. Penelitian ini memiliki tidak memiliki kelompok terapi sekretom normoksia sebagai pembanding untuk menguatkan efikasi terapi sekretom hipoksia.
- 4.2.2.2. Penelitian dengan model terapi sekretom (baik normoksia maupun dengan induksi lainnya) pada tikus model diabetes tipe 1 dengan melihat kadar serum insulin belum pernah dilakukan pada penelitian-penelitian, sehingga belum ada literatur yang bisa menjadi pembanding yang tepat pada penelitian ini.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

- 5.1.1. Terdapat pengaruh sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 0,5 cc terhadap kadar insulin pada diabetes mellitus tipe 1 berupa peningkatan kadar serum insulin.
- 5.1.2. Terdapat pengaruh sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 1 cc terhadap kadar insulin pada diabetes mellitus tipe 1 berupa peningkatan kadar serum insulin.
- 5.1.3. Peningkatan kadar serum insulin paling tinggi dihasilkan dengan terapi sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 1 cc.
- 5.1.4. Tidak terdapat beda signifikan secara statistik antara pemberian sekretom dosis 0,5 cc dengan 1 cc pada peningkatan kadar insulin.

5.2. Saran

Terdapat kekurangan-kekurangan dalam penelitian yang telah dilakukan yang dapat diperbaiki pada penelitian-penelitian berikutnya berupa:

- 5.2.1. Penambahan kelompok terapi sekretom normoksia sebagai pembandingan efikasi sekretom hipoksia.
- 5.2.2. Penambahan waktu penelitian untuk mengetahui apakah dalam terapi ini akan terjadi penurunan kadar insulin yang konsisten pada minggu-minggu tertentu.

5.2.3. Penambahan variasi waktu terminasi sampel pasca injeksi sekretom
hipoksia

DAFTAR PUSTAKA

- Aghazadeh, Y., & Nostro, M. C. (2017). Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Current Diabetes Reports*, 17(6). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0863-6>
- Ahangar, P., & Mills, S. J. (2020). *Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair*.
- Al-Azzawi, B., Mcguigan, D. H., Manderson Koivula, F. N., Elttayef, A., Dale, T. P., Yang, Y., ... Forsyth, N. R. (2020). *The Open Stem Cell Journal The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism*. 6, 1–12. <https://doi.org/10.2174/1876893802006010001>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., & Khoury, M. (2017). Antimicrobial activity of mesenchymal *Stem Cells*: Current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00339>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Martin, A., Contreras, L., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2015). Combination therapy of menstrual derived mesenchymal *Stem Cells* and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 199. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0192-0>
- Andoh, T. (2016). *Subchapter 19A - Insulin* (Y. Takei, H. Ando, & K. B. T.-H. of H. Tsutsui, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00148-3>
- Association, A. D. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(SUPPL.1), 81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Association, A. D. (2018). Good to Know: Factors Affecting Blood Glucose. *Clinical Diabetes*, 36(2), 202–202. <https://doi.org/10.2337/cd18-0012>
- Atkinson, M., Bluestone, J., Eisenbarth, G., Hebrok, M., Herold, K., Accili, D., ... Rhodes, C. (2012). How does type 1 diabetes develop? The notion of homicide or beta-cell suicide revisited (vol 60, pg 1370, 2011). *Diabetes*, 61, 1648.
- Benavides-Castellanos, M. P., Garzón-Orjuela, N., & Linero, I. (2020). Effectiveness of mesenchymal *Stem Cell*-conditioned medium in bone regeneration in animal and human models: a systematic review and meta-analysis. *Cell Regeneration*, 9(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13619-020-00047-3>

- Benthuisen, J. R., Carrano, A. C., & Sander, M. (2016). Advances in β cell replacement and regeneration strategies for treating diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(10), 3651–3660. <https://doi.org/10.1172/JCI87439>
- Berebichez-Fridman, R., Gómez-García, R., Granados-Montiel, J., Berebichez-Fastlicht, E., Olivos-Meza, A., Granados, J., ... Ibarra, C. (2017). The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells - Their Current Uses and Potential Applications. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2638305>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal Stem Cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98–103. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Boland, B. B., Rhodes, C. J., & Grimsby, J. S. (2017). The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Molecular Metabolism*, 6(9), 958–973. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.04.010>
- Care, D., & Suppl, S. S. (2021). 2 . *Classification and Diagnosis of Diabetes : Standards of Medical Care in Diabetes d 2021*. 44(January), 15–33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- Chan, L. L. Y., Cheung, B. K. W., Li, J. C. B., & Lau, A. S. Y. (2010). A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN- γ -induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(2), 303–311. <https://doi.org/10.1189/jlb.1009659>
- Chen, P. S., Chiu, W. T., Hsu, P. L., Lin, S. C., Peng, I. C., Wang, C. Y., & Tsai, S. J. (2020). Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00658-7>
- Cobo-vuilleumier, N., & Gauthier, B. R. (2020). Time for a paradigm shift in treating type 1 diabetes mellitus: coupling in inflammation to islet regeneration. *Metabolism*, 104, 154137. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154137>
- D. Edward, Lavar; Secres, A. M. (2018). Stem Cell–conditioned media as a potential antiaging technology in skin care. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(3), AB269. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.05.1067>

- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- Dadheech, N., Srivastava, A., Paranjape, N., Gupta, S., & Dave, A. (2015). *Swertisin an Anti-Diabetic Compound Facilitate Islet Neogenesis from Pancreatic Stem / Progenitor Cells via p-38 MAP Kinase- SMAD Pathway: An In-Vitro and In-Vivo Study*. 1, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128244>
- Dağışan, S., & Erbaş, O. (2021). *Insulin Structure , Function and Diabetes Models in Animals*. (January). <https://doi.org/10.5606/jebms.2020.75622>
- Diabetes, D. O. F. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
- Diagnosis | ADA. (n.d.). Retrieved April 8, 2021, from <https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donzelli, E. (2020). *Mesenchymal Stem Cells : A Trump Card for the Treatment of Diabetes ?*
- Egan, A. M. (2018). *What is diabetes ? Key points*. 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.002>
- Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the secretome of mesenchymal *Stem Cells* and its potential applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>
- Fabian, Z. (2019). The Signaling Nature of Cellular Metabolism: The Hypoxia Signaling. In *Cell Signalling - Thermodynamics and Molecular Control*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79952>
- Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. (2018). Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
- Freeman. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1117/12.2549369>.Hyperspectral
- Fu, Z., R. Gilbert, E., & Liu, D. (2012). Regulation of Insulin Synthesis and

- Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53. <https://doi.org/10.2174/15733998130104>
- Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*, 1(4), 1–21. <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., ... Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Ge, T., Jhala, G., Fynch, S., Akazawa, S., Litwak, S., Pappas, E. G., ... Thomas, H. E. (2020). The JAK1 Selective Inhibitor ABT 317 Blocks Signaling Through Interferon- γ and Common γ Chain Cytokine Receptors to Reverse Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Frontiers in Immunology*, 11, 588543. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588543>
- Giwa, A. M., Ahmed, R., Omidian, Z., Majety, N., Karakus, K. E., Omer, S. M., ... Hamad, A. R. A. (2020). Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. *World Journal of Diabetes*, 11(1), 13–25. <https://doi.org/10.4239/wjd.v11.i1.13>
- González-González, A., García-Sánchez, D., Dotta, M., Rodríguez-Rey, J. C., & Pérez-Campo, F. M. (2020). Mesenchymal *Stem Cells* secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 12(12), 1439–1690. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>
- Gupta, N., Krasnodembskaya, A., Kapetanaki, M., Mouded, M., Tan, X., Serikov, V., & Matthay, M. A. (2012). Mesenchymal *Stem Cells* enhance survival and bacterial clearance in murine *Escherichia coli* pneumonia. *Thorax*, 67(6), 533–539. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201176>
- Gvazava, I. G., Rogovaya, O. S., Borisov, M. A., Vorotelyak, E. A., & Vasiliev, A. V. (2018). Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and rodent experimental models. *Acta Naturae*, 10(1), 24–33. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-1-24-33>
- Hashemi, S. M., Hassan, Z. M., Hossein-Khannazer, N., Pourfathollah, A. A., & Soudi, S. (2020). Investigating the route of administration and efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal *Stem Cells* and conditioned medium in type 1 diabetic mice. *Inflammopharmacology*, 28(2), 585–601. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00661-x>
- Hawkins, K. E., Sharp, T. V., & McKay, T. R. (2013). The role of hypoxia in *Stem Cell* potency and differentiation. *Regenerative Medicine*, 8(6), 771–782. <https://doi.org/10.2217/rme.13.71>

- Hovsepian, E., Penas, F., Siffo, S., Mirkin, G. A., & Goren, N. B. (2013). IL-10 inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079445>
- Huang, F., & Chen, Y. (2012). *Regulation of TGF- β receptor activity*. 1–10.
- Husein, R., DepkesRI, Soelistijo, S. A., Novida, H., Rudijanto, A., BPJS, ... Malanda, B. (2016). Consultation Notes to the MoH Indonesia. In *Department for Management of NCD, Disability, Violence and Injury Prevention* (Vol. 138). Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822718302031%0Ahttp://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html%0Ahttp://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html%0Ahttps://apps.who.int/iris/handle/10665/204871%0Ahttp://www.w
- Ishiuchi, N., Nakashima, A., Doi, S., Yoshida, K., Maeda, S., Kanai, R., ... Masaki, T. (2020). Hypoxia-preconditioned mesenchymal *Stem Cells* prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01642-6>
- Jiang, C. M., Liu, J., Zhao, J. Y., Xiao, L., An, S., Gou, Y. C., ... Wang, J. (2015). Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal *Stem Cells*. *Journal of Dental Research*, 94(1), 69–77. <https://doi.org/10.1177/0022034514557671>
- Joseph, A., Baiju, I., Bhat, I. A., Pandey, S., Bharti, M., Verma, M., ... Taru Sharma, G. (2020). Mesenchymal *Stem Cell*-conditioned media: A novel alternative of *Stem Cell* therapy for quality wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 235(7–8), 5555–5569. <https://doi.org/10.1002/jcp.29486>
- Kahanovitz, L., Sluss, P. M., & Russell, S. J. (2017). Type 1 diabetes-a clinical perspective. *Point of Care*, 16(1), 37–40. <https://doi.org/10.1097/POC.0000000000000125>
- Katuchova, J., Harvanova, D., Spakova, T., Kalanin, R., Farkas, D., Durny, P., & Radonak, J. (2015). *of Type 1 Diabetes Mellitus*. (March). <https://doi.org/10.1007/s12022-015-9362-y>
- Koeck, P., Bastiaens, H., Benhalima, K., Cloetens, H., Feyen, L., Sunaert, P., ... Nobels, F. (2015). *Richtlijn Diabetes Mellitus Type 2*. Retrieved from [https://domusmedica.be/sites/default/files/Richtlijn Diabetes_0.pdf](https://domusmedica.be/sites/default/files/Richtlijn%20Diabetes_0.pdf)
- Kubo, A., Stull, R., Takeuchi, M., Bonham, K., Gouon-evans, V., Iwano, M., ...

- Snodgrass, R. (2011). *Pdx1 and Ngn3 Overexpression Enhances Pancreatic Differentiation of Mouse ES Cell-Derived Endoderm Population*. 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024058>
- Kuntardjo, N., Dharmana, E., Chodidjah, C., Nasihun, T. R., & Putra, A. (2019). TNF- α -Activated MSC-CM Topical Gel Effective in Increasing PDGF Level, Fibroblast Density, and Wound Healing Process Compared to Subcutaneous Injection Combination. *Majalah Kedokteran Bandung*, 51(1), 1–6. <https://doi.org/10.15395/mkb.v51n1.1479>
- Lee, Y. Bin, Han, K., Kim, B., Lee, S. E., Jun, J. E., Ahn, J., ... Kim, J. H. (2019). Risk of early mortality and cardiovascular disease in type 1 diabetes : a comparison with type 2 diabetes , a nationwide study. *Cardiovascular Diabetology*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0953-7>
- Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(5), 268–283. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y>
- Li, Y., Wang, F., Liang, H., Tang, D., Huang, M., Zhao, J., ... Liu, Y. (2021). *Efficacy of mesenchymal Stem Cell transplantation therapy for type 1 and type 2 diabetes mellitus : a meta-analysis*. 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13287-021-02342-5>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. (2017). *NF- κ B signaling in inflammation*. (April). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, X., Qu, X., Chen, Y., Liao, L., Cheng, K., Shao, C., ... Zhao, R. C. H. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(3), 1182–1192. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102996>
- Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). *A review of therapeutic effects of mesenchymal Stem Cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods*. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>
- Mansoor, I. (2001). Evidence-Based Medicine. *Saudi Medical Journal*, 22(6), 481–485.
- Moini, J. (2019). Pathophysiology of Diabetes. *Epidemiology of Diabetes*, 25–43. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816864-6.00003-1>
- Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Science : A Publication of*

- the Protein Society*, 27(12), 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>
- Musiał-wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). *The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies*. 28(7), 801–812. <https://doi.org/10.1177/0963689719837897>
- Napetschnig, J., & Wu, H. (2013). Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 443–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338>
- O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V, Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine*, 66, 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
- Other types of diabetes | Diabetes UK. (n.d.). Retrieved April 6, 2021, from <https://www.diabetes.org.uk/diabetes-the-basics/other-types-of-diabetes>
- Paschou, S. A., Papadopoulou-marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanakagantenbein, C. (2018). *On type 1 diabetes mellitus pathogenesis*. 38–46. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
- Pathak, V., Pathak, N. M., O'Neill, C. L., Guduric-Fuchs, J., & Medina, R. J. (2019). Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 12. <https://doi.org/10.1177/1179551419844521>
- Pavlacky, J., & Polak, J. (2020). Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. *Frontiers in Endocrinology*, 11(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00057>
- Peng, C., Ouyang, Y., Lu, N., & Li, N. (2020). The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. *Frontiers in Immunology*, 11(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01387>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Pulungan, A. (2013). Increasing incidence of DM type 1 in Indonesia. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2013(S1), O12. <https://doi.org/10.1186/1687-9856-2013-s1-o12>
- Quianzon, C. C., & Cheikh, I. (2012). *History of insulin*. 1(6), 1–3. <https://doi.org/10.3402/jchimp.v2i2.18701>

- Rahimi, B., Panahi, M., Saraygord-Afshari, N., Taheri, N., Bilici, M., Jafari, D., & Alizadeh, E. (2021). The secretome of mesenchymal *Stem Cells* and oxidative stress: challenges and opportunities in cell-free regenerative medicine. *Molecular Biology Reports*, 48(7), 5607–5619. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06360-7>
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(November 2015), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Santoso, H. B., Rahmi, R. A., & Kartikasari, D. (2020). *Blood glucose level of white rats (Rattus norvegicus) after giving catfish biscuit (Pangasius hypophthalmus)*. 04005, 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/bioconf/20202004005>
- Saparov, A., Ogay, V., Nurgozhin, T., Jumabay, M., & Chen, W. C. W. (2016). Preconditioning of human mesenchymal *Stem Cells* to enhance their regulation of the immune response. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3924858>
- Sapra, A., & Bhandari, P. (2021). Diabetes Mellitus. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31855345>
- Secrest, A. M., Washington, R. E., & Orchard, T. J. (2014). Chapter 35: Mortality in Type 1 Diabetes. *Diabetes in America*, 1–16.
- Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., & Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0177-y>
- Sen, B., Paradise, C. R., Xie, Z., Sankaran, J., Uzer, G., Styner, M., ... Rubin, J. (2020). β -Catenin Preserves the Stem State of Murine Bone Marrow Stromal Cells Through Activation of EZH2. *Journal of Bone and Mineral Research*, 35(6), 1149–1162. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3975>
- Sood, V., Lata, S., Ramachandran, V. G., & Banerjee, A. C. (2019). Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) degrades p65 and regulate HIV-1 replication. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00114>
- Speight, J., & Pouwer, F. (2019). Diabetes mellitus, type 1. In *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine: Third Edition* (pp. 477–480). <https://doi.org/10.1016/b978-3-437-42502-8.00153-4>
- Sravanthi, V., & Kumar, H. M. S. (2017). Immunomodulators in Prophylaxis and Therapy of Type-1 Diabetes. In *Discovery and Development of*

Antidiabetic Agents From Natural Products.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809450-1.00008-9>

- Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., & Altaner, C. (2014). Comparison of human mesenchymal *Stem Cells* derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(3), 373–377. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>
- Sun, S.-C. (2017). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>
- Sung, D. K., Chang, Y. S., Sung, S. I., Yoo, H. S., Ahn, S. Y., & Park, W. S. (2016). Antibacterial effect of mesenchymal *Stem Cells* against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta- defensin- 2 via toll- like receptor 4 signalling. *Cellular Microbiology*, 18(3), 424–436. <https://doi.org/10.1111/cmi.12522>
- Suryavanshi, S. V, & Kulkarni, Y. A. (2017). NF- κ B: A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 798. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00798>
- Sutton, M. T., Fletcher, D., Ghosh, S. K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., ... Bonfield, T. L. (2016). Antimicrobial Properties of Mesenchymal *Stem Cells*: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment. *Stem Cells International*, 2016, 5303048. <https://doi.org/10.1155/2016/5303048>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal *Stem Cells* - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Utiger, R. D. (2020). insulin | Definition, Structure, & Function | Britannica. Retrieved April 23, 2021, from <https://www.britannica.com/science/insulin>
- Vargas, E., & Carrillo Sepulveda, M. A. (2018). Biochemistry, Insulin, Metabolic Effects. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30252239>
- Vasiljević, J., Torkko, J. M., Knoch, K. P., & Solimena, M. (2020). The making of insulin in health and disease. *Diabetologia*, 63(10), 1981–1989. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05192-7>
- Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., O'Brien, T., & Samali, A. (2011). Cytokine-Induced γ -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes

- Mellitus. In *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. <https://doi.org/10.5772/22765>
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal Stem Cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
- Wada, N., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2013). Immunomodulatory effects of Stem Cells. *Periodontology* 2000, 63(1), 198–216. <https://doi.org/10.1111/prd.12024>
- Waseem, M., Khan, I., Iqbal, H., Ejaz, S., Usman, S., Ahmed, N., ... Salim, A. (2016). Hypoxic Preconditioning Improves the Therapeutic Potential of Aging Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Streptozotocin-Induced Type-1 Diabetic Mice. *Cellular Reprogramming*, 18(5), 344–355. <https://doi.org/10.1089/cell.2016.0002>
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 8, 181–188. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S82272>
- Xu, A., Zhu, W. E. I., Li, T., Li, X., Cheng, J., Li, C., ... Liu, L. I. (2015). *Interleukin-10 gene transfer into insulin-producing β cells protects against diabetes in non-obese diabetic mice*. 3881–3889. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3809>
- Yang, J. (2014). Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 121). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800101-1.00005-3>
- Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2016, March 1). Mesenchymal Stem Cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, Vol. 2, pp. 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
- Zhao, Yunjuan, Xie, Y., & Li, W. (2019). Liraglutide Exerts Potential Anti-inflammatory Effect in Type 1 Diabetes by Inhibiting IFN- γ Production via Suppressing JAK-STAT Pathway. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 19(5), 656–664. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190301115654>
- Zhao, Yuxing, Krishnamurthy, B., Mollah, Z. U. A., Kay, T. W. H., & Thomas, H. E. (2011). NF- κ B in type 1 diabetes. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10(3), 208–217. <https://doi.org/10.2174/187152811795564046>

Zhou, G., Wang, H., Liu, S.-H., Shahi, K. M., Lin, X., Wu, J., ... Brunicardi, F. C. (2013). p38 MAP kinase interacts with and stabilizes pancreatic and duodenal homeobox-1. *Current Molecular Medicine*, 13(3), 377–386.