

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*
CELL TERHADAP JUMLAH SEL BETA PANKREAS TIKUS MODEL
DIABETES TIPE 1**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Rini Puspitasari Dewi

30101900166

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2023

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL CELL*
TERHADAP JUMLAH SEL BETA PANKREAS TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh
Rini Puspitasari Dewi
30101900166
Telah dipertahankan di depan dewan penguji
Pada tanggal 30 Januari 2023
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Anggota Tim Penguji



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



dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A

Pembimbing II



dr. Nur Anna Chalimah Sa'dyah,
Sp.PD-KEMD



dr. Ratnawati, M.Kes

Semarang,

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH., Sp.KF

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini saya:

Nama : Rini Puspitasari Dewi

NIM : 30101900166

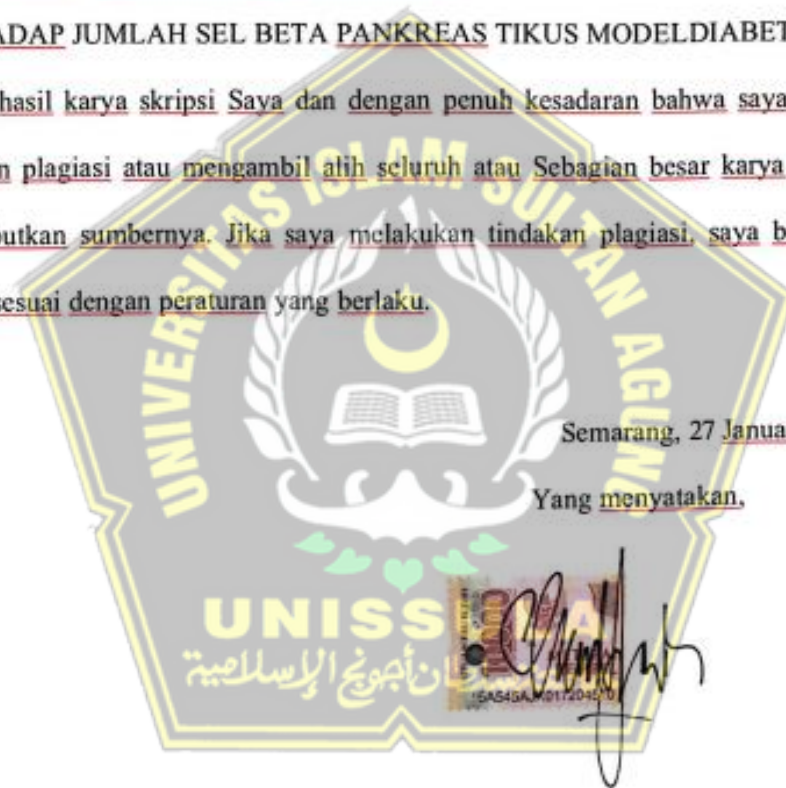
Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

“PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL TERHADAP JUMLAH SEL BETA PANKREAS TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1”

adalah hasil karya skripsi Saya dan dengan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau Sebagian besar karya tulis orang tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Semarang, 27 Januari 2022

Yang menyatakan,



Rini Puspitasari Dewi

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 JUMLAH SEL BETA PANKREAS TIKUS MODEL DIABETES TIPE 1”

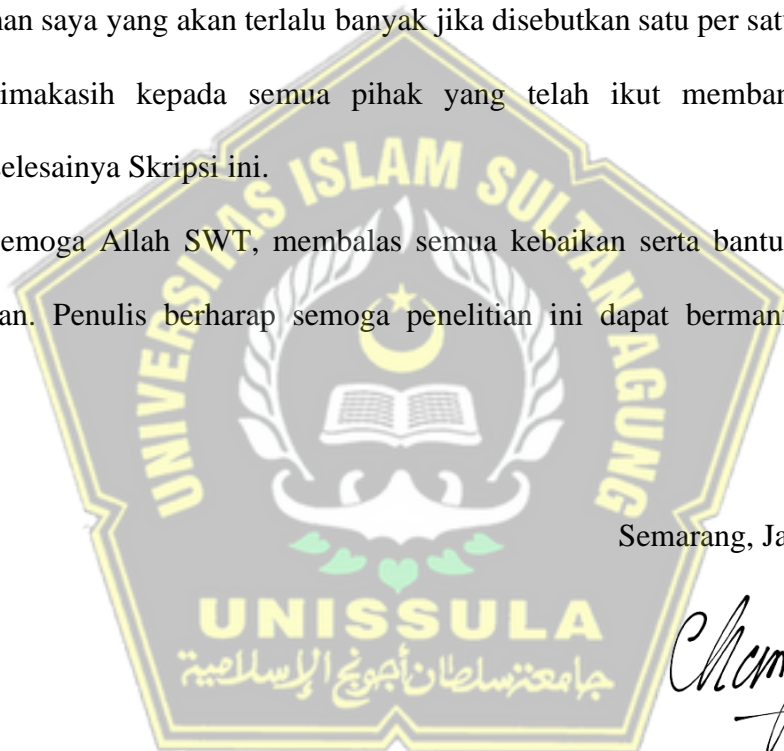
Penulis menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak yang telah memberi bantuan, bimbingan, dorongan, dan petunjuk sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan baik. Ucapan terimakasih penulis diberikan kepada :

1. Kedua orang tua saya tercinta Ibunda Nining Eka Wati dan Ayahanda Fathurohman, dan kakak saya Dhani Fathurohman 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 , selaku dosen pembimbing I dan dr. Nur Anna Chalimah Sa'dyah, Sp.PD-KEMD 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 membantu setiap kesulitan dalam penulisan.

5. Terimakasih kepada teman-teman tersayang, jajaran mahasiswa FK Unissula Angkatan 2019 dan jajaran Asisten Laboratorium Patologi Anatomi 2018 & 2019 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, Januari 2023

Rini Puspitasari Dewi

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN.....	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Diabetes Melitus.....	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Klasifikasi.....	5
2.2. Diabetes Melitus Tipe-1	7
2.2.1. Definisi	7
2.2.2. Etiologi.....	8
2.2.3. Patofisiologi.....	9
2.2.4. Terapi.....	10
2.3. Diabetes Melitus Tipe-2	11

2.3.1	Definisi	11
2.3.2	Etiologi	12
2.3.3	Patofisiologi.....	12
2.4.	Diagnosis	13
2.4.1	A1C	13
2.4.2	Glukosa Plasma Puasa/ <i>fasting plasma glucose</i> (FPG)	13
2.4.3	Tes Toleransi Glukosa Oral/ <i>Oral Glucose Tolerance Test</i> (OGTT).....	14
2.4.4	Gula Darah Sewaktu (GDS)	14
2.5.	Streptozotocin.....	15
2.6.	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>	15
2.6.1	Definisi	15
2.6.2	Sumber.....	16
2.7.	Sekretom.....	16
2.7.1	Definisi	16
2.7.2	Komposisi.....	17
2.8.	Hipoksia	17
2.9.	Sel Pulau Langerhans	17
2.10.	Sel Beta Pankreas	19
2.11.	Faktor yang Mempengaruhi Jumlah Sel Beta Pankreas.....	20
2.12.	Hubungan Sekretom <i>Hypoxia</i> -MSC Terhadap Jumlah Sel Beta Pankreas	22
2.13.	Kerangka Teori.....	24
2.14.	Kerangka Konsep	25
2.15.	Hipotesis.....	25
BAB III METODE PENELITIAN.....		26
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	26
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional	27
3.2.1.	Variabel Penelitian	27
3.2.2.	Definisi Operasional.....	27
3.3.	Populasi dan Sampel Penelitian	28

3.3.1.	Populasi	28
3.3.2.	Sampel Penelitian	28
3.3.3.	Besar Sampel	29
3.4.	Instrumen dan Bahan	29
3.4.1.	Instrumen	29
3.4.2.	Bahan	30
3.5.	Prosedur dan Teknik Penelitian	30
3.5.1.	Teknik Isolasi <i>Human-MSC</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	30
3.5.2.	Proses Persiapan <i>Passage</i>	32
3.5.3.	Proses <i>Passage</i> Sel	32
3.5.4.	Proses Validasi Sel	33
3.5.5.	Proses Pemanenan Sel	33
3.5.6.	Proses Penghitungan Sel	34
3.5.7.	Perlakuan pada Hewan Coba	37
3.5.8.	Prosedur Staining Hematoxilin Eosin	37
3.5.9.	Pemeriksaan Histopatologis Sel Beta Pankreas	38
3.6.	Tempat dan Waktu Penelitian	39
3.6.1.	Tempat Penelitian	39
3.6.2.	Waktu Penelitian	39
3.7.	Analisis Data	39
3.8.	Alur Penelitian	41
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		42
4.1.	Hasil Penelitian	42
4.1.1.	Kadar Gula Darah Tikus	42
4.1.2.	Morfologi <i>Stem Cell</i>	43
4.1.3.	Uji diferensiasi adipogoneik	43
4.1.4.	Uji diferensiasi osteogenik	44
4.1.5.	Uji flowcytometry terhadap marker MSC	45
4.1.6.	Sel Beta	46
4.2.	Pembahasan	52
4.2.1.	Beda penelitian terdahulu	60

4.2.2. Keterbatasan Penelitian	60
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	61
5.1. Kesimpulan.....	61
5.2. Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	67



DAFTAR SINGKATAN

DM	: Diabetes Mellitus
PP IDAI	: Pengurus Pusat Ikatan Dokter Anak Indonesia
ESRD	: <i>End-Stage Renal Disease</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
IL	: <i>Interleucin</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
MODY	: <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
ZAC	: <i>Zinc-Activated ion Channel</i>
HYMAI	: <i>Hydatiform Mole Associated and Imprinted Transcript</i>
KCNJ11	: <i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J 11</i>
KATP	: <i>ATP-sensitive K+</i>
ADA	: <i>American Diabetes Association</i>
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
HNF	: <i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
FPG	: <i>Fasting Blood Glucose</i>
OGTT	: <i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
GDS	: <i>Gula Darah Sewaktu</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
BM	: <i>Bone Marrow</i>
AT	: <i>Adipocyte Tissue</i>
UCB	: <i>Umbilical cord blood</i>
TGF	: <i>Tumor Growth Factor</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>

LIF	: <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
PGE	: Prostaglandin E
TSG	: <i>Tumor Suppressor Gene</i>
CXCR4	: <i>Chemokine Receptor type 4</i>
ATP	: Adenine Tri-Phosphate
SCCR	: <i>Stem Cell and Cancer Research</i>
IBL	: <i>Integrated Biomedical Laboratory</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
CO2	: <i>Carbon Dioxide</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
PBS	: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
dMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
HE	: Hematoxylin Eosin
LSD	: <i>Least Significant Difference</i>



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Pulau Langerhans	18
Gambar 2.2.	Sel Beta.....	19
Gambar 2.3.	Kerangka Teori.....	24
Gambar 2.4.	Kerangka Konsep	25
Gambar 3.1.	Skema Rancangan Penelitian	26
Gambar 3.2.	Alur Penelitian.....	41
Gambar 4.1.	Uji validasi MSCs dengan bentuk menyerupai fibroblas pada perbesaran mikroskop 200x. Tampak gambaran MSCs yang melekat pada permukaan plastic dengan konfluensi 80%.....	43
Gambar 4.2.	Uji validasi MSCs diferensiasi adipogenik: Perbesaran 200x.....	44
Gambar 4.3.	Uji validasi MSCs diferensiasi osteogenic; perbesaran 200x.....	45
Gambar 4.4.	Deteksi marker CD90.1, CD29, CD45, dan CD31 menggunakan flowcytometry.....	45
Gambar 4.5.	Perbandingan pankreas kelompok sham/sehat (A) dengan kelompok kontrol (B).	47
Gambar 4.6.	Perbandingan pankreas kelompok Sham (A), P1 (B) dan P2 (C).....	48
Gambar 4.7.	Perbandingan pankreas kelompok kontrol (A), P1 (B) dan P2 (C).....	49
Gambar 4.8.	Perbandingan pankreas kelompok P1 (C) dengan pankreas kelompok P2 (D).	50
Gambar 4.9.	Perbandingan luas pulau langerhans pada seluruh kelompok.	50
Gambar 4.10.	Jumlah rata-rata sel Beta pada kelompok; Sham ,Kontrol, P1, P2.....	51
Gambar 4.11.	Mekanisme regenerasi sel Beta oleh sekretom.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Nilai A1C	13
Tabel 2.2. Nilai Glukosa Plasma Puasa	14
Tabel 2.3. Nilai Toleransi Glukosa Oral	14
Tabel 4.1. Kadar Gula Darah Tikus	46
Tabel 4.2. Hasil Analisis Deskriptif Beta Cell	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil SPSS	67
Lampiran 2. Kegiatan Perawatan dan Perlakuan Hewan Coba.....	71
Lampiran 3. <i>Ethical Clearance</i>	72
Lampiran 4. Surat Ijin Penelitian	73
Lampiran 5. Surat Keterangan Selesai Penelitian	74
Lampiran 6. Surat Pengantar Ujian Hasil Penelitian Skripsi	75



INTISARI

Diabetes mellitus (DM) tipe-1 diartikan sebagai penyakit yang menimbulkan hiperglikemia akibat defisiensi insulin dan ketoasidosis karena proses autoimun kronis pada islet Beta pankreas. *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) merupakan terapi terkini yang memiliki potensi dalam meregenerasi islet dan memperbaiki fungsi jaringan pankreas yang rusak dalam keterlibatan *growth factor* sebagai molekul sekretom yang disekresikan MSC. Pengondisian MSC hipoksia menunjukkan potensi terapeutik yang dimediasi oleh MSC ditandai dengan berkurangnya frekuensi sel Th17 dan sitokin pro inflamasi lainnya sehingga destruksi sel Beta menurun. Tujuan penelitian ini adalah kenaikan sel Beta pancreas tikus model DM pada kelompok perlakuan dengan sekretom *Hypoxia*-MSC yang dibandingkan dengan kontrol.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *in vivo* yang dilakukan dengan menggunakan metode “*post test only control group design*” dengan menggunakan 24 tikus model DM yang dirandomisasi menjadi 4 kelompok meliputi kelompok : Sham (tanpa perlakuan), kontrol (STZ 65mg/kgBB), P1 (0,25 cc sekretom *Hypoxia*-MSC), P2 (0,5 cc sekretom *Hypoxia*-MSC). Pembuatan tikus model DM menggunakan *Streptozotocin* (STZ) 1 kali kemudian dipelihara selama 3 minggu hingga dilakukan terminasi pada hari ke-55 untuk mengambil organ pankreas tikus. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menilai sel Beta di dalam pulau langerhans.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan signifikan pada kelompok perlakuan 1 dan 2 terhadap kelompok kontrol ($P < 0,05$).

Sehingga dapat disimpulkan bahwa terapi sekretom *Hypoxia*-MSC dapat meningkatkan jumlah sel Beta tikus model DM tipe-1.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) tipe-1 adalah kelainan sistemik akibat terjadinya gangguan metabolisme glukosa yang ditandai oleh hiperglikemia kronik yang disebabkan oleh kerusakan sel Beta pankreas baik oleh proses autoimun maupun idiopatik sehingga produksi insulin berkurang atau bahkan terhenti. Sekresi insulin yang rendah mengakibatkan gangguan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (Pulungan *et al.*, 2019). Terapi yang umum dilakukan sekarang untuk penderita DM tipe-1 adalah insulin eksogen dan transplantasi pankreas, tetapi keduanya diketahui kurang memuaskan karena penggunaan insulin eksogen untuk penderita DM tipe-1 memiliki risiko besar terjadinya hipoglikemia berat yang dapat mengancam nyawa penderita (Mathew and Thoppil, 2022). Sedangkan transplantasi pankreas juga dipertimbangkan karena menimbulkan respon imun yang tidak diinginkan terhadap jaringan asing dan sedikitnya pendonor (Johannesson *et al.*, 2015).

Diabetes Mellitus (DM) Tipe-1 pada anak di dunia dan Indonesia terus meningkat. Di beberapa negara Eropa kasus DM tipe-1 terjadi 5-10% dari seluruh jumlah penderita DM, dan lebih dari 90% penderita DM pada anak dan remaja adalah DM tipe-1. Sedangkan di Indonesia sendiri berdasarkan data Ikatan Dokter Anak Indonesia (IDAI), tercatat 1220 kasus DM tipe 1

pada tahun 2018. Insiden DM tipe-1 pada anak dan remaja meningkat dari 3,88 menjadi 28,19 per 100 juta penduduk pada tahun 2000 dan 2010. Data tahun 2003-2009 menunjukkan pada kelompok usia 10-14 tahun, proporsi perempuan dengan DM tipe 1 lebih tinggi dibandingkan laki-laki (Pulungan *et al.*, 2019). Angka kematian dini akibat DM tipe-1 mencapai 3-18 kali dari angka harapan hidup di masing-masing negara terutama disebabkan oleh edema serebri yang bertanggung jawab sekitar 60-90% kematian akibat ketoasidosis (KAD) pada DM tipe-1. Penyebab morbiditas dan mortalitas pada KAD selain edema serebri adalah hipokalemia, hiperkalemia, hipoglikemia, komplikasi SSP yang lain, hematoma, trombosis, sepsis, rhabdomyolisis, dan edema paru (Secret *et al.*, 2014).

Mesenchymal Stem Cells (MSC) sebagai terapi terkini memiliki potensi yang menjanjikan dalam meregenerasi islet dan memperbaiki fungsi jaringan pankreas yang rusak terutama dengan keterlibatan *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) sebagai molekul sekretom yang disekresikan MSC (HS & Putra, 2018). MSC memiliki kemampuan sebagai immunomodulator yang dapat mengurangi aktivasi dari autoimun dengan menghentikan produksi *self-antibody* yang menyerang sel Beta pankreas serta mengadakan perubahan pola ekspresi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-2) menjadi anti-inflamasi pada sel T (Ezquer *et al.*, 2012). Sitokin yang dilepaskan melalui mikrosikel oleh MSC, yaitu IL-10, IGF-1, dan VEGF, dapat melindungi sel beta pankreas dan merangsang regenerasi sel islet (Scuteri & Monfrini, 2018).

Sekretom merupakan suatu sekret bio-aktif yang terdiri dari berbagai molekul aktif yaitu sitokin, mRNA, *growth factor*, dan lipid aktif (*ahangar et al.*, 2020). Tidak seperti insulin eksogen, penggunaan MSC tidak menimbulkan risiko terjadinya hipoglikemia yang akan memicu kerusakan jaringan otak dan berakibat pada kematian pasien. Sekretom *hypoxia-MSC* tidak hanya membantu sel punca untuk bertahan hidup di area yang cedera tetapi juga memodulasi ekspresi berbagai sitokin pelindung jaringan dan faktor pertumbuhan. Hasil histologis pada penelitian menunjukkan bahwa MSC prakondisi hipoksia menunjukkan potensi regenerasi sel Beta yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan MSC normoksik setelah ditransplantasikan ke tikus DM (*Waseem et al.*, 2016).

Berdasarkan yang telah dijelaskan bahwa penggunaan insulin eksogen dan transplantasi pankreas sebagai terapi penderita DM tipe-1 masih kurang optimal maka diperlukan upaya penelitian terhadap pengaruh sekretom *hypoxia-MSC* terhadap tikus model DM tipe-1 yang diinduksi dengan streptozotocin (STZ). Pada penelitian ini, peneliti menggunakan dua (2) dosis sekretom yang berbeda untuk mengamati jumlah sel Beta yang diukur dengan imunohistokimia sebagai parameter penelitian.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh sekretom *Hypoxia-MSC* terhadap jumlah sel Beta pankreas tikus model DM tipe-1 ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh dari sekretom *Hypoxia-MSC* terhadap jumlah sel Beta pankreas pada tikus model DM tipe-1.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui jumlah sel Beta pankreas tikus model DM tipe-1 pada kelompok perlakuan 1 (injeksi sekretom *Hypoxia-MSC* 0,25 cc) dan kelompok perlakuan 2 (injeksi sekretom *Hypoxia-MSC* 0,5 cc)

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan sekretom *Hypoxia-MSC* terhadap jumlah sel Beta pankreas pada tikus model DM tipe-1.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi dan acuan bagi pembaca mengenai penelitian secara *in vivo* tentang pengaruh sekretom *Hypoxia-MSC* terhadap jumlah sel Beta pankreas tikus model DM tipe-1.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Melitus

2.1.1 Definisi

DM adalah kelainan metabolik heterogen dan kompleks yang ditandai dengan adanya hiperglikemia akibat resistensi terhadap insulin, sekresi insulin yang tidak mencukupi, atau keduanya. DM memiliki banyak subklasifikasi, yaitu tipe-1, tipe-2, *maturity-onset diabetes of the young* (MODY), diabetes gestasional, diabetes neonatal, dan diabetes yang diinduksi steroid. DM tipe-1 dan -2 merupakan *subtipe* utama dimana masing-masing memiliki patofisiologi, presentasi, dan penatalaksanaan yang berbeda, tetapi keduanya memiliki potensi hiperglikemia (Solis-Herrera *et al.*, 2018).

2.1.2 Klasifikasi

Menurut *American Diabetes Association* (ADA) DM diklasifikasikan menurut etiologinya yaitu:

- DM tipe-1 (terjadinya kerusakan sel Beta pankreas yang menyebabkan defisiensi insulin absolut)
 - a. Dimediasi imun
 - b. Idiopatik

- DM tipe-2 (dapat berkisar dari resistensi insulin yang didominasi dengan defisiensi insulin relatif hingga defek sekresi yang didominasi oleh resistensi insulin)
- DM gestasional
- Jenis khusus lainnya
 - a. Cacat genetik fungsi dari sel Beta
 - MODY-1 (Kromosom 20, HNF-4a)
 - MODY-2 (Kromosom 7, glukokinase)
 - MODY-3 (Kromosom 12, HNF-1a)
 - 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), DM neonatal transien (paling sering cacat pencetakan ZAC / HYAMI pada 6q24), DM neonatal permanen (paling umum gen KCNJ11 yang mengkode subunit Kir6.2 dari saluran KATP sel-B), DNA mitokondria
 - b. Cacat genetik dalam kerja insulin

Resistensi insulin tipe A., Leprechaunisme, Sindrom Rabson-Mendenhall, DM 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

g. Bentuk DM yang dimediasi kekebalan yang tidak umum

Stiff-man syndrome, Antibodi reseptor anti-insulin

h. Sindrom genetik lainnya terkadang berhubungan dengan DM

i. Sindrom Down, Sindrom Klinefelter, Sindrom Turner,

Sindrom Wolfram, Ataksia Friedreich, Huntington chorea,

Sindrom Laurence-Moon-Biedl, Distrofi miotonik,

Porphyria, Sindrom Prader-Willi.

2.2. Diabetes Melitus Tipe-1

2.2.1. Definisi

DM tipe-1 adalah serangan autoimun pada sel Beta pankreas yang mengakibatkan defisiensi insulin yang berat. DM tipe-1 mewakili sekitar 5% dari semua DM. Meskipun kerusakan dan

kematian sel Beta terutama dimediasi oleh sel T, autoantibodi yang dibentuk sel B ke antigen pulau langerhans digunakan sebagai penanda penyakit dan berperan sebagai pathogen. Banyak faktor lingkungan yang dapat memicu dan mempengaruhi tingkat keparahan serangan autoimun pada sel Beta karena mekanisme imun yang bekerja pada setiap penderita (Solis-Herrera *et al.*, 2018).

2.2.2. Etiologi

Pada DM tipe-1 terjadi kerusakan sel Beta pankreas yang menyebabkan defisiensi insulin absolut yang diakibatkan oleh beberapa faktor seperti pembentukan antibodi, genetik dan lingkungan. DM tipe-1 menunjukkan bahwa individu yang rentan secara genetik dapat terpapar pada pemicu lingkungan yang diduga menginduksi autoimunitas sel Beta. Pembentukan autoantibodi reaktif islet adalah penanda penyakit autoimun yang sedang berlangsung, sebagian besar sel autoimun reaktif teraktivasi dapat menghancurkan sel Beta yang mengakibatkan hilangnya fungsi sekresi insulin secara progresif (Lucier & Weinstock, 2022).

DM tipe-1 sangat dipengaruhi oleh faktor genetik, kompleks *Human Leucocyte Antigen* (HLA) memberikan kontribusi terbesar sekitar 40%-60% terhadap kerentanan genetik. Ada tiga kelas gen HLA, dengan gen kelas II yang memiliki asosiasi terkuat dengan DM tipe-1 karena gen HLA kelas II mengkodekan molekul yang berpartisipasi dalam presentasi antigen serta memiliki pengaruh

variabilitas alel *Major Histocompatibility Complex* (MHC) pada risiko DM tipe-1. Sebagian besar pasien DM tipe-1 membawa antigen HLA-DR3 atau -DR4 kelas II, dengan 30% adalah DR3 / DR4 heterozigot.

Adanya autoantibodi pankreas yang bersirkulasi menunjukkan bahwa individu tersebut berisiko atau telah berkembang menjadi DM tipe-1. Antibodi ini termasuk :

- 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).

Semakin besar jumlah antibodi yang dapat dideteksi dan semakin tinggi titernya, semakin besar risiko pengembangan DM tipe-1 (Lucier and Weinstock, 2022).

2.2.3. Patofisiologi

Pada DM tipe-1, terjadi kerusakan sel Beta pankreas yang dimediasi oleh seluler dan autoimun. DM tipe-1 memiliki kecenderungan genetik yang kuat. HLA yang merupakan MHC pada

manusia, dilaporkan mencapai sekitar 40% hingga 50% dari agregasi DM tipe-1 dalam keluarga. Penentu yang signifikan adalah polimorfisme gen HLA kelas II yang mengkode DQ dan DR4-DQ8, dengan DR3-DQ2, ditemukan pada 90% pasien DM tipe-1. Dengan kerusakan progresif sel Beta, ada sedikit atau tidak ada sekresi insulin. Pasien-pasien ini umumnya tidak mengalami obesitas. Mereka lebih rentan mengembangkan gangguan autoimun lainnya seperti penyakit Addison, penyakit Graves, tiroiditis Hashimoto, penyakit celiac, dan lain-lain. Bagian DM tipe-1 yang tidak terkait dengan autoimunitas insulin dan tidak terkait dengan HLA di atas disebut DM tipe-1 idiopatik (Goyal & Jialal, 2022).

Penghancuran sel Beta pankreas pada DM tipe-1 terjadi melalui proses apoptosis yaitu mekanisme kematian sel terprogram yang mencakup sistem kaskade aktivasi sistein-asparaginase. Reaksi kaspase ini terjadi akibat dari produksi sitokin proinflamasi yaitu IL-1, TNF- α dan IFN- γ yang tinggi diinduksi oleh limfosit T autoreaktif pada sel islet pankreas (Paschou *et al.*, 2018).

2.2.4. Terapi

Terapi yang sering digunakan pada pasien DM tipe-1 yaitu menggunakan insulin eksogen yang dibagi menjadi 2 tipe yaitu:

- *Rapid-acting Insulin* (Lispro, Aspart dan Glulisine) : Insulin kerja cepat yang digunakan untuk mengurangi kenaikan

glukosa yang tinggi saat awal makan dan dapat mencegah risiko terjadinya hipoglikemia pasca makan.

- *Long-acting Insulin* (Glargine dan Detemir) : Insulin kerja lambat yang digunakan untuk mengontrol kadar glukosa pada waktu malam dan waktu antara makan (Nally *et al.*, 2019).

Penggunaan insulin eksogen memiliki risiko terjadinya episode hipoglikemi akibat dari pembentukan insulin-autoantibodi yang akan mengikat antibodi insulin sehingga terjadi efek penurunan glukosa dalam darah.

2.3. Diabetes Melitus Tipe-2

2.3.1 Definisi

DM tipe-2 adalah suatu kondisi yang ditandai dengan defisiensi sekresi insulin oleh sel Beta pankreas, resistensi insulin dan respon sekresi insulin kompensasi yang tidak adekuat. Perkembangan penyakit membuat sekresi insulin ini tidak dapat mempertahankan homeostasis glukosa, menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Lebih dari 90% kasus DM adalah DM tipe-2. Pasien dengan DM tipe-2 sebagian besar ditandai dengan obesitas atau memiliki persentase lemak tubuh yang tinggi, terutama di daerah abdomen (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

2.3.2 Etiologi

Pada DM tipe-2, respons terhadap insulin berkurang, atau didefinisikan sebagai resistensi insulin. Selama keadaan ini, insulin tidak efektif dan awalnya diimbangi dengan peningkatan produksi insulin untuk mempertahankan homeostasis glukosa, tetapi seiring waktu, produksi insulin menurun, mengakibatkan DM tipe-2. DM tipe-2 paling sering terlihat pada orang yang berusia lebih dari 45 tahun. Namun, saat ini juga sering terjadi pada anak-anak, remaja, dan dewasa muda karena meningkatnya tingkat obesitas, kurangnya aktivitas fisik, dan diet padat energi (Goyal and Jialal, 2022).

2.3.3 Patofisiologi

DM tipe-2 melibatkan sekresi insulin yang tidak adekuat. Pada awal penyakit, kadar insulin seringkali sangat tinggi, dan situasi ini dapat berlangsung dalam beberapa hari dalam perkembangan penyakit. Namun, resistensi insulin perifer serta peningkatan produksi glukosa oleh hati menyebabkan kadar insulin menjadi tidak memadai untuk menstabilkan kadar glukosa plasma. Kemudian, produksi insulin menjadi berkurang, dan terjadi perburukan hiperglikemia. DM tipe-2 biasanya berkembang pada orang dewasa, dan frekuensinya makin meningkat seiring dengan penuaan. Kadar glukosa plasma mencapai tingkat yang lebih tinggi setelah makan pada orang yang lebih tua daripada orang dewasa yang lebih muda (Solis-Herrera *et al.*, 2018).

2.4. Diagnosis

Tes DM 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 DM positif, maka tes kedua untuk mendiagnosis DM bisa tidak perlu dilakukan. ADA mengelompokan tingkat DM berdasarkan jenis tes yang diterapkan :

2.4.1 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.

DM 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%

2.4.2 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.

DM 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

2.4.3 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.

DM 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

2.4.4 Gula Darah Sewaktu (GDS)

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

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

2.5. Streptozotocin

DM diinduksi oleh streptozotocin (STZ), merupakan senyawa glukosamin-nitrosourea yang berasal dari *Streptomyces achromogenes* yang digunakan secara klinis sebagai agen kemoterapi dalam pengobatan karsinoma sel Beta pankreas. STZ merusak sel pankreas, mengakibatkan hipoinsulinemia dan hiperglikemia. “DM streptozotoksin” yang terjadi pada hewan pengerat disebabkan oleh nekrosis spesifik dari sel pankreas, dan metode ini adalah pilihan pertama untuk induksi DM pada hewan . Tergantung pada jenis hewan, dosis, rute pemberian obat, dan masa hidup di mana STZ diberikan pada tikus, dengan target yaitu DM berat (glukosa darah lebih tinggi dari 200/300 mg / dL) atau DM ringan (glikemia antara 120 dan 200/300 mg / dL) (Damasceno *et al.*, 2014).

2.6. Mesenchymal Stem Cell

2.6.1 Definisi

MSC adalah sel punca dewasa prototipik dengan kapasitas untuk memperbarui diri dan berdiferensiasi dengan distribusi jaringan yang luas. MSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jaringan turunan mesodermal dan non-mesodermal. Peran MSC di endogen adalah pemeliharaan dari sel induk, dan karena itu MSC berpartisipasi dalam homeostasis organ, penyembuhan luka, dan *successful aging*. Dari perspektif terapeutik, MSC muncul sebagai agen yang sangat menjanjikan untuk regenerasi jaringan.

2.6.2 Sumber

Stem cell dapat diisolasi dari berbagai sumber dalam tubuh manusia, pemilihan idealnya didasarkan pada karakteristik logistik, praktis dan *in vitro*. Saat ini, sumber utama MSC adalah sumsum tulang dan jaringan adiposa.

Sumber MSC yang sudah diteliti hingga kini yaitu :

- Sumsum tulang / Bone Marrow (BM)
- Pulpa gigi
- Jaringan lemak / *Adipocyte Tissue* (AT)
- Jaringan yang berasal dari kelahiran (*Birth-derived tissues*):
Umbilical Cord Blood (UCB), *Warthon jelly*, Kondrosit
- Otot
- Cairan amnion dan plasenta
- Cairan synovium dan synovial
- Darah tepi
- Kulit
- Endometrium (Berebichez-Fridman and Montero-Olvera, 2018).

2.7. Sekretom

2.7.1 Definisi

Sekretom merupakan sekret berbasis MSC. Sekretom memiliki kandungan berbagai faktor regenerative yaitu sitokin dan faktor pertumbuhan yang mampu mempromosikan dan memodulasi pembentukan jaringan baru (Benavides-Castellanos *et al.*, 2020).

2.7.2 Komposisi

Sekretom MSC memiliki berbagai sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, faktor anti-inflamasi dan protein yang diproduksi dalam bentuk molekul. Molekul ini memiliki dalam bentuk eksosom memiliki ukuran sekitar 40-120 nm dan dalam bentuk mikrosikel sekitar 50-1000 nm. Molekul yang disekresikan sekretom MSC yaitu TGF- β , IL-1, HGF-1, VEGF, LIF, PGE2, TSG6, mpCCL2, Gal-1, Gal-9 (Eleuteri & Fierabracci, 2019).

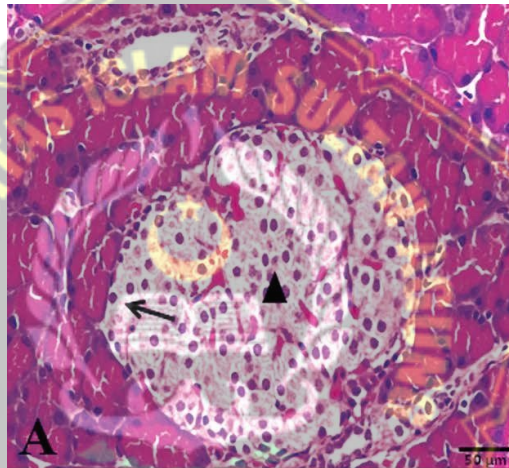
2.8. Hipoksia

Pengondisian hipoksia terhadap MSC merupakan salah satu strategi untuk memperpanjang kelangsungan hidup MSC cukup lama dalam agar efek regeneratif pada MSC dapat ditimbulkan karena MSC harus menghadapi berbagai *stressor* pada lingkungan yang akan diperbaiki seperti inflamasi dan lingkungan hipoksia. MSC dengan prekondisi hipoksia dapat meningkatkan pergerakan (*homing*) / motilitas MSC melalui reseptor faktor-1 turunan stromal / jalur transduksi CXCR4, serta melalui adhesi fokal kinase dan mekanisme pensinyalan saluran kalium Kv2.1. (Moreira *et al.*, 2017).

2.9. Sel Pulau Langerhans

Secara anatomis pankreas adalah kelenjar yang terletak pada kuadran kiri atas abdomen atau perut dan bagian kaput atau kepalanya menempel pada organ duodenum. Kelenjar pankreas memiliki dua fungsi utama, yaitu mengatur kadar glukosa dalam aliran darah melalui hormon insulin dan

glucagon (fungsi endokrin), dan membantu dalam proses pencernaan makanan dengan mensekresi enzim pencernaan (fungsi eksokrin) (Setiyo, 2018). Fungsi endokrin pankreas terdapat pada sekelompok sel yang ditemukan oleh Langerhans pada tahun 1869, sehingga sekelompok sel tersebut dinamakan sebagai pulau Langerhans (Gambar 2.1) (Abunasef et al., 2014). Pada tikus dewasa, pankreas berisi kira-kira 1-2% pulau-pulau Langerhans dengan diameter Antara 100-200 μm .



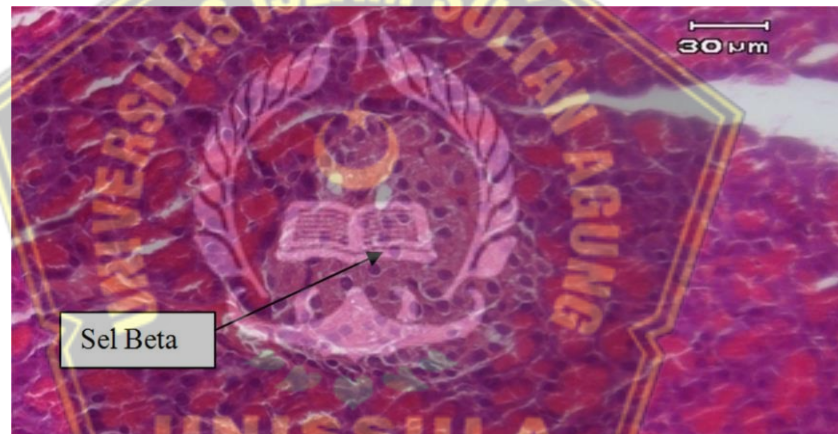
Gambar 2.1. Pulau Langerhans

Terdapat empat tipe sel, masing-masing memiliki kemampuan sekresi hormon yang berbeda-beda, yaitu:

- Sel Alfa, yaitu sel yang menghasilkan glucagon. Sel ini merupakan sel terbanyak kedua yang ditemukan di pulau Langerhans setelah sel Beta (20%).

- Sel Beta, yaitu sel yang menghasilkan hormon insulin. Sel Beta terletak di dalam pulau Langerhans dan memenuhi sekitar 70% dari volume pulau Langerhans
- Sel Delta, sel ini menghasilkan somatostatin
- Sel F, sel ini menghasilkan *pancreatic polypeptide* yang diduga berfungsi dalam membantu proses pencernaan makanan terutama protein (Setiyo, 2018).

2.10. Sel Beta Pankreas



Gambar 2.2. Sel Beta

Sel Beta adalah sel yang mampu memproduksi insulin sebagai respon terhadap glukosa yang tinggi (Andalia *et al.*, 2017). Insulin pada sel Beta dikemas ke dalam granula sekretori dalam konsentrasi sekitar 100 mM sebagai kompleks yang berikatan dengan zinc, kemudian dilepaskan oleh stimulasi neurotransmitter ketika kadar glukosa dalam darah tinggi. Sekresi insulin juga dapat meningkat dengan adanya hormon incretin dan dapat

dihambat dengan adanya hormon somatostatin yang disekresikan oleh sel tetangga seperti epinefrin, galanin, ghrelin, leptin dan ion zinc.

Kerja insulin dalam menurunkan kadar gula darah adalah dengan mempercepat difusi glukosa ke dalam sel; mempercepat konversi glukosa menjadi glikogen (glikogenesis); meningkatkan penyerapan asam amino oleh sel-sel dan meningkatkan sintesis protein; sintesis kecepatan asam lemak (lipogenesis); memperlambat konversi glikogen menjadi glukosa (glikogenolisis); dan memperlambat pembentukan glukosa dari asam laktat dan asam amino (glukoneogenesis). Metabolisme glukosa dalam sel Beta berbeda dari jenis sel lain karena adanya afinitas rendah, kapasitas transpor tinggi transporter glukosa (GLUT1 dan 2 pada manusia, GLUT2 pada tikus), dan afinitas rendah heksokinase-glukokinase (GCK) menghasilkan metabolisme glukosa sel yang dikendalikan oleh ketersediaan substrat.

Sel Beta melepaskan insulin ketika terjadi produksi ATP sebagai hasil metabolisme glukosa yang menyebabkan penutupan saluran K^+ sensitif ATP (KATP) pada permukaan sel; depolarisasi membran yang menyebabkan pembukaan *voltage-gated L-type calcium channels* dan masuknya kalsium sehingga insulin dilepaskan (Skelin *et al.*, 2010).

2.11. Faktor yang Mempengaruhi Jumlah Sel Beta Pankreas

Permintaan insulin yang tinggi terus menerus pada sel Beta berkontribusi pada kegagalan sel Beta. Faktor lain seperti genetika, glukotoksisitas, dan lipotoksisitas juga dapat menyebabkan gangguan fungsi sel Beta. Ada beberapa faktor untuk disfungsi sel Beta diantaranya;

- Glukotoksisitas

- a. Pada umumnya, glukosa dimetabolisme dengan cepat di dalam sel, tetapi kontak yang terlalu lama dengan kadar glukosa yang tinggi terkait dengan stres oksidatif, yang mengganggu kemampuan sel-sel ini untuk mentoleransi dan pulih kembali. Hiperglikemia yang berkelanjutan dapat mematikan gen yang melindungi sel dari kematian. Beberapa mekanisme spesifiknya adalah sebagai berikut; Hiperglikemia kronis meningkatkan stres oksidatif di dalam sel dan dapat mematikan insulin yang baru saja diproduksi.
- b. Sel Beta mungkin sangat rentan terhadap glukotoksisitas karena tingkat aktivitas yang rendah dari enzim antioksidan dalam sel Beta.

- Lipotoksisitas

Lipotoksisitas yaitu hiperlipidemia atau kadar lemak tinggi dalam darah telah terbukti menyebabkan penurunan sekresi insulin pada hewan setelah paparan yang lama. Lipotoksisitas juga mengubah rasio proinsulin/insulin, ukuran fungsi sel Beta. Rasio proinsulin/insulin yang tinggi menunjukkan disfungsi sel Beta, yang mencerminkan cacat dalam pemrosesan insulin (biosintesis) dan sekresi.

Akumulasi lipid di dalam sel Beta berkontribusi pada kematian sel Beta karena jenis asam lemak tertentu dapat mengganggu pensinyalan sel normal.

Lipotoksisitas dapat bekerja secara sinergis dengan glukotoksisitas untuk mengurangi fungsi sel Beta, mengurangi sekresi insulin, dan meningkatkan kematian sel.

- Perubahan Anatomi dan Histopatologi

Seperti yang telah dibahas sebelumnya, karena adanya proses autoimun pada pulau langerhans yang menyebabkan destruksi sel Beta dapat menyebabkan penurunan massa dan akumulasi deposit amiloid interstisial.

Pada keadaan normal, massa sel Beta diatur oleh keseimbangan antara pembentukan dan pembelahan sel baru dan kematian sel alami. Namun, pada hal ini ada ketidakseimbangan antara produksi dan hilangnya sel Beta, mengakibatkan kerusakan yang lebih besar daripada produksi sel Beta (Wajchenberg, 2007).

2.12. Hubungan Sekretom *Hypoxia*-MSC Terhadap Jumlah Sel Beta Pankreas

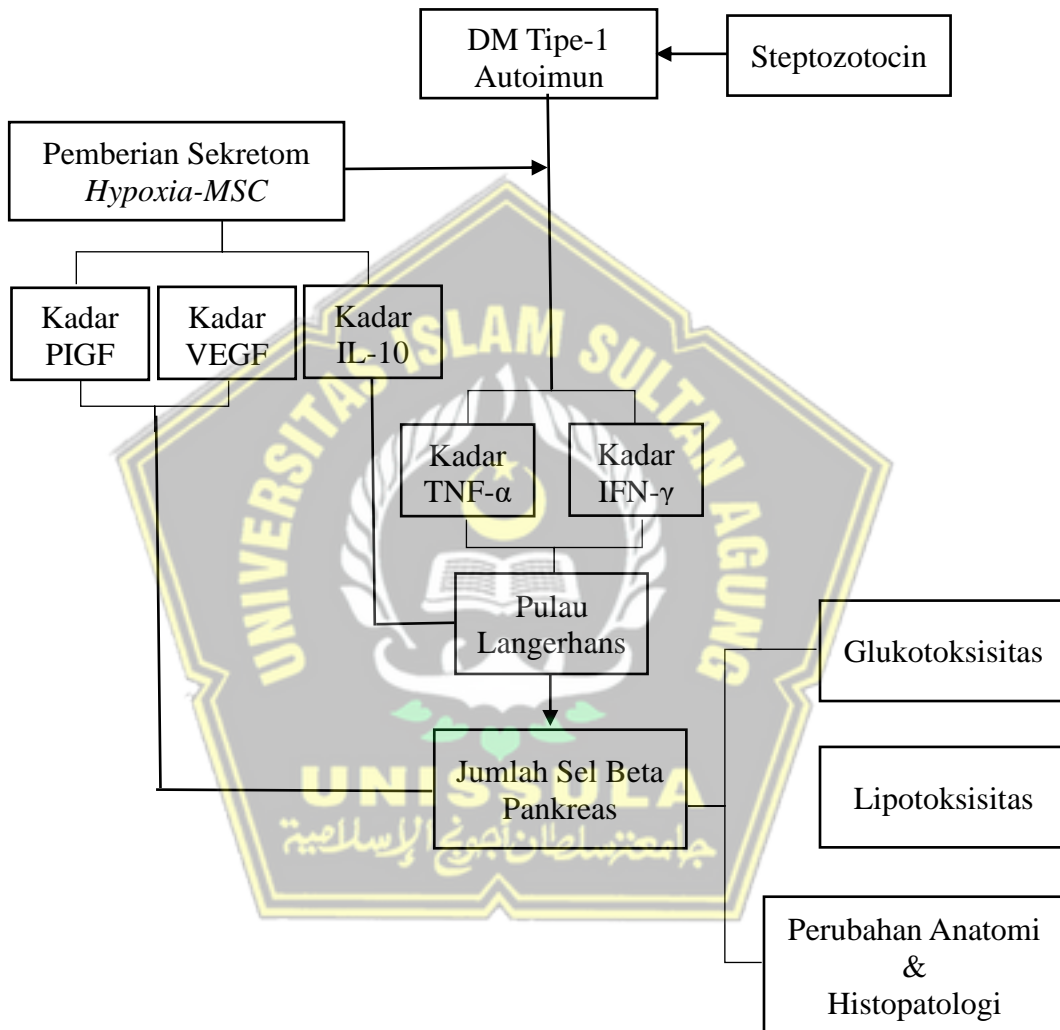
DM tipe-1 adalah penyakit yang menyebabkan hiperglikemia akibat defisiensi insulin dan ketoasidosis karena proses autoimun kronis pada islet Beta pancreas (Kahanovitz *et al.*, 2017) DM tipe-1 dihasilkan dari penghancuran sel penghasil insulin di pankreas yang disebut sel Beta oleh sistem imun adaptif. Hal ini diketahui terjadi karena ekspresi berlebih dari HLA 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. MSC

sebagai terapi terkini memiliki potensi yang menjanjikan dalam meregenerasi islet dan perbaikan fungsi jaringan pankreas yang rusak terutama dalam keterlibatan *growth factor* PDGF sebagai molekul sekretom yang disekresikan MSC (HS & Putra, 2018). MSC memiliki kemampuan sebagai immunomodulator yang dapat mengurangi aktivasi dari autoimun dengan menghentikan produksi *self-antibody* yang menyerang sel Beta pancreas serta mengadakan perubahan pola ekspresi sitokin dari pro-inflamasi (seperti TNF- α dan IL-2) menjadi anti-inflamasi pada sel T (Ezquer *et al.*, 2012). Sitokin yang dilepaskan oleh MSC, yaitu IL-10, IGF-1, dan VEGF, melalui mikrovessel, dapat melindungi sel Beta pankreas dan membantu merangsang regenerasi sel islet (Scuteri & Monfrini, 2018). MSC yang dikondisikan dalam keadaan hipoksia di awal kultur menunjukkan peningkatannya dalam efek regeneratif dan *survival* dari sel tersebut (Ferreira *et al.*, 2018). Selain itu terapi MSC hipoksia secara histologis meningkatkan regenerasi sel Beta pankreas yang lebih signifikan dibandingkan MSC normoksik (tanpa pengondisian awal) setelah ditransplantasikan ke tikus model DM (Waseem *et al.*, 2016). Penelitian lebih lanjut, menunjukkan bahwa MSC yang dikondisikan hipoksia akan mensekresikan sekretom dengan tingkat yang lebih tinggi (Ferreira *et al.*, 2018).

Penderita DM tipe-1 membutuhkan terapi penggantian insulin seumur hidup karena keadaan hiperglikemia yang kronik dapat menimbulkan komplikasi berupa retinopati, neuropati dan nefropati (Lucier & Weinstock,

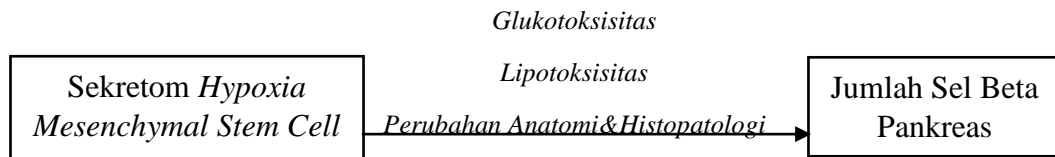
2022). Dengan demikian, MSC diharapkan dapat meningkatkan jumlah sel Beta pankreas dan kadar VEGF, serta perbaikan pada pasien DM tipe-1.

2.13. Kerangka Teori



Gambar 2.3. Kerangka Teori

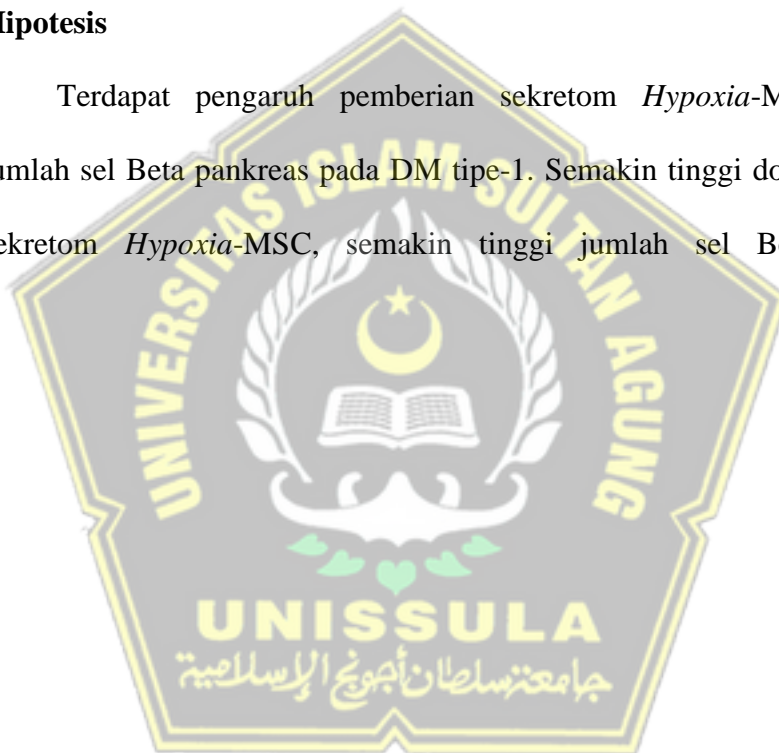
2.14. Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Kerangka Konsep

2.15. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian sekretom *Hypoxia*-MSC terhadap jumlah sel Beta pankreas pada DM tipe-1. Semakin tinggi dosis pemberian sekretom *Hypoxia*-MSC, semakin tinggi jumlah sel Beta pankreas.



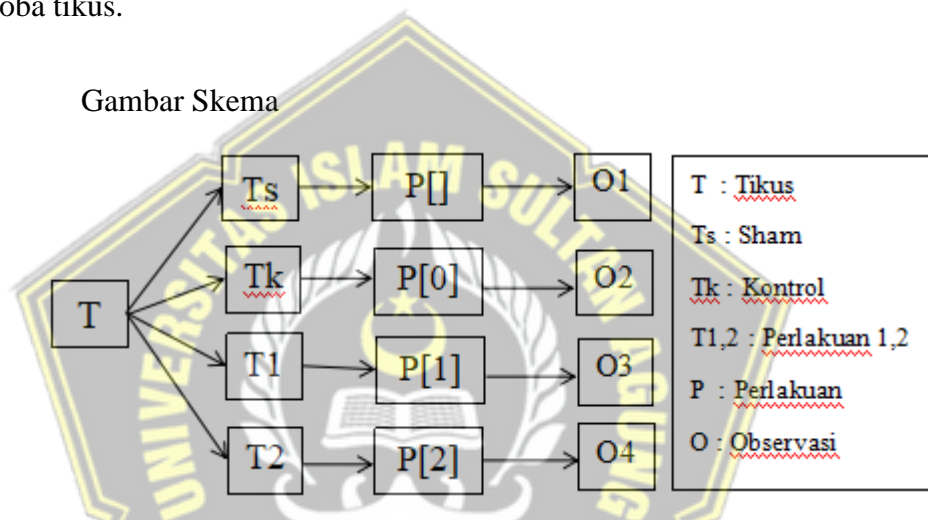
BAB III

METODE 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.

Gambar Skema



Gambar 3.1. Skema Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *in vivo* dan *in vitro* menggunakan desain *post test* dengan kelompok *control* (gambar 3.1). rancangan ini digunakan, karena pada penelitian ini menilai pengaruh sekretom pada kelompok penelitian dengan cara membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kontrol.

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel Penelitian

- **Variabel bebas**

Pemberian Sekretom *Hypoxia*-MSC

- **Variabel tergantung**

Jumlah Sel Beta Pankreas

3.2.2. Definisi Operasional

- **Pemberian Sekretom *Hypoxia*-MSC**

Pemberian Sekretom *Hypoxia*-MSC adalah sekret yang diambil dari medium MSC yang diinkubasi dalam keadaan O₂ 5% selama 24 jam, kemudian sekret diekstrak dengan cara sentrifugasi dan diambil supernatannya, dengan jumlah masing-masing dosis 0,25 cc dan 0,5 cc.

Skala : nominal

- **Jumlah Sel Beta Pankreas**

Jumlah sel Beta pancreas diukur dengan imunohistokimia. Sel Beta pankreas akan terlihat positif bila pada preparat timbul kecoklatan. Jumlah seluruh sel Beta (n) dihitung dari lima pulau Langerhans yang diamati secara acak dan dinyatakan dalam satuan n/pulau.

Skala : rasio

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi

- **Populasi Target**

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

- **Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar berusia 8-10 minggu dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House Integrated Biomedical Laboratory (IBL)*, Fakultas Kedokteran UNISSULA dan timbul DM Tipe-1 setelah paparan STZ dosis 4 mg/minggu dan dikonfirmasi terjadi peningkatan kadar gula darah >200 mg/dL pada hari ke-7 setelah induksi.

3.3.2. Sampel Penelitian

- **Kriteria Inklusi**

- a Tikus putih galur Wistar jantan
- b Tikus putih galur Wistar yang sehat.
- c Tikus putih galur Wistar usia 8-10 minggu.
- d Tikus putih galur Wistar dengan berat badan 250-300 gram.

- **Kriteria Eksklusi**

- a Tikus putih galur wistar yang memiliki kelainan anatomis.
- b. Tikus putih galur wistar yang sebelumnya pernah digunakan untuk penelitian lain sebelumnya.

- **Kriteria Drop Out**

- a Tikus mati selama penelitian.
- b 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 :

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

3.4. Instrumen dan Bahan

3.4.1. Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *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*, *Jarum suntik 3-ml*, *jarum suntik 23-G*, *alat ukur glukosa digital*, *kandang tikus*.

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *MSC*, *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 natrium sitrat (enzyme grade; Fisher)*, *pH 4,5*.

3.5. Prosedur dan Teknik Penelitian

3.5.1. Teknik Isolasi *Human-MSC* dari *Umbilical Cord*

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.
- Pisahkan dari antara *Wharton jelly* dan pembuluh darah *umbilical cord*.
- Ambil dan cacah *Wharton jelly* menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil
- Letakan cacahan *Wharton jelly* secara merata dalam flask T25.
- Tunggu sekitar 2-3 menit sampai *Wharton jelly* melekat pada dasar flask. Tambahkan 1cc medium atau sampai eksplan terendam.
- Inkubasi 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.
- Amati pertumbuhan sel menggunakan Inverted microscope.
- 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.
- Lakukan prosedur yang sama, hingga mencapai stem cells konfluens 80%.

3.5.2. Proses Persiapan *Passage*

- Jika sel sudah konfluens 80%, buang seluruh medium, kemudian cuci dengan PBS ke dalam *flask* sejumlah medium yang dikeluarkan, setelah itu buang PBS.
- Tambahkan 2 cc tripsin sintetik (triple), lalu lakukan diamkan selama 5 menit, setelah itu tapping pada flask untuk melepaskan perlekatan sel di dasar flask.
- Tambahkan 4 cc medium inhibitor tripsin sintetik sebanyak 4 cc.
- Pindahkan sel dan medium dari flask T25 ke dalam tube 15 cc, lakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 1900 rpm
- Buang supernatant. Tambahkan 2 cc PBS pada pellet yang tersisa, lalu lakukan resuspensi, kemudian sentrifuge selama 8 menit dengan putaran 1900 rpm.
- Buang supernatant. Tambahkan 1 cc medium komplit pada pellet yang tersisa di dasar tabung, kemudian lakukan hitung sel.

3.5.3. Proses *Passage* Sel

- Tambahkan medium komplit dengan ukuran 1 cc medium komplit /1.500.000 sel ke dalam tube sesuai jumlah hitungan sel sebelumnya.
- Masukkan 1 cc sel dan medium dalam flask T25. Kultur dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama 1 hari.
- Tambahkan ke dalam flask medium komplit sebanyak 9 cc.

- Inkubasi dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama tiga hari.
- Buang seluruh medium untuk kemudian masukkan medium komplit baru sebanyak jumlah medium yang dibuang, setelah itu inkubasi kembali dengan kondisi yang sama.
- Lakukan proses serupa selama tiga hari sekali hingga sel konfluen 80% dalam flask.
- Pindahkan ke flask yang baru setiap 80% sel konfluen dan hitung tiap fase perpindahan sebagai passage I, II, dan seterusnya
- Proses kultur dilakukan hingga passage ke IV-VI.

3.5.4. Proses Validasi Sel

- Lakukan prosedur flowsitometri untuk pembacaan marker dari stem cells CD90, CD105, CD34, CD73 dengan populasi $\geq 95\%$.
- Lakukan tes kemampuan diferensiasi stem cells menjadi kondrosit, adiposit, dan osteosit dengan menggunakan medium spesifik tertentu secara in vitro.

3.5.5. Proses Pemanenan Sel

- Pemanenan sel dilakukan pada passage ke-IV.
- Ketika sel sudah konfluens 80% dalam flask, buang seluruh medium, lalu cuci menggunakan PBS ke dalam flask sejumlah medium yang dibuang, setelah itu buang PBS.

- Tambahkan 2 cc tripsin sintetik (triple) dan diamkan selam 5 menit, kemudian lakukan teknik tapping pada flask untuk
- melepaskan sel yang menempel di dasar flask.
- Tambahkan 4 cc medium inhibitor tripsin sintetik.
- Pindahkan seluruh sel dan medium pada flask ke dalam tube 15 cc, lakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan perputaran 1900 rpm.
- Buang supernatant. Tambahkan 2 cc PBS, lanjutkan dengan proses resuspensi, lalu sentrifugasi selama 8 menit dengan perputaran 1900 rpm.
- Buang supernatant. Tambahkan 1 cc medium komplit pada pellet di dasar tabung, kemudian kembali lakukan hitung sel.

3.5.6. Proses Penghitungan Sel

- Masukkan 10µl sel lalu ke dalam cryotube.
- Masukkan 90µl triptofan blue ke dalam cryotube.
- Pipetkan 10µl dari campuran dari cryotube ke bilik hitung yang ditutup deck glass.
- Amati menggunakan inverted microscope, hitung pada bilik hitung.
- Hitung menggunakan rumus perhitungan jumlah sel:

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

- Siapkan buffer natrium sitrat 50 mM (pH 4,5). Tempatkan ml buffer ke dalam masing-masing tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tutup tabung dengan aluminium foil.
- Segera sebelum injeksi, larutkan STZ dalam 50 mM buffer natrium sitrat (pH 4,5) hingga konsentrasi akhir 10 mg / ml. Larutan STZ harus disiapkan secara baru untuk setiap injeksi dan diinjeksikan dalam 5 menit setelah larut.
- Menggunakan spuit 3-ml dan jarum 23-G, injeksi larutan STZ secara intraperitoneal pada 65 mg / kg untuk kelompok perlakuan. Masukkan buffer sitrat dengan volume yang sama (pH 4,5) secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol. Kembalikan tikus ke kandangnya, berikan minum dan pakan standar
- Kembalikan tikus ke kandangnya, berikan minum dan pakan standar
- Untuk penelitian yang melibatkan DM tipe-1 tahap awal:
Pada hari percobaan ke-10, puasakan semua tikus selama 6 sampai 8 jam. Uji kadar glukosa darah dari sampel vena di ekor menggunakan alat cek kadar gula digital. Jika hewan DM digunakan untuk menilai mekanisme tahap awal DM tipe-1 atau untuk skrining senyawa untuk pengobatan DM 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 DM, sehingga tidak perlu dilakukan pengukuran kadar insulin.

- 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.
- Biasanya pada minggu ke-3, sebagian besar tikus yang diinjeksi STZ mengalami DM berat dengan tingkat glukosa darah biasanya > 250 sampai 600 mg / dl. Jika $>60\%$ tikus yang diinjeksi STZ masih tidak menunjukkan hiperglikemia ringan, periksa apakah ada masalah dalam percobaan
- 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.
- Biasanya pada minggu ke-3, sebagian besar tikus yang diinjeksi STZ mengalami DM berat dengan tingkat glukosa darah biasanya > 250 sampai 600 mg / dl. Jika $>60\%$ tikus yang diinjeksi STZ masih tidak menunjukkan hiperglikemia ringan, periksa

apakah ada masalah dalam percobaan

- Jika suatu zat uji atau senyawa sedang dinilai kemampuannya untuk mengoreksi hiperglikemia, perpanjang protokolnya lebih lama, tergantung pada kebutuhan eksperimental. Rawat kelompok hewan seperti yang dijelaskan pada langkah 3 sampai 9 untuk membentuk status DM dan kemudian obati hewan dengan terapi restoratif potensial. Sertakan kelompok yang menerima suntikan vehicle yang sesuai sebagai control.

3.5.7. Perlakuan pada Hewan Coba

Kelompok perlakuan dibagi menjadi empat kelompok :

- Kelompok Sham : Tikus sehat diinjeksi NaCl
- Kelompok Kontrol : Tikus model DM tanpa perlakuan yang diinjeksi NaCl
- Kelompok P1 : Tikus model DM dengan injeksi sekretom *Hypoxia-MS* 0,25 cc
- Kelompok P2 : Tikus model DM dengan injeksi sekretom *Hypoxia-MS* 0,5 cc

3.5.8. Prosedur Staining Hematoxilin Eosin

Preparat dipanaskan di Hotplate 50°C selama 10 menit. Kemudian diangkat dan dimasukkan kedalam Xylol 1, xylol 2, xylol 3 masing-masing selama 3-5 menit supaya lilin lepas dari preparat. kemudian Preparat dikeringkan. setelah preparat mengering, preparat

dimasukkan dalam alkohol dengan kadar bertingkat naik (70%, 80%, 96%, dan 100%) selama 2-4 menit sambil digoyang-goyangkan. setelah tahapan tersebut, preparat dimasukkan kedalam larutan Hematoksilin selama 5 -7 menit. setelah diinkubasi dalam larutan HE, preparat kemudian dicuci dengan air mengalir selama 7 menit. setelah dicuci, preparat dicelupkan ke dalam larutan Eosin sebanyak 20 kali. kemudian preparat dicelupkan ke dalam air wadah I, II, dan III sebanyak 3 kali. Selanjutnya, preparat dicelupkan ke dalam larutan alkohol bertingkat turun 70%, 80%, 96% dan 100%. Setelah dicelupkan dalam alkohol bertingkat, preparat dibersihkan dari sisa Eosin yang menempel di bagian bawah objek glass dan dikeringkan. selanjutnya preparat dimasukkan dalam Xylol selama 3-5 menit. kemudian preparat diberi entelan dan ditutup dengan deck glass. dan tahapan terakhir preparat diberi nomor identitas sampel dan siap diperiksa dibawah mikroskop.

3.5.9. Pemeriksaan Histopatologis Sel Beta Pankreas

- Pemeriksaan histopatologi dilakukan melalui analisis morfometrik dengan menilai jumlah sel Beta pankreas.
- Sediaan yang telah dipulas diamati dengan menggunakan mikroskop riset.
- Sel Beta diidentifikasi dengan perbesaran, dihitung, lalu dicatat. Jumlah seluruh sel Beta (n) pada pulau Langerhans dihitung dari

lima pulau Langerhans yang diamati secara acak dan dinyatakan dalam satuan n/pulau.

- Luas rata-rata pulau Langerhans akan dianalisis dari hasil pengukuran dan dinyatakan dalam satuan μm^2 .
- Semua perubahan histopatologis yang terjadi pada pulau Langerhans, seperti apoptosis atau nekrosis jaringan, dicatat. Hasil pengamatan didokumentasikan dengan melakukan pemotretan dengan menggunakan optilab.

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 2021.

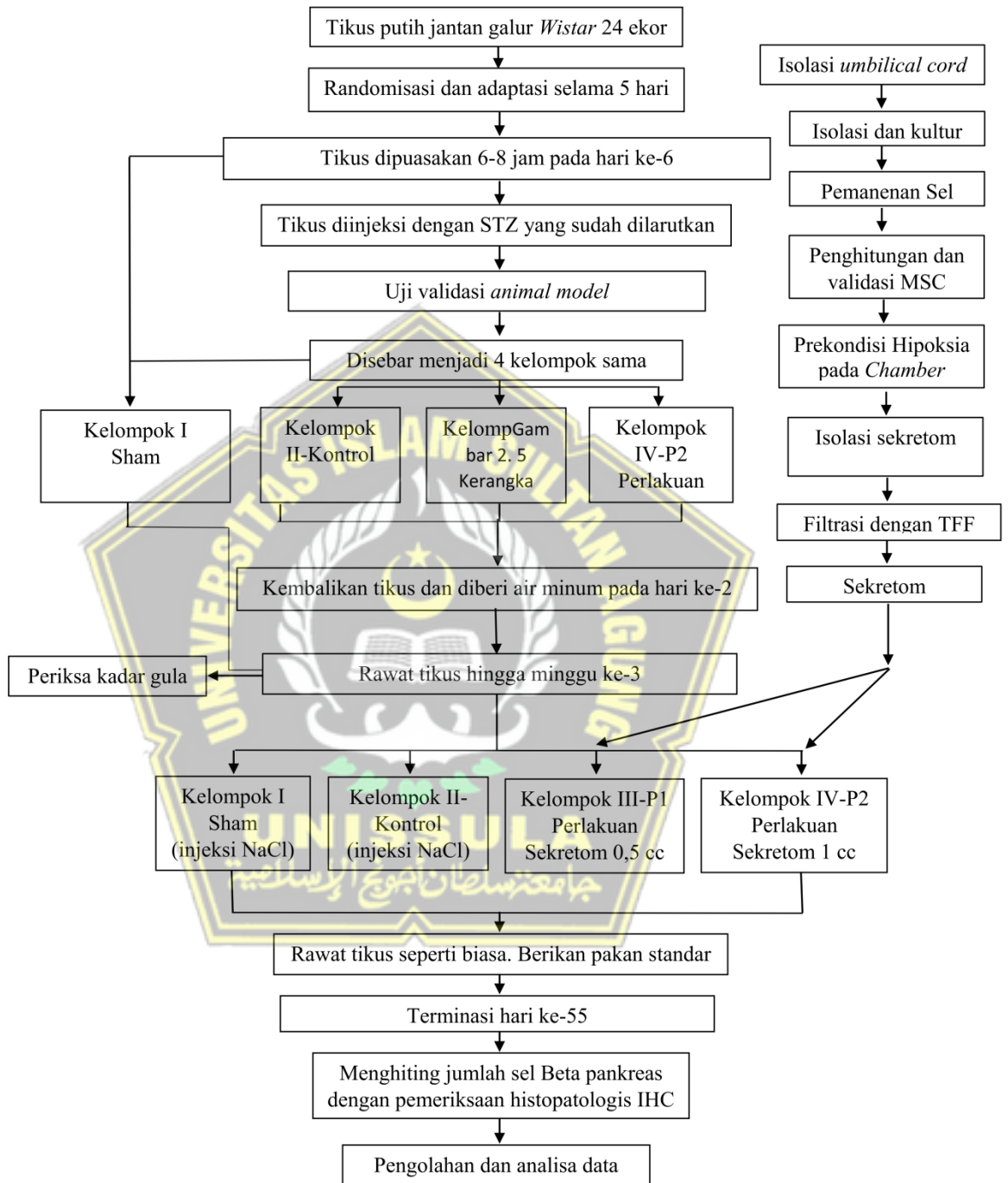
3.7. Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian akan disajikan dalam bentuk rerata \pm SD. Perbedaan antara rerata jumlah sel Beta akan dianalisis dengan menggunakan uji *one-way analysis of variance* (ANOVA). Uji *post-hoc Least Significant Difference* (LSD) digunakan untuk menentukan perbedaan spesifik rerata masing-masing kelompok jika analisis dengan uji *one-way* ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan sedangkan uji *post-hoc Mann-*

Whitney akan digunakan untuk menentukan perbedaan spesifik rerata masing-masing kelompok jika analisis dengan uji *independent* sampel *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil yang signifikan.



3.8. Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur Penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama pada Agustus 2021 hingga 7 September 2021, menggunakan subjek hewan model DM tipe-1. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan peningkatan jumlah sel Beta pankreas pada kelompok hewan model DM tipe-1 yang diberikan sekretom *Hypoxia*-MSC. Desain penelitian ini adalah *post test only control group design* 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

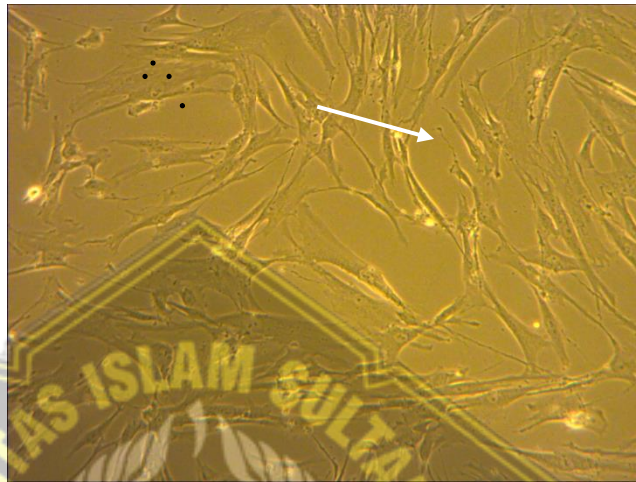
Hasil penelitian ini meliputi validasi terjadinya DM pada tikus berupa kadar gula darah, validasi MSC berupa kemampuan diferensiasi dan ekspresi *Cluster of Differentiation* (CD), dan jumlah sel Beta berupa gambaran histopatologi pankreas tikus.

4.1.1. Kadar Gula Darah Tikus

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

4.1.2. Morfologi *Stem Cell*

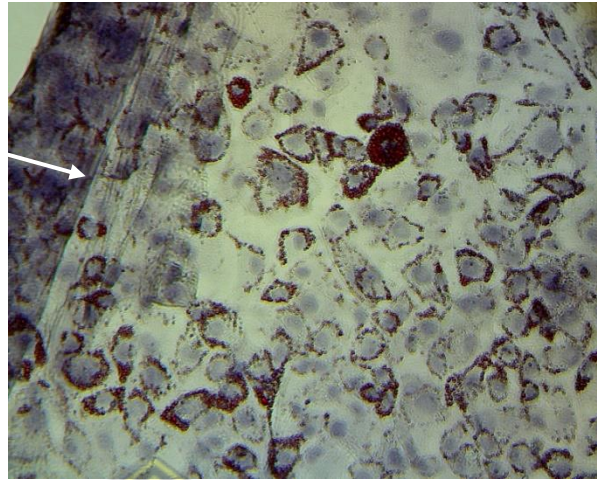
MSC yang dibiakkan dalam medium DMEM dan diamati menggunakan mikroskop inverter.



Gambar 4.1. Uji validasi MSCs dengan bentuk menyerupai fibroblas pada perbesaran mikroskop 200x. Tampak gambaran MSCs yang melekat pada permukaan plastic dengan konfluensi 80%.

4.1.3. Uji diferensiasi adipogenik

MSC dibiakkan dalam medium induksi adipogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop inverter. Sel-sel menyerupai mesenkim yang melekat pada awalnya 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.

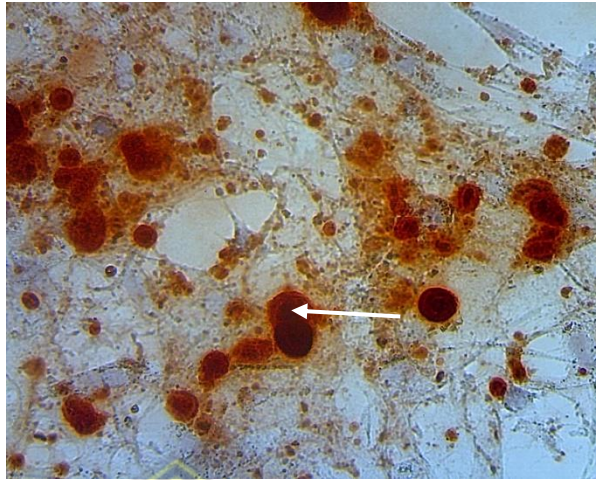


Gambar 4.2. Uji validasi MSCs diferensiasi adipogenik:
Perbesaran 200x

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

4.1.4. Uji diferensiasi osteogenik

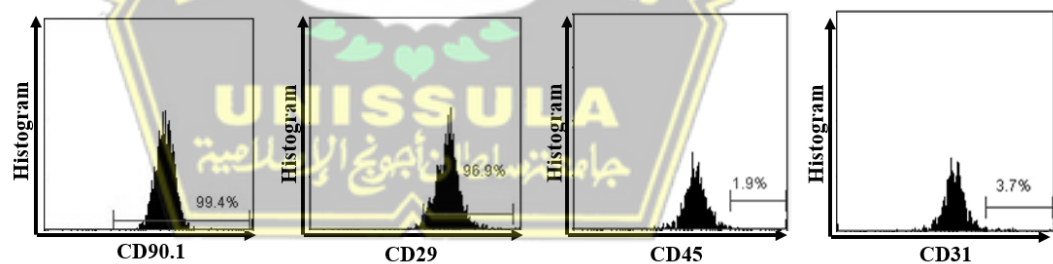
Sel dibiakkan dalam medium induksi osteogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop inverter. Awalnya sel-sel mirip mesenkim yang melekat tumbuh sebagai sel berbentuk gelendong, berkembang menjadi sel fibroblastoid multi-polar. Setelah dilakukan induksi diferensiasi osteogenik,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



Gambar 4.3. 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*.

4.1.5. Uji flowcytometry terhadap marker MSC



Gambar 4.4. 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%.

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)

4.1.6. Sel Beta

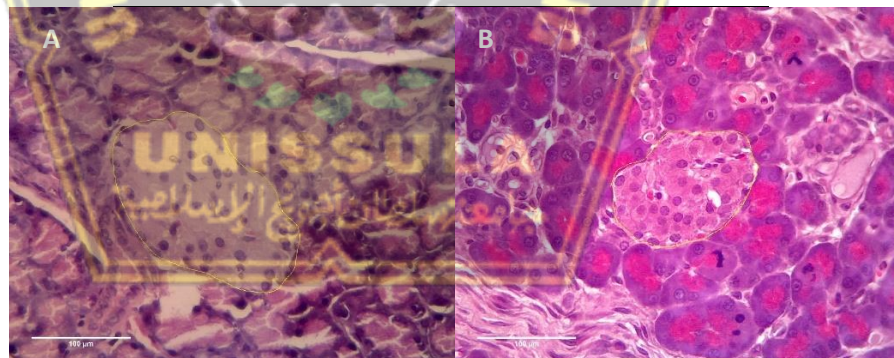
Perbaikan sel Beta pankreas ditunjukkan dengan gambaran histopatologi pada pemeriksaan IHC. Pemeriksaan histopatologi dilakukan melalui analisis morfometrik dengan menilai jumlah sel Beta. Dengan kemampuan sekretom dalam meningkatkan viabilitas sel islet pankreas (Al-Azzawi et al., 2020), maka diharapkan pada penelitian ini terjadi peningkatan sel Beta sesuai dengan jumlah fisiologis tubuh.

Dalam uji deskriptif jumlah sel Beta diuji normalitasnya menggunakan *Saphiro-Wilk* dan pengujian homogenitasnya menggunakan *Leuvene Statistic*. Hasil dari uji normalitas dan homogenitas didapatkan data normal ($P > 0,05$). Data uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel Beta yang

signifikan di antara semua kelompok ($P < 0.05$). Hasil dari rerata jumlah sel Beta diikuti uji *post-hoc*. Dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa pada perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) terdapat peningkatan jumlah sel Beta secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol ($P < 0,05$). Sedangkan kelompok P1 dan P2 tidak terjadi peningkatan sel Beta yang signifikan secara statistik dibandingkan kelompok sham, maupun antar keduanya ($P > 0,05$).

Tabel 4.2. Hasil Analisis Deskriptif Beta Cell

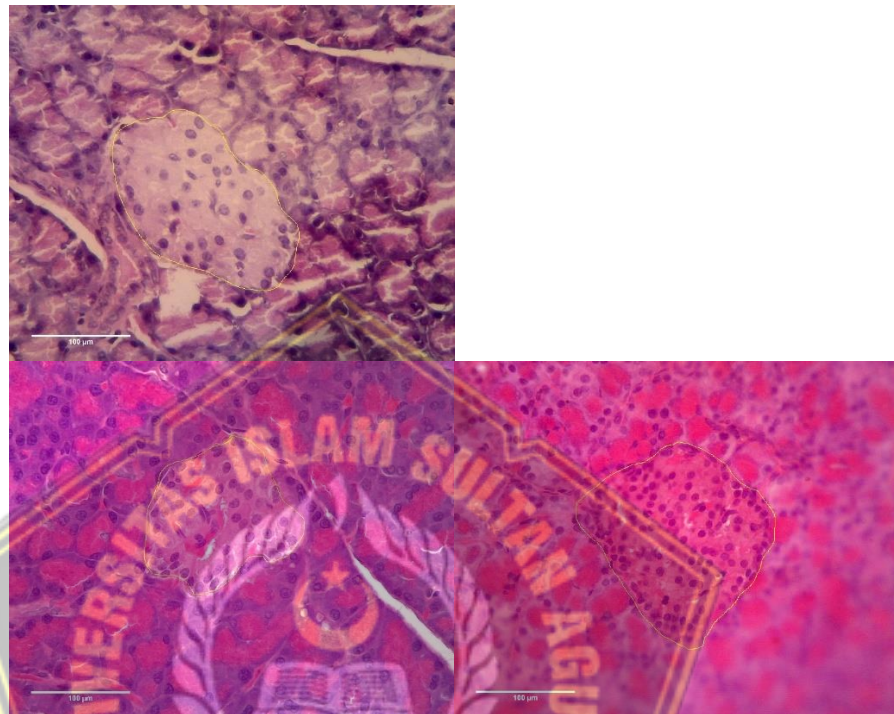
Kelompok	Rerata \pm SD
Sham	14,8 \pm 1,8
Kontrol	18,9 \pm 1,5
P1	21,4 \pm 3,6
P2	60,6 \pm 3,1



Gambar 4.5. Perbandingan pankreas kelompok sham/sehat (A) dengan kelompok kontrol (B).

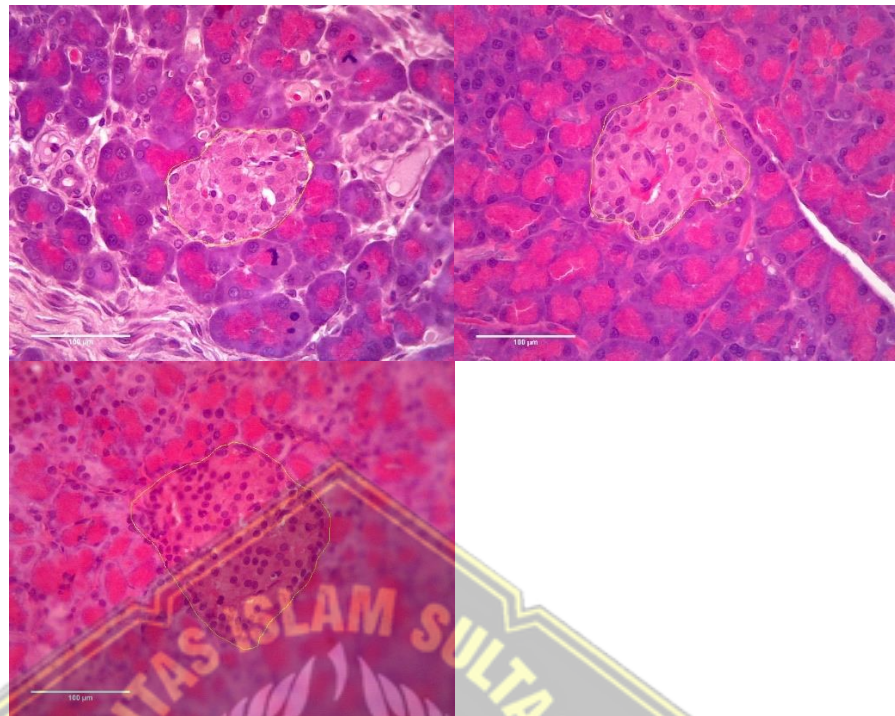
Pada pewarnaan HE, pulau langerhans ditunjukkan dengan sekelompok sel berwarna lebih terang. Dengan skala yang sama

(100x) nampak perbedaan luas pulau langerhans kelompok sham/sehat lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol.



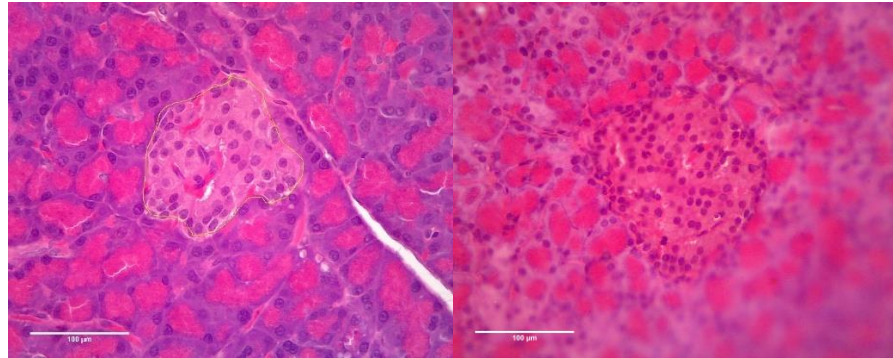
Gambar 4.6. Perbandingan pankreas kelompok Sham (A), P1 (B) dan P2 (C).

Dengan skala yang sama (100x) nampak perbedaan luas pulau langerhans kelompok sham lebih besar dibandingkan kelompok P1 (0,25 cc), akan tetapi populasi sel islet pada kelompok P1 nampak lebih massif. Selanjutnya untuk kelompok P2 (0,5 cc) terlihat luas pulau langerhans lebih besar dibandingkan dengan kelompok sham maupun P1 dengan populasi sel islet pada kelompok P2 nampak lebih massif dibandingkan seluruh kelompok.



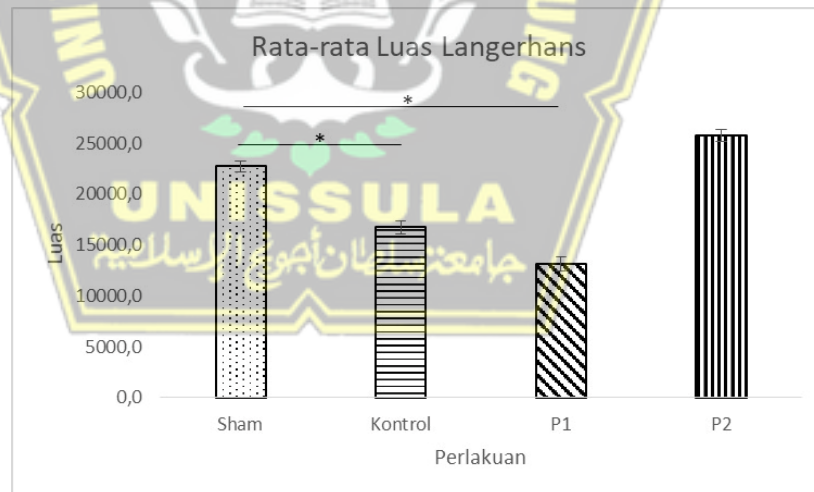
Gambar 4.7. Perbandingan pankreas kelompok kontrol (A), P1 (B) dan P2 (C).

Selanjutnya, dengan skala yang sama pula (100x) nampak perbedaan luas pulau langerhans kelompok kontrol lebih kecil dibandingkan kelompok P1 (0,25 cc) dan kelompok P2 (0,5 cc) lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun P1. Selain itu populasi sel islet pada kelompok P2 nampak lebih massif dibandingkan seluruh kelompok.

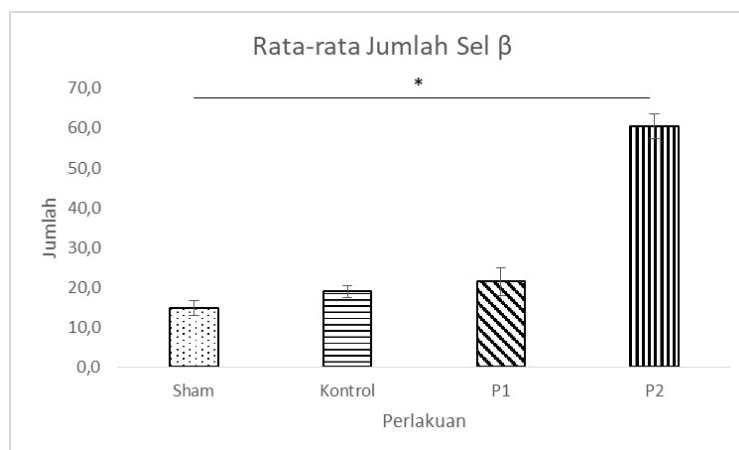


Gambar 4.8. Perbandingan pankreas kelompok P1 (C) dengan pankreas kelompok P2 (D).

Pada (Gambar 4.8) nampak perbedaan luas pulau langerhans kelompok P2 (0,5 cc) lebih besar dibandingkan dengan kelompok P1 (0,25 cc). Selain itu populasi sel islet pada kelompok P2 nampak lebih massif dibandingkan seluruh kelompok.



Gambar 4.9. Perbandingan luas pulau langerhans pada seluruh kelompok.



Gambar 4.10. Jumlah rata-rata sel Beta pada kelompok; Sham, Kontrol, P1, P2.

Jumlah sel Beta pankreas tikus pada kelompok sham, kontrol, P1, dan P2 setelah injeksi IP sekretom Hypoxia-MSC berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antar kelompok sig <0,05. Hasil Uji post-hoc LSD menunjukkan bahwa nilai sig <0,05 untuk semua perbandingan Kelompok Perlakuan sehingga diartikan terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan) rata-rata sel Beta berdasarkan perbandingan keempat kelompok perlakuan (sham, kontrol, P1, dan P2).

Sedangkan Hasil Uji post-hoc LSD yaitu perbandingan antara kelompok kontrol terhadap kelompok P1 menunjukkan bahwa nilai sig >0,05 (sig = 0,118) sehingga diartikan tidak terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan) rata-rata sel Beta berdasarkan perbandingan kelompok Kontrol terhadap Kelompok P1.

4.2. Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group* yaitu membandingkan pengaruh pemberian sekretom *Hypoxia*-MSC terhadap jumlah sel Beta pada tikus model DM tipe-1. Penelitian dilakukan selama empat puluh dua hari dimulai dari induksi DM menggunakan STZ selama dua puluh satu hari, dilanjutkan dengan perlakuan selama dua puluh 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 0,25 ml, sedangkan kelompok dua mendapat injeksi dengan kadar 0,5 ml sekretom *Hypoxia*-MSC, selanjutnya kelompok kontrol yang hanya dibiarkan DM 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 jumlah sel Beta 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).

DM tipe-1 adalah suatu penyakit yang muncul akibat proses autoimun pada sel endokrin pankreas yang menyebabkan kerusakan sel endokrin dan defisiensi insulin (Paschou et al., 2018). Pemberian insulin eksogen masih menjadi pengobatan sebagai gold standard DM khususnya (tetapi tidak eksklusif) untuk DM tipe-1. Pasien DM tipe-1 memiliki kadar insulin yang rendah, pemberian insulin secara eksogen berfungsi untuk membantu tubuh melakukan metabolismenya. Namun pemberian bolus insulin eksogen pada pasien DM dapat menyebabkan hiperglikemia maupun hipoglikemia, tanpa pengaturan kadar glukosa darah fisiologis yang konstan dan harmonis. Pergantian puncak hiper dan hipoglikemia memberi peluang pada siklus tinggi atau rendahnya glukosa darah, dengan konsekuensi pada mikrosirkulasi yang meningkatkan risiko pengembangan efek samping jangka panjang DM yang utama, seperti nefropati dan neuropati (Donzelli, 2020). Transplantasi islet primer menawarkan pendekatan yang efektif untuk merawat pasien dengan DM tipe-1. Namun, terhambat oleh 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. Imunomodulator telah menjadi perhatian terkait regulasi respon imun dalam penghindaran interaksi yang

merugikan antara sistem imun dan sel pankreas. (Srvanathi & 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 jumlah sel Beta pada tikus yang mengalami destruksi sel endokrin dan menyebabkan kadar insulin menurun setelah induksi STZ. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah sel Beta baik pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 terhadap kelompok kontrol. Peningkatan tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan 2 dengan jumlah rata-rata sel Beta 60,67/pulau (lihat tabel 4.10), sedangkan peningkatan terendah terjadi pada kelompok perlakuan 1 yaitu 21,4/pulau (lihat tabel 4.10). Semua peningkatan yang telah disebutkan bernilai signifikan secara statistik ($P < 0,05$). Efikasi terapi sekretom *Hypoxia*-MSC juga ditunjukkan dengan tidak signifikannya peningkatan jumlah sel Beta pada kelompok perlakuan 1 dan 2 terhadap kelompok sham (tikus sehat) secara statistik ($P > 0,05$). Peningkatan jumlah sel Beta secara keseluruhan ditunjukkan lebih tinggi pada kelompok perlakuan 2 (konsentrasi 0,5 cc) dibandingkan perlakuan 1 (konsentrasi 0,25 cc), namun tidak didapatkan beda signifikan diantara keduanya. Hal ini menunjukkan pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 secara statistik memberikan efikasi yang sama.

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 cytochrome 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- γ adalah sitokin yang dapat bekerja secara sinergis selama peradangan sel Beta, 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

Beta 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 DM 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 mengaktifasi 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).

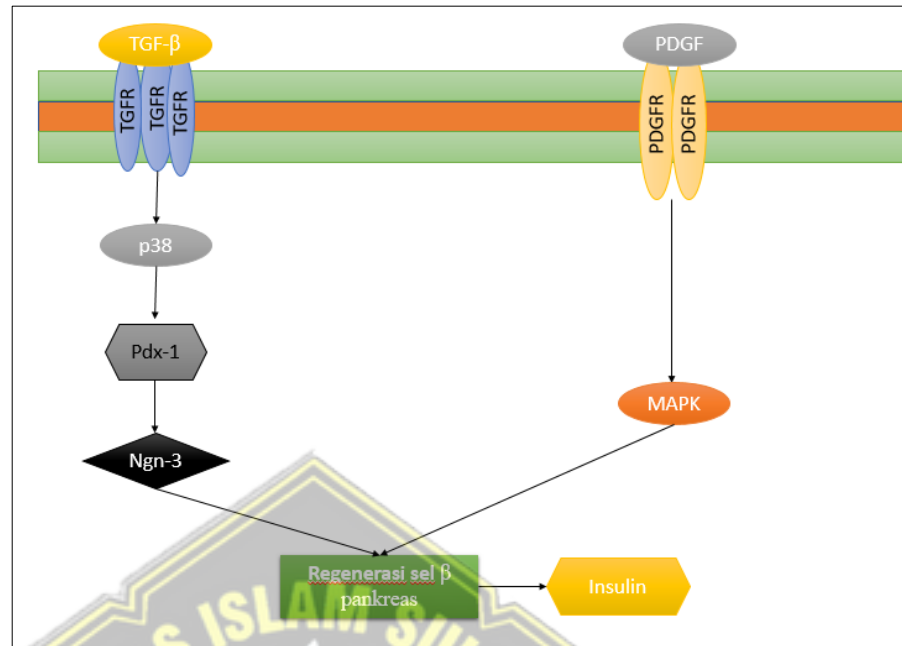
Kandungan IL-10 pada sekretom dapat meregulasi jalur JAK-STAT melalui SOCS-3 yang diaktivasi IL-10 (X. Liu et al., 2012). Dalam penelitian yang dilakukan (Hovsepian et al., 2013) menunjukkan SOCS-3 diperlukan untuk penghambatan oleh IL-10 terhadap NF- κ B. IL-10 mampu mengaktifkan STAT3 yang pada gilirannya 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 Beta 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).

Terapi DM tipe-1 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 Beta 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 *panreatic 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 Beta pankreas (Kubo et al., 2011). PDGF dengan jalur persinyalan serupa (MAPK) juga berperan dalam proses regenerasi dan proliferasi terhadap sel Beta pankreas (Benthuisen et.al., 2016). Pada akhirnya proliferasi pada sel Beta pankreas dapat membawa pada kenaikan kembali kapasitas sekresi insulin (Boland, Rhodes, & Grimsby, 2017).



Gambar 4.11. Mekanisme regenerasi sel Beta 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 DM tipe-1 dan meningkatkan proliferasi dari sel Beta pankreas yang rusak, yang pada akhirnya dapat meningkatkan sekresi insulin oleh sel Beta pankreas.

Oleh karena itu penelitian ini dapat membuktikan peningkatan jumlah sel Beta oleh sekretom Hypoxia-MSC pada tikus yang mengalami DM tipe-1.

4.2.1. Beda penelitian terdahulu

Pada penelitian sebelumnya terdapat penelitian mengenai terapi injeksi sekretom normoksik secara intraperitoneal pada tikus DM yang diinduksi STZ dengan hasil bahwa terapi kelompok injeksi sekretom intraperitoneal meningkatkan jumlah *insulin positive cells* karena perbaikan sel Beta secara signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol (Hashemi et al., 2020).

4.2.2. Keterbatasan Penelitian

- Penelitian ini memiliki tidak memiliki kelompok terapi sekretom normoksia sebagai pembanding untuk menguatkan efikasi terapi sekretom hipoksia.
- Penelitian dengan model terapi sekretom (baik normoksia maupun dengan induksi lainnya) pada tikus model DM tipe 1 dengan melihat sel Beta belum pernah dilakukan pada penelitian sebelumnya, 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*-MSC dengan dosis 0,25 cc terhadap jumlah sel Beta pada DM tipe-1 berupa peningkatan luas pulau langerhans dan jumlah sel Beta.
- 5.1.2. Terdapat pengaruh sekretom *Hypoxia*-MSC dengan dosis 0,5 cc terhadap jumlah sel Beta pada DM tipe-1 berupa peningkatan jumlah sel Beta.
- 5.1.3. Peningkatan jumlah sel Beta paling tinggi dihasilkan dengan terapi sekretom *Hypoxia*-MSC dengan dosis 1 cc.
- 5.1.4. Tidak terdapat beda signifikan secara statistik antara pemberian sekretom dosis 0,25 cc dengan 0,5 cc pada peningkatan jumlah sel Beta.

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 pembanding efikasi sekretom hipoksia.
- 5.2.2. Penambahan variabel penelitian untuk mengetahui pengaruh sekretom *Hypoxia*-MSC terhadap sel pankreas lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Abunasef, S.K., Amin, H.A. and Abdel-Hamid, G.A. (2014) 'A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 52(1), pp. 42–50. Available at: <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0005>.
- Ahangar, P., Mills, S.J. and Cowin, A.J. (2020) 'Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21197038>.
- Andalia, N., Safrida and Sabri, M. (2017) 'EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP STRUKTUR MIKROSKOPIS SEL BETA PANKREAS TIKUS HIPERGLIKEMIK', *Jurnal EduBio Tropika*, 5(April), pp. 1–53.
- Benavides-Castellanos, M.P., Garzón-Orjuela, N. and 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), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13619-020-00047-3>.
- Berebichez-Fridman, R. and 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), pp. e264–e277. Available at: <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>.
- Damasceno, D.C. *et al.* (2014) 'Streptozotocin-induced diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes', *BioMed Research International*, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/819065>.
- Eleuteri, S. and Fierabracci, A. (2019) 'Insights into the secretome of

mesenchymal

stem cells and its potential applications’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>.

Ezquer, F. *et al.* (2012) ‘The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment’, *Stem Cells*, 30(8), pp. 1664–1674. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.1132>.

Ferreira, J.R. *et al.* (2018) ‘Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning’, *Frontiers in Immunology*, 9(December), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>.

Galicia-Garcia, U. *et al.* (2020) ‘Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), pp. 1–34. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.

Goyal, R. and Jialal, I. (2022) ‘Diabetes Mellitus Type 2.’, in. Treasure Island (FL).

HS, Z. and Putra, A. (2018) ‘Peran Mesenchymal Stem Cells dalam Regulasi PDGF dan Sel Islet pada Diabetes’, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 30(2), p. 98. Available at: <https://doi.org/10.21776/ub.jkb.2018.030.02.4>.

Johannesson, B. *et al.* (2015) ‘Toward beta cell replacement for diabetes’, *The EMBO Journal*, 34(7), pp. 841–855. Available at: <https://doi.org/10.15252/emboj.201490685>.

Kahanovitz, L., Sluss, P.M. and Russell, S.J. (2017) ‘Type 1 diabetes-a clinical perspective’, *Point of Care*, 16(1), pp. 37–40. Available at:

<https://doi.org/10.1097/POC.000000000000125>.

- Lucier, J. and Weinstock, R.S. (2022) 'Diabetes Mellitus Type 1.', in. Treasure Island (FL).
- Mathew, P. and Thoppil, D. (2022) 'Hypoglycemia.', in. Treasure Island (FL).
- Moreira, A., Kahlenberg, S. and Hornsby, P. (2017) 'Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes', *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(3), pp. R109–R120. Available at: <https://doi.org/10.1530/JME-17-0117>.
- Nally, L.M. *et al.* (2019) 'Pharmacologic treatment options for type 1 diabetes: what's new?', *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(5), pp. 471–479. Available at: <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1597705>.
- Paschou, S.A. *et al.* (2018) 'On type 1 diabetes mellitus pathogenesis', *Endocrine Connections*, 7(1), pp. R38–R46. Available at: <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>.
- Pulungan, A.B., Annisa, D. and Imada, S. (2019) 'Diabetes Melitus Tipe-1 pada Anak: Situasi di Indonesia dan Tata Laksana', *Sari Pediatri*, 20(6), p. 392. Available at: <https://doi.org/10.14238/sp20.6.2019.392-400>.
- S, M. (2018) 'Anatomi Fisiologi Sistem Endokrin', *Vera Kartawijaya*, (2504), pp. 1–21.
- Scuteri, A. and Monfrini, M. (2018) 'Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19092783>.
- Secrest, A.M., Washington, R.E. and Orchard, T.J. (2014) 'Chapter 35: Mortality in Type 1 Diabetes', *Diabetes in America*, pp. 1–16.
- Skelin, M., Rupnik, M. and Cencic, A. (2010) 'Pancreatic beta cell lines and their

applications in diabetes mellitus research.’, *Altex*, 27(2), pp. 105–113.
Available at: <https://doi.org/10.14573/altex.2010.2.105>.

Solis-Herrera, C. *et al.* (2000) ‘Classification of Diabetes Mellitus.’, in K.R.

Feingold *et al.* (eds). South Dartmouth (MA).

Wajchenberg, B.L. (2007) ‘B-Cell Failure in Diabetes and Preservation By
Clinical

Treatment’, *Endocrine Reviews*, 28(2), pp. 187–218. Available at:
<https://doi.org/10.1210/10.1210/er.2006-0038>.

Waseem, M. *et al.* (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), pp. 344–355. Available at: <https://doi.org/10.1089/cell.2016.0002>.

