

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*  
*STEM CELLS* TERHADAP KADAR IL-10**

**(Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)**

**Skripsi**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai gelar Sarjana Kedokteran**



diajukan oleh

**Intan Permatasari Sutrisman**

**30101900106**

FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG

2022

**SKRIPSI**  
**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL***  
***STEM CELLS* TERHADAP KADAR IL-10**

(Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh  
**Intan Permatasari Sutrisman**  
30101900106

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
pada 27 Januari 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Susunan Tim Penguji**

Pembimbing I



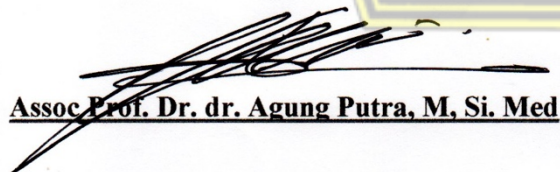
dr. Arini Dewi Antari, M.Biomed

Anggota Tim Penguji

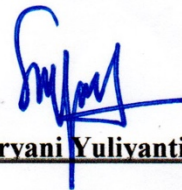


dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A., M.Biomed

Pembimbing II



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



Dr. dr. Survani Yuliyanti, M.Kes

Semarang, 27 Januari 2023  
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 : Intan Permatasari Sutrisman

NIM : 30101900106

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul:

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP KADAR IL-10 (Studi Eksperimental In Vivo pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)**

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

Semarang, 27 Januari 2023



Intan Permatasari Sutrisman

## 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 IL-10 (Studi Eksperimental Pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)”

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

1. Kedua orang tua tercinta Ibunda Juwita Sari Kristiyanti dan Ayahanda Sutrisman, 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. dr. Arini Dewi Antari, M.Biomed dan Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si, Med, 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 membantu dalam pengarahannya penulisan.

5. Terimakasih kepada teman-teman saya, terkhusus Paguyuban Pak Budi, Finanda, dan Kak Baghas yang selalu memberi semangat, menemani, dan membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Terimakasih kepada seluruh pihak yang sudah ikut serta membantu saya untuk terselesainya skripsi ini.

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





## DAFTAR ISI

SURAT PERNYATAAN.....	ii
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kadar Interleukin (IL)-10.....	6
2.1.1 Pengertian.....	6
2.1.2 Protein, Gen dan Ekspresi IL-10.....	8
2.1.3 Jalur Sinyal Produksi IL-10.....	9
2.1.4 Jalur Sinyal dan Mekanisme Kerja IL-10.....	10
2.2 Sekretom <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (MSCs)</i> .....	11
2.2.1 Pengertian.....	11
2.2.2 Sumber.....	13
2.3 Diabetes Mellitus Tipe-1.....	14
2.3.1 Pengertian.....	14

2.3.2	Patofisiologi .....	15
2.4	Hubungan Sekretom <i>Mesenchymal Stem Cells</i> terhadap Kadar IL-10 ..	16
2.5	Kerangka Teori.....	18
2.6	Kerangka Konsep .....	19
2.7	Hipotesis .....	19
BAB 3	METODE PENELITIAN .....	20
3.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	20
3.2	Variabel dan Definisi Operasional .....	21
3.2.1	Variabel.....	21
3.2.2	Definisi Operasional.....	21
3.3	Populasi dan Sampel.....	22
3.3.1	Populasi.....	22
3.3.2	Sampel.....	22
3.3.3	Teknik Pengambilan Sampel.....	23
3.3.4	Besar Sampel.....	23
3.4	Instrumen dan Bahan Penelitian .....	23
3.4.1	Instrumen.....	23
3.4.2	Bahan.....	24
3.5	Cara Penelitian.....	24
3.5.1	Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> Tikus	24
3.5.2	Tahap Persiapan Passage.....	25
3.5.3	Proses <i>Passage</i> Sel.....	25
3.5.4	Proses Validasi Sel.....	26
3.5.5	Proses Pemanenan Sel.....	26
3.5.6	Proses Penghitungan Sel .....	27
3.5.7	Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom .....	27
3.5.8	Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1 .....	28
3.5.9	Perlakuan pada Hewan Coba .....	30
3.5.10	Analisis Kadar IL-10 Menggunakan ELISA.....	30
3.6	Alur Penelitian.....	32
3.7	Tempat dan Waktu .....	33
3.7.1	Tempat.....	33

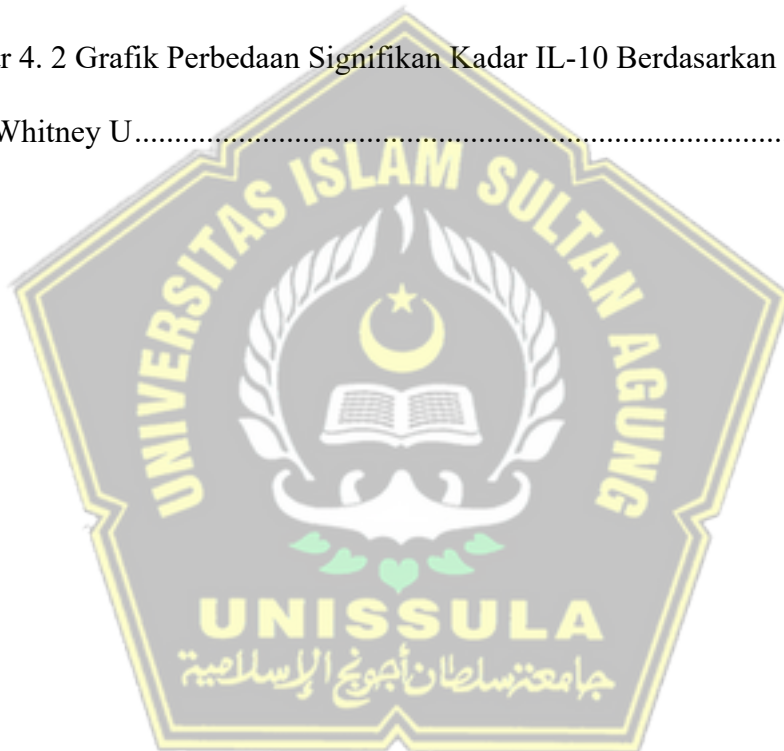


3.7.2	Waktu .....	33
3.8	Analisis Hasil.....	33
BAB 4	.....	34
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....		34
4.1	Hasil Penelitian .....	34
4.1.1	Analisis Deskriptif.....	35
4.1.2	Analisis Bivariat.....	37
4.2	Pembahasan.....	39
BAB 5	.....	44
KESIMPULAN DAN SARAN.....		44
5.1	Kesimpulan .....	44
5.2	Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA .....		45
LAMPIRAN.....		49



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Kerangka Teori.....	18
Gambar 2. 2 Kerangka Konsep .....	19
Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian post-test only group.....	20
Gambar 3. 2 Alur Penelitian.....	32
Gambar 4. 1 Grafik Rerata Jumlah Kadar IL-10.....	36
Gambar 4. 2 Grafik Perbedaan Signifikan Kadar IL-10 Berdasarkan Uji Post Hoc Mann Whitney U.....	38



## DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Data Konfirmasi Tikus Penelitian.....	35
Tabel 4. 2 Hasil Rerata Jumlah IL-10 .....	35
Tabel 4. 3 Hasil Uji Normalitas Jumlah Kadar IL-10.....	36
Tabel 4. 4 Hasil uji Homogenitas Jumlah Kadar IL-10 .....	37
Tabel 4. 5 Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i> Data Jumlah Kadar IL-10.....	38
Tabel 4. 6 Hasil Uji <i>Mann Whitney U</i> Data Jumlah Kadar IL-10.....	38

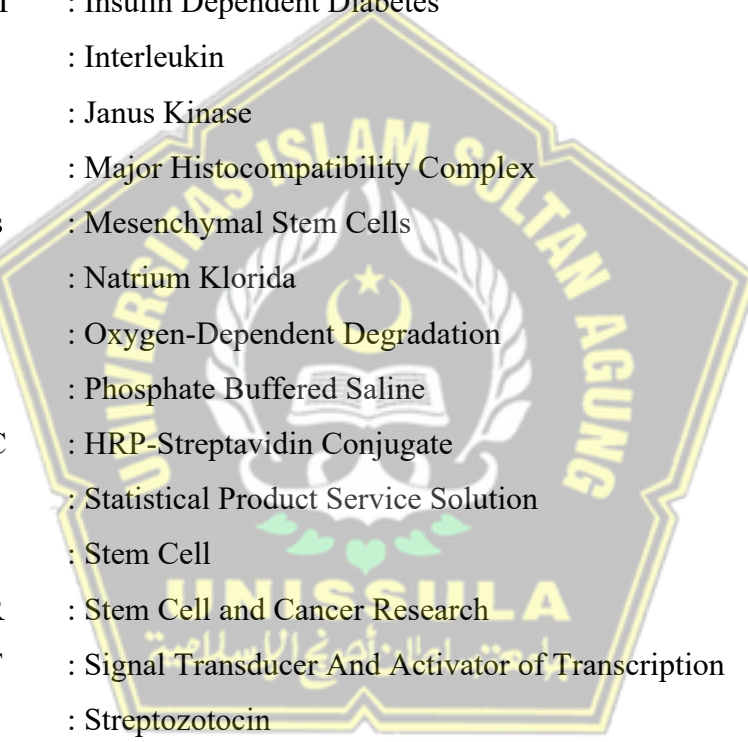


## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian .....	49
Lampiran 2. Surat Keterangan Selesai Penelitian .....	50
Lampiran 3. Ethical Clearance .....	51
Lampiran 4. Data Penelitian.....	52
Lampiran 5. Hasil Uji Deskriptif, Normalitas, dan Homogenitas Data Kadar IL-10 .....	53
Lampiran 6. Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i> dan <i>Mann Whitney U</i> Jumlah Kadar IL-10 .....	55
Lampiran 7. Kegiatan Perawatan dan Perlakuan Hewan Coba.....	57
Lampiran 8. Surat Undangan Ujian Hasil.....	58



## DAFTAR SINGKATAN



AT	: Adipocyte Tissue
CD	: Cluster of Differentiation
DM	: Diabetes Mellitus
DMT1	: Diabetes Mellitus tipe 1
HLA	: Human Leucoyte Antigen
HIFs	: Hypoxia-Inducible Factors
IDDM	: Insulin Dependent Diabetes
IL	: Interleukin
JAK	: Janus Kinase
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MSCs	: Mesenchymal Stem Cells
NaCl	: Natrium Klorida
ODD	: Oxygen-Dependent Degradation
PBS	: Phosphate Buffered Saline
SABC	: HRP-Streptavidin Conjugate
SPSS	: Statistical Product Service Solution
SC	: Stem Cell
SCCR	: Stem Cell and Cancer Research
STAT	: Signal Transducer And Activator of Transcription
STZ	: Streptozotocin
TFF	: Tangential Flow Filtration
TNF	: Tumor Necrosis Factor
UCB	: Umbilical cord
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VPF	: Vascular Permeability Factor
WHO	: World Health Organization

## INTISARI

IL-10 dikenal sebagai sitokin yang mampu menekan proses inflamasi akibat autoimun pada diabetes tipe 1. Sekarang telah dikembangkan sekretom *MSCs* dengan prakondisi hipoksia sebagai terapi alternatif dengan keunggulan berupa tidak ada risiko terjadinya penolakan imun. Tujuan dari penelitian ini untuk membuktikan peningkatan kadar IL-10 tikus model diabetes tipe 1 pada kelompok perlakuan dengan sekretom *Hypoxia-MSCs* yang dibandingkan dengan kontrol. Penelitian ini dilakukan di *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Universitas Islam Sultan Agung. Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian “*post test only control group design*” dengan 15 hewan coba tikus yang dirandomisasi menjadi 3 kelompok meliputi kelompok : kontrol (STZ 65mg/kgBB), P1 (0,5 cc sekretom *Hypoxia-MSCs*), P2 (1 cc sekretom *Hypoxia-MSCs*). Induksi diabetes menggunakan STZ dilakukan 1 kali pada hari ke-6 pemeliharaan tikus lalu dirandomisasi setelah pengujian kadar gula darah. Sedangkan pemberian terapi sekretom *Hypoxia-MSCs* dilakukan 1 kali pada hari ke-21 dan dilakukan pengambilan sampel pada hari ke-30, untuk pengukuran kadar IL-10 menggunakan ELISA setelah pengambilan sampel darah melalui vena mata. Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan signifikan baik pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $P < 0,05$ ). Namun tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan 1 dan 2 ( $P > 0,05$ ). Sehingga disimpulkan bahwa terapi sekretom *Hypoxia-MSCs* berpengaruh terhadap kadar IL-10 pada tikus model diabetes tipe 1.

**Kata Kunci:** *MSCs*, Hipoksia, Sekretom *Hypoxia-MSCs*, IL-10.

UNISSULA  
جامعة سلطان أبوبوع الإسلامية



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) ialah kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang ditemukan akibat kelainan sekresi insulin, kerja insulin, maupun keduanya (Setyawati et al., 2020). Diabetes Mellitus (DM) tipe 1 atau yang lebih diketahui dengan sebutan Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). Sel beta pankreas merupakan sel yang memproduksi insulin yang berperan untuk mengontrol tingkat glukosa di tubuh. Kerusakan sel beta pankreas yang menggapai 80-90% akan memicu gejala DM. Rusaknya sel beta pankreas karena pengaruh reaksi autoimun dalam DM tipe 1 dapat menyebabkan insulinopenia. Kondisi ini ditandai dengan adanya inflamasi kronik pada Pulau Langerhans di pankreas (Clark et al., 2017). Reaksi autoimun yang mengakibatkan rusaknya sel beta pankreas karena sel T menyerang sel penghasil insulin tersebut. Aktivitas dari sel imun ini menyebabkan inflamasi sehingga dibutuhkan sitokin antiinflamasi. Dengan efek sitokin antiinflamasi yang menekan peradangan ini dapat mencegah terjadinya kerusakan jaringan maupun organ target (Salari et al., 2020). Adapun sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan IL-35 untuk menekan inflamasi yang terjadi pada diabetes tipe 1 salah satunya dengan *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)* (DiMeglio et al., 2019). *MSCs* telah muncul sebagai sel yang berguna untuk terapi imunomodulasi karena kemampuannya

dalam mensekresi sejumlah besar molekul bioaktif yang mempengaruhi sistem imun dan respon inflamasi (Katuchova et al., 2015) Saat ini sedang dikembangkan sekretom yang merupakan salah satu produk MSCs namun sejauh ini masih sangat terbatas dan perlu dikembangkan.

International Diabetes Federation melaporkan terdapat 415 juta penderita diabetes mellitus (DM) dengan angka prevalensi 9,1 pada tahun 2015 dan 10 pada tahun 2040. Total pasien DM tipe 1 sejumlah 5-10% dan DM tipe 2 sejumlah 90-95% dari pasien DM dalam keseluruhan dunia (ADA, 2020). DM tipe 1 bisa menyebabkan komplikasi berjangka pendek dan juga berjangka panjang. Komplikasi jangka pendek ini bisa berupa hipoglikemia dan ketoasidosis (KAD) ketika pertama kali terdiagnosis atau dampak dari penggunaan insulin yang tidak tepat (Adelita et al., 2020). Apabila tidak diobati, komplikasi dari penyakit ini dapat berujung terhadap mortalitas dan morbiditas yang parah. Transplantasi sel pankreas menunjukkan hasil yang baik dalam pengendalian diabetes, tetapi keterbatasan donor dan penolakan sel imun merupakan hambatan. Penolakan terjadi karena sistem imun menganggap organ tersebut sebagai benda asing sehingga organ transplantasi pun rusak. Selain itu, injeksi yang dimediasi insulin membawa risiko kecanduan jangka panjang, kesulitan mengatur kadar insulin eksogen dan resistensi insulin (Dang et al., 2017). Pesatnya ilmu pengetahuan dan teknologi dalam aspek biologi molekuler mengembangkan berbagai metode pengujian aktivitas antidiabetes. Penggunaan sekretom sebagai salah satu produk stem sel sebagai terapi adjuvan yang dapat dipakai sebagai

pengobatan baru yang diharapkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Stem Cells* itu sendiri.

DM tipe 1 terjadi akibat kerusakan sel pankreas dan merupakan penyakit autoimun dengan karakteristik inflamasi kronik pada organ tersebut (Clark et al., 2017). Reaksi autoimun yang menimbulkan inflamasi pada sel beta pankreas menyebabkan terbentuknya antibodi. Antibodi ini merupakan antibodi terhadap sel beta, yaitu *Islet Cell Antibody* (ICA). Apabila terjadi reaksi antara antibodi ICA bersama antigen sel beta, maka akan menimbulkan kehancuran sel beta pankreas (Marzel, 2020). Mediator inflamasi yang diduga berperan dalam inflamasi sel pankreas merupakan aksi sinergik dari IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-1 $\beta$ . Oleh sebab itu, diperlukannya anti inflamasi seperti IL-10, TGF $\beta$ 1, IL-35 untuk menghentikan proses inflamasi yang terjadi (Tsalamandris et al., 2019). MSCs diketahui memiliki sifat immunomodulator dan anti inflamasi yang kuat sehingga MSCs merupakan alat yang potensial untuk mengobati penyakit yang berhubungan dengan inflamasi. Adapun salah satu sitokin yang disekresikan berupa *interleukin* (IL)-10. Dimana IL-10 merupakan sitokin anti inflamasi (Salari et al., 2020). *Conditional medium* (CM), yang diperoleh menurut modifikasi kultur hipoksia MSCs mempunyai kandungan sitokin dan faktor pertumbuhan yang relatif tinggi. Penelitian adnyana, menunjukkan *Conditional Mediumhypoxia* (HCM) dari *bone marrow-mesenchymal stem cell* (BMMCS) yang dikultur pada oksigen 2% termasuk menghasilkan *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Interleukin 1- (IL-10) dan Interleukin 8 (IL-8) (Adnyana, 2019).

Penelitian Wu dkk (2013) menunjukkan improvisasi islet pankreas oleh MSCs. Kerusakan pankreas akibat inflamasi terus menerus diberikan MSCs pada tikus model dan diamati selama 13 minggu. Hasil yang signifikan menunjukkan peningkatan anti inflamasi dan faktor immunosupresif seperti *Interleukin – 10*, dan *transforming growth factor-β* (Wu et al., 2013).

Berdasarkan gambaran proses diatas dan tidak adanya pembahasan lebih lanjut, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui "Pengaruh sekretom *Mesenchymal Stem Cells* terhadap kadar IL-10 tikus model diabetes tipe 1".

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian *Secretome Mesenchymal Stem Cells* berpengaruh terhadap kadar IL-10 pada tikus diabetes tipe 1?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh dari sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* terhadap kadar IL-10 pada tikus model diabetes tipe 1.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk membuktikan peningkatan kadar IL-10 pada kelompok perlakuan yang mendapatkan sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dosis 0,5 dan 1 cc dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian *secretome hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap kadar IL-10 tikus model diabetes tipe 1.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan sumber informasi pada masyarakat mengenai penggunaan *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* pada pasien dengan diabetes mellitus tipe 1.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kadar Interleukin (IL)-10

##### 2.1.1 Pengertian

*Interleukin-10* (IL-10) sudah diketahui umum merupakan sitokin antiinflamasi yang mempunyai efek inhibisi dalam menghindari penyakit autoimun, respons antipati pencangkokan ataupun kanker. IL-10 awal kali dipaparkan merupakan *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF) dikarenakan bisa memberi penekanan aktivasi dan produksi sitokin yang diproduksi sel Th1. Kemampuan IL-10 untuk membatasi produk sitokin baik oleh sel- T dan NK dengan cara tidak langsung lewat halangan dalam kemampuan aktivitas sel makrofag atau monosit. Riset lebih lanjut membuktikan kalau IL- 10 pula membatasi kemampuan aktivitas makrofag atau monosit mencakup pada campuran monokin, produksi nitrit oksida dan ekspresi MHC klas II serta anasir kostimulator semacam IL-12 dan CD80/CD86.

Mulanya IL-10 diasumsikan merupakan sitokin yang diperoleh sel Th2 tetapi sudah diperoleh luas kalau IL- 10 tidak diperoleh dengan cara terbatas dalam subset sel- T khusus namun diperoleh atau diterima oleh nyaris seluruh sel leukosit. Dengan cara *in vivo*, sumber utama IL-10 adalah monosit, makrofag, dan sel Th meskipun begitu sel imun efektor misalnya sel-B, sel-T sitotoksik, sel mast, sel NK, sel granulosit seperti



neutrofil maupun eosinofil pun bisa menciptakan IL-10. Sebagai penambah bahwasanya sel bukan imun semacam sel epitel dan keratinosit pula bisa menciptakan IL-10 sebagai reaksi kepada peradangan ataupun kehancuran jaringan. Oleh sebab produksi IL-10 berhubungan terhadap banyak sel imun, perihal ini meyakinkan kedudukan berartinya sebagai pengatur respon balik bermacam reaksi imun, tidak cuma reaksi imun yang dimediasikan oleh sel Th1 tetapi pula reaksi sel imun dimediasi oleh sel Th2.

Interleukin-10 dengan cara poten memberi hambatan produksi IL-6, IL-12, IL-18, TNF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF dan PAF dari monosit/makrofag yang teraktivasi. Efek inhibisi IL-10 terhadap IL-1 serta produksi TNF amat penting kepada kegiatan mencegah inflamasi sebab sitokin itu mempunyai kegiatan yang sinergis pada rute dan proses inflamasi dan untuk menguatkan reaksi inflamasi dengan memicu mediator inferior semacam kemokin, prostaglandin dan PAF. Interleukin-10 pula membatasi produksi kemokin CC (MCP1, MCP5, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$ , Mip-3 $\alpha$ , Mip-3 $\beta$ , Rantes, MDC) dan CXC (IL-8, IP-10, MIP-2, KC(Gro- $\alpha$ )) oleh monosit yang teraktivasi. Kemokin ini mengemban tanggung jawab untuk perekrutan sel T, neutrofil, sel monosit, dan sel dendritik. Tidak hanya itu, IL-10 pula mempunyai kemampuan guna pengaruhi reaksi Th1 dan Th2 dengan cara tidak langsung.

### 2.1.2 Protein, Gen dan Ekspresi IL-10

Riset awal membuktikan bahwasanya IL- 10 berupa dimer, tetapi lewat analisis biokimia dan kristal grafis sinar- X membuktikan IL- 10 berupa homodimer nonkovalen yang sensitif kepada asam dengan kaitan polipeptida yang mendekati dengan IFN- $\gamma$  (Wang et al., 2018). Peptida sintesis yang berawal dari urutan asam amino IL-10 ditafsirkan menyamai kegiatan IL-10 dengan cara in vitro dan in vivo. Peptida IL-10 mencakup atas asam amino dengan 9 gabungan C-terminal IL-10 dikabarkan membatasi ekspresi HLA-DR dan produk sitokin berupa IL-8 dalam monosit manusia dan produksi TNF oleh sel T CD8+, memberi peningkatan produksi IL-1RA oleh monosit, menarik sel T CD8+ serta memberi peningkatan proliferasi sel mast pada tikus sebagai respons kepada IL-4 (Islam et al., 2021).

IL-10 dikode oleh gen IL-10 pada manusia dengan ukuran 4,7 kb letaknya di kromosom 1 yaitu 1q31-32 dan mencakup atas lima ekson dan empat intron. Aktivasi ekspresi gen IL-10 memproduksi mRNA berukuran ~2 kb (hIL-10) dan ~1,4 kb (mIL-10). Interleukin-10 diekspresi oleh beragam sel, umumnya sebagai reaksi kepada aktivasi dorongan yang diaturkan oleh cara berlainan pada jenis sel yang berbeda semacam sel T dan monosit atau makrofag (Rahmayani et al., 2019).

Beberapa faktor transkripsi seperti *transducers and activators of transcription* (STAT) dan *nuclear factor  $\kappa$ -B* (NF- $\kappa$ B) ialah faktor krusial pada pengaturan IL- 10. Beragam faktor ini diekspresikan baik dalam jenis

sel imun efektor maupun bukan sel imun dan mempunyai pengaruh pada regulasi faktor inflamasi (Kodrati et al., 2021).

### 2.1.3 Jalur Sinyal Produksi IL-10

Aktivasi patogen kepada sel dendrit dan makrofag mencakup pengenalan *pathogen-derived products* oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) yang mengungkapkan ekspresi sitokin beserta faktor lainnya (Saraiva et al., 2020). Baik makrofag maupun sel dendrit bisa mengekspresi IL-10 dengan cara *in vitro* sesudah aktivasi PRRs yang khusus. Sudah dikenali bahwasanya agonis *toll-like receptor-2* (TLR-2) dengan cara khusus berfungsi untuk merangsang ekspresi IL-10 oleh sel pengajuan antigen (Indrawati et al., 2020). Aktivasi makrofag lewat TLRs membagikan akibat kepada produksi kandungan IL-10 yang tinggi, sedangkan sel dendrit mieloid cuma menciptakan kandungan IL-10 berjumlah intermediet dan sel dendrit plasmatisoid (pDCs) tidak menciptakan kadar IL-10 yang dideteksi. Untuk tambahannya, IL-10 pun bisa distimulus dengan rangsangan yang bebas TLR misalnya *C-type lectins DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN; juga disebut merupakan CLEC4M) dan *dectin1* (pun disebut merupakan CLEC7A) (Weston et al., 2021).

Sesudah ligasi TLR, kaskade pensinyalan selanjutnya yang diaktivasikan ialah dengan *Toll/IL-1 receptor* (TIR)-*domain* yang mempunyai kandungan molekul adaptor misalnya *myeloid differentiation primary- response protein 88* (MYD88) serta TIR-*domain* mengandung

molekul adaptor pencetus IFN- $\beta$  (TRIF; pun disebut merupakan TICAM1). Perihal ini mengakibatkan produksi IL-10 serta sitokin proinflamasi. Pensinyalan TLR dengan MYD88 mengakibatkan aktivasi *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) serta *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) (Saraiva et al., 2020).

#### 2.1.4 Jalur Sinyal dan Mekanisme Kerja IL-10

Jalur persinyalan IL-10 yang sudah dicirikan secara baik ialah sistem jalur JAK/STAT yang mana pensinyalan ini bisa membawakan kepada dinamika besar untuk ekspresi profil gen imunomodulator dengan efek inhibisi mediator proinflamasi, menurunnya presentasi antigen dan fagositosis dan kenaikan fungsi inhibisi, toleransi serta *scavenger* dalam berjumlah besar terutama monosit maupun makrofag yang merupakan sasaran utamanya IL-10 (Saraiva et al., 2020).

Interaksi diantara IL-10/IL-10R berkaitan terhadap keluarga Jak1 dan Tyk2 berkaitan terhadap IL-10R1 dan IL-10R2. Interleukin-10 menstimulus fosforilasi tyrosin serta aktivasi faktor transkripsi laten STAT3, STAT1 serta dalam sel bukan makrofag dengan STAT5. Makrofag bagi tikus dengan Jak1<sup>-/-</sup> tidak merespons kepada IL-10, perihal berikut memberi indikasi bahwasanya Jak1 berperan wajib untuk mensinyalkan IL-10 (Wang et al., 2018).

Studi yang tersedia menandakan yakni inhibisi IL-10 kepada transkripsi gen yang diinduksikan IFN bagi monosit manusia berkaitan terhadap inhibisi IL-10 kepada aktivasi serta fosforilasi tyrosin STAT1

yang diinduksikan IFN (Wang et al., 2018). Inhibisi ini mengurangi konsentrasi IFN yang lebih besar daripada IL-10, perihal ini menandakan terdapat kompetisi ataupun interaksi diantara IL-10 dan IFN yang terinduksikan dengan mekanisme intraseluler (Amend et al., 2021).

Konsisten dengan kemampuannya dalam menghambat aktivasi makrofag dan produksi monokin, IL-10 juga menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B sebagai respon terhadap stimulus *in vitro*. Inhibisi aktivasi NF- $\kappa$ B pada sel T CD3+ juga dilaporkan meskipun terjadi secara tidak langsung melalui sel presentasi antigen (Islam et al., 2021). Berdasarkan data *in vitro* yang berkorelasi dengan observasi *in vivo* dari studi sebelumnya mengungkapkan bahwa inhibisi IL-10 terhadap aktivasi NF- $\kappa$ B sedikitnya melalui 2 jalur yang berbeda yaitu melalui inhibisi aktivasi I $\kappa$ B kinase dan melalui inhibisi aktivitas NF- $\kappa$ B yang terikat DNA. Juga telah dilaporkan bahwa IL-10 mengaktivasi AP-1 dan NF- $\kappa$ B pada sel T CD8+ (Saraiva et al., 2020). Penemuan ini berbanding terbalik dengan efek IL-10 terhadap makrofag dan sel T CD4+ dimana IL-10 memiliki kemampuan aktivitas untuk merangsang diferensiasi dan aktivitas sitotoksik pada sel T CD8+ dan sel NK, hal ini memperlihatkan perbedaan signifikan dari respon sel CD4+ dan CD8+ terhadap IL-10 (Amend et al., 2021).

## 2.2 Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*

### 2.2.1 Pengertian

*Mesenchymal Stem Cells (MSCs)* adalah sel punca dewasa dengan kemampuan dalam memperbarui diri dan berdiferensiasi dengan cakupan

dipersebaran jaringan yang luas. *MSCs* memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jaringan turunan mesodermal dan non-mesodermal. Peran *MSCs* di endogen adalah pemeliharaan dari sel induk, dan oleh sebab itu itu *MSCs* berperan dalam homeostasis organ, penyembuhan luka, dan successful aging. Berdasarkan perspektif terapeutik, *MSCs* dapat dijanjikan sebagai agen untuk regenerasi jaringan (Williams & Hare, 2011).

*MSCs* merupakan sel yang berkapasitas untuk berdiferensiasikan jadi macam tipe sel tertentu. Terdapat dua karakter utama *MSCs*, yaitu pembaruan diri (*self-renewal*) yang terus-menerus dan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel dewasa yang terspesialisasi. *Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)* sebagai sel punca non-hematopoietik multipoten yang berkemampuan dalam melakukan diferensiasi jadi garis keturunan mesodermal misalnya adiposit, osteosit, kondrosit, garis keturunan ektodermal (neurosit) dan endodermal (hepatosit) (Ullah et al., 2015). *MSCs* sendiri terdapat *MSCs* 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).

Sekretom *MSCs* memiliki berbagai faktor anti-inflamasi yang diproduksi dalam bentuk molekul. Molekul yang terdeteksi dalam sekretom *MSCs*, yaitu IL-10, IL-6, IL-8, VEGF (Ferreira et al., 2018). Komposisi sekretom *MSCs* telah dipelajari untuk menentukan molekul mana yang penting dan bertanggung jawab atas potensi terapeutik dari *MSC*, dengan



tujuan akhir untuk menggantikan terapi berbasis sel (*MSC*) menjadi terapi tanpa sel agar mencapai efek yang diinginkan.

Hipoksia adalah kondisi ketika sel maupun jaringan tubuh mengalami kekurangan oksigen. Hipoksia bisa terjadi karena keadaan fisiologis seperti ketika sedang olahraga dan patologis yang dikarenakan oleh inflamasi (Ferdian et al., 2020). Hipoksia dideskripsikan sebagai keadaan rendah oksigen sehingga memaksa sel dan jaringan agar dapat beradaptasi (Hawkins et al., 2013).

Kondisi hipoksia terhadap *MSCs* menunjukkan beberapa respon biologis terhadap penipisan oksigen. Hipoksia secara nyata sangat mempengaruhi sifat utama *MSCs* termasuk viabilitas sel, kapasitas proliferasi, diferensiasi, pola migrasi dan metabolisme (Ejtehadifar et al., 2015). *MSCs* dengan prekondisi hipoksia dapat meningkatkan pergerakan (*homing*) / motilitas *MSCs* melalui reseptor *factor-1* turunan stromal / jalur transduksi CXCR4, serta melalui adhesi focal kinase dan mekanisme pensinyalan saluran kalium Kv2.1. (Moreira et al., 2017).

### **2.2.2 Sumber**

Pada awalnya sumber *MSCs* dianggap hanya dari beberapa jaringan seperti darah, epitel usus, tulang, kulit. Namun sekarang dapat ditemukan di jaringan tubuh manapun seperti pulpa gigi, cairan ketuban, tali plasenta. Saat ini, sumber utama *MSCs* adalah sumsum tulang dan jaringan adiposa (Monti et al., 2012).

Sumber layak umum dari *MSCs* ada beberapa, yaitu sumsum tulang manusia, darah tepi pada pulpa gigi, jaringan lemak atau adiposa, tali pusat, plasenta manusia (Wharton's jelly) (Fesseha, 2021).

## **2.3 Diabetes Mellitus Tipe-1**

### **2.3.1 Pengertian**

Diabetes Mellitus tipe 1 (DMT1) merupakan penyakit dimana kadar gula darah atau glukosa melewati batas normal akibat dari tubuh yang tidak menghasilkan cukup insulin. Hal ini mengakibatkan, pasien DM tipe 1 membutuhkan insulin tambahan dari eksternal. Tingkat glukosa darah dipengaruhi oleh hormon insulin yang diproduksi pankreas. Saat makanan memasuki tubuh, akan dicerna serta memasuki aliran darah, insulin akan memindahkan gula (glukosa) dari darah ke sel agar dilakukan perubahan jadi energi (DiMeglio et al., 2018). Sebelumnya DM tipe 1 disebut merupakan insulin dependent diabetes (IDDM), ataupun diabetes anak-anak, ditandai dengan menghilangnya sel- $\beta$  penghasil insulin pada pulau langerhans maka ditemukan defisiensi insulin dalam tubuh. Diabetes tipe 1 dapat menyerang anak-anak dan juga manusia dewasa (Marzel, 2020). Hingga sekarang, DM tipe 1 belum dapat dilakukan pencegahan. Diet serta berolahraga tidak dapat memberi penyembuhan atau pencegahan diabetes tipe 1. Kebanyakan orang dengan DM tipe 1 sehat dan memiliki berat badan yang sesuai ketika penyakit ini dimulai. Di samping itu, bagi pasien diabetes tipe ini sensitivitas dan respons tubuh kepada insulin umumnya normal, khususnya saat awal-awal (Chehelcheraghi et al., 2019). Manifestasi klinis

yang terdapat pada pasien DM tipe 1 adalah poliuria (sering buang air kencing) dan polydipsia (sering haus) karena osmolalitas serum yang tinggi akibat hiperglikemia. Penderita DM tipe 1 juga akan mengalami anoreksia dan polifagia (lapar berlebihan) yang terjadi akibat glukosuria yang menyebabkan keseimbangan kalori negatif. Penderita DM tipe 1 akan merasa cepat lelah dan lemas akibat penurunan penggunaan glukosa oleh sel. Kulit penderita DM tipe 1 akan tampak kering, rusak atau luka yang lambat sembuh dan terasa gatal pada kulit. Sakit kepala, kantuk, dan disfungsi dikarenakan oleh glukosa intraseluler yang rendah, kram otot, lekas marah, serta ketidakstabilan emosional karena ketidakseimbangan elektrolit (Marzel, 2020).

### **2.3.2 Patofisiologi**

DM tipe 1 ialah penyakit autoimun yang diasosiasikan dengan penghancuran selektif terhadap sel- $\beta$  penghasil insulin pada pankreas. Timbulnya penyakit klinis ini sebagai tahapan akhir dari penghancuran sel- $\beta$  yang memberi pengarahan kepada DM tipe 1 (Clark et al., 2017). Major histocompatibility complex (MHC), juga dikenal sebagai antigen leukosit manusia (HLA) memiliki peran dalam hal ini. Gen HLA sangat penting dalam mengatur respon imun, karena mereka mengkodekan protein permukaan sel yang terlibat presentasi antigen dan toleransi diri (*self tolerance*). Apabila terdapat variasi secara genetik dalam urutan asam amino dari protein ini dapat mengubah repertoar peptida yang disajikan dan mengakibatkan hilangnya toleransi diri (*self tolerance*). Hilangnya toleransi

diri akan mengakibatkan dari penghancuran organ yang dituju (Zaccardi et al., 2016).

Penghancuran sel  $\beta$  pankreas pada DM tipe 1 terjadi melalui apoptosis, yang merupakan mekanisme kematian sel terprogram yang mencakup sistem kaskade. Respon kaspase ini terjadi karena produksi banyak sitokin proinflamasi, yaitu IL1, TNF $\alpha$  dan INF yang diproduksi oleh sel T autophagic di sel pulau pankreas (Paschou et al., 2018).

#### **2.4 Hubungan Sekretom *Mesenchymal Stem Cells* terhadap Kadar IL-10**

Tindakan imunomodulator dari *MSCs*, dan khususnya kemampuannya untuk mengurangi aktivasi sistem kekebalan, dapat menghentikan produksi antibodi sendiri terhadap sel  $\beta$  pankreas, sehingga menghalangi degenerasinya. Perlakuan pengondisian hipoksia *MSCs* dapat meningkatkan konsentrasi dari produksi IL-10 yang berperan dalam meningkatkan viabilitas sel (Saraiva et al., 2020). Sharma et al., (2021) mengungkapkan bahwasanya *MSCs* bersifat antiinflamasi dan keterampilan agar meregulasikan sel imun dengan hambatan kepada aktivasi dari makrofag serta limfosit T, maupun menginduksikan diferensiasi limfosit menuju arah subset limfosit Treg, dan juga makrofag ke subset makrofag M2 yang sifatnya antiinflamasi.

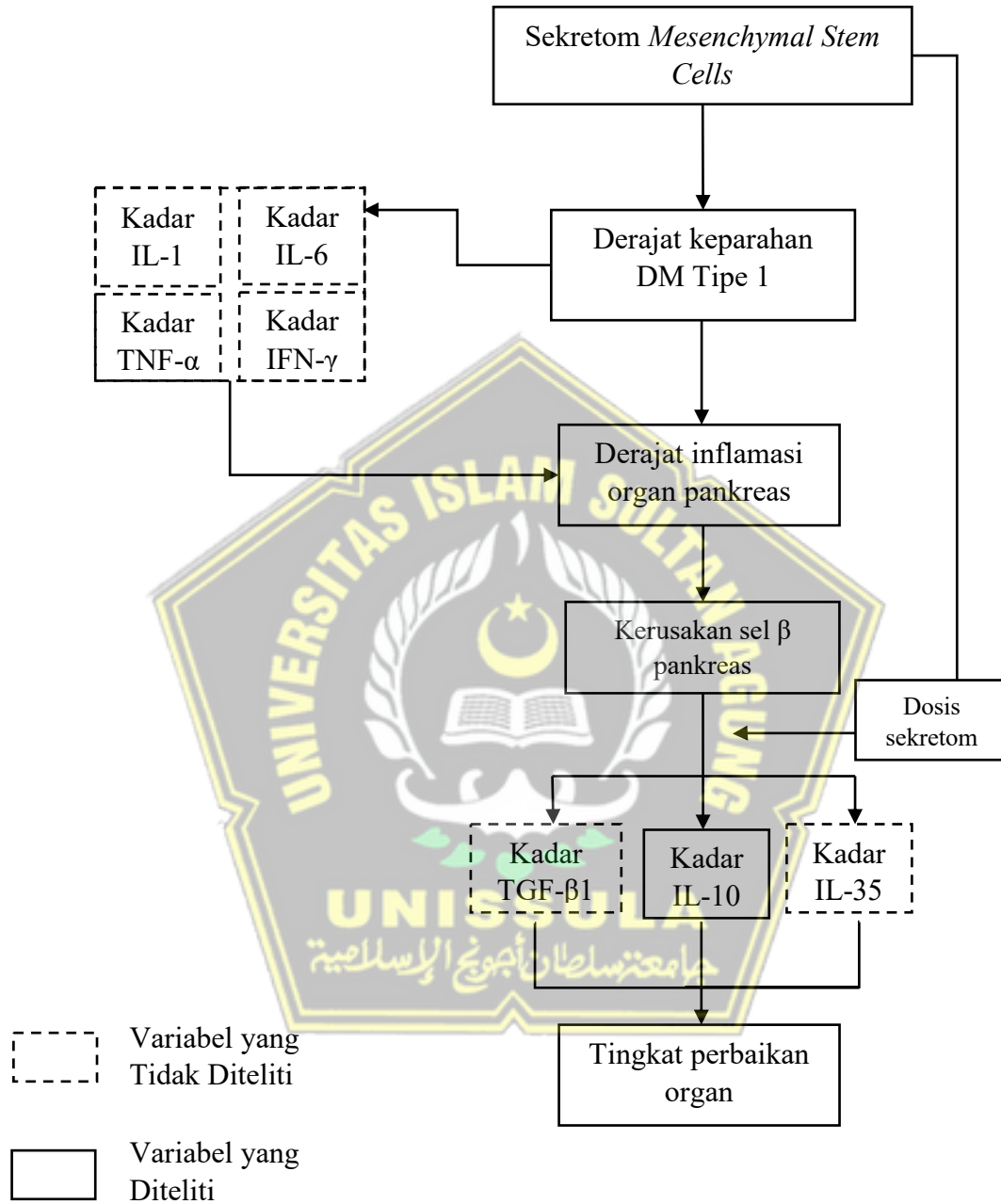
Peranan *MSCs* sebagai imunomodulator yang bisa meregulasikan sistem imun guna mencegah sitokin dan memesatkan koreksi jaringan yang hadapi kehancuran. Perihal ini diakibatkan sekretom dari *MSCs* sendiri

yang memiliki bermacam bagian imunomodulator dan antiinflamasi lewat metode parakrin. (Qi et al., 2019).

Pada pathogenesis DM tipe 1, terjadi *over-expression* dari sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  yang berperan dalam kerusakan sel islet pancreas (Bazzaz, J.T., et al., 2014.). Sitokin-sitokin tersebut merupakan penyebab dari stress pada sel  $\beta$  sehingga terjadi proses destruksi sel  $\beta$  pada hewan pengerat dan manusia pada model eksperimental pada DM Tipe 1 (Vincenz et al., 2011). Sekretom MSCs memiliki pola ekspresi yang merubah sitokin dari proinflamasi (seperti TNF- $\alpha$ ) menjadi antiinflamasi pada sel T yang berasal dari tikus diabetes yang diberikan MSCs. (Chehelcheraghi et al., 2019).

Di samping itu, MSCs bisa memberi hambatan pengeluaran sitokin proinflamasi misalnya IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, maka risiko adanya badai sitokin dapat berkurang. Di saat bersamaan, MSCs pun bisa mensekresikan TGF- $\beta$ 1, IL-35, IL-10, VEGF agar menurunkan kerusakan organ, dan juga melakukan perbaikan jaringan yang mengalami kerusakan serta memberi hambatan adanya fibrosis (Matthay et al., 2013).

## 2.5 Kerangka Teori



Gambar 2. 1 Kerangka Teori



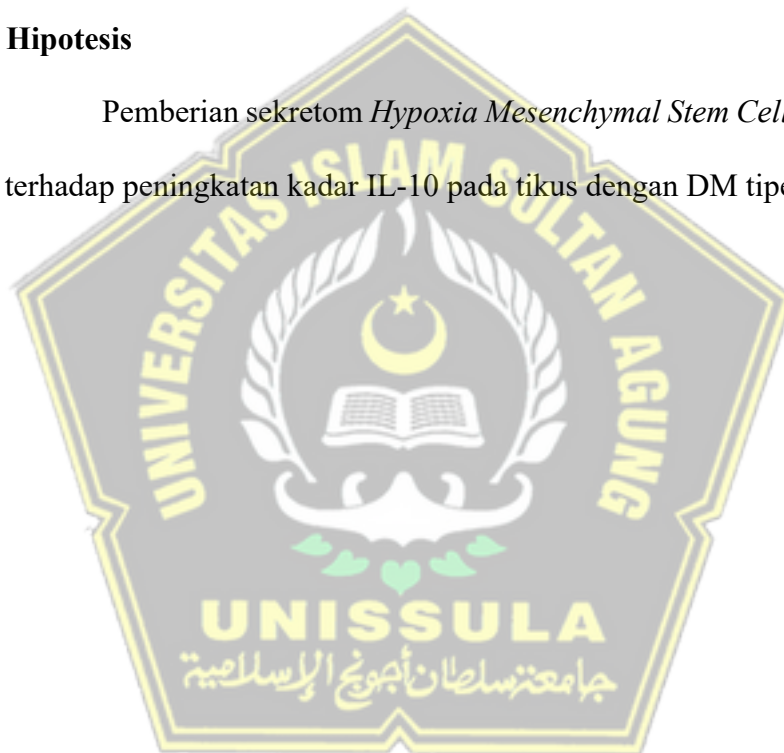
## 2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. 2 Kerangka Konsep

## 2.7 Hipotesis

Pemberian sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* berpengaruh terhadap peningkatan kadar IL-10 pada tikus dengan DM tipe 1.



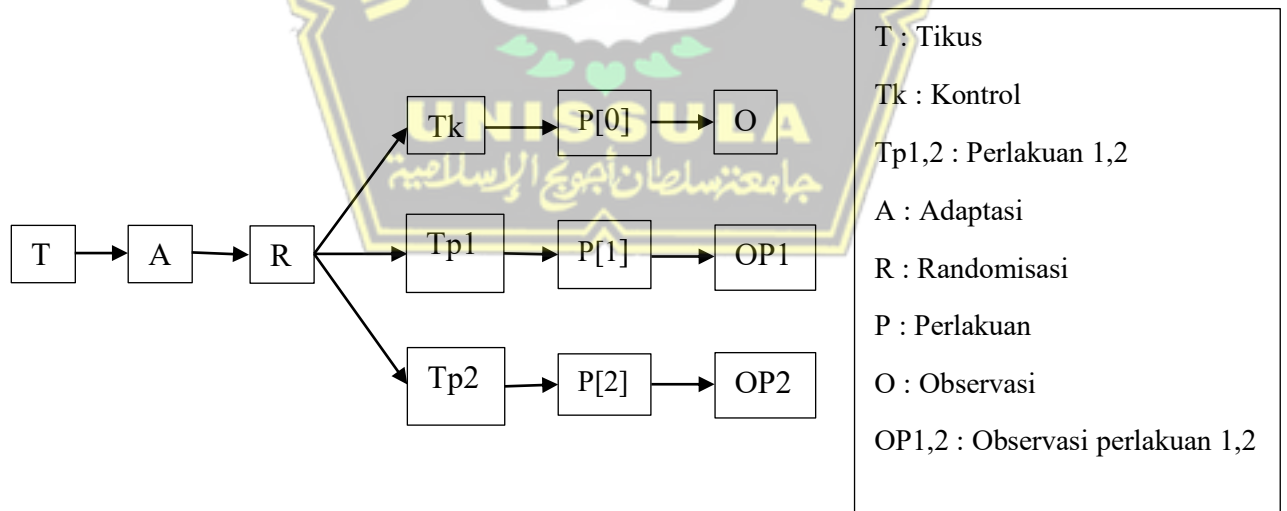
## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Riset ini sebagai riset eksperimental dengan model perancangan “*Post Test Only Control Group Design*” dengan memakai tikus sebagai hewan coba. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik in vivo dan in vitro dengan desain post test menggunakan kelompok kontrol (gambar 3.1). Rancangan ini digunakan karena pada penelitian ini menilai pengaruh dari sekretom dalam kelompok penelitian melalui cara membandingkan antara kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol.

Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian post-test only group



## 3.2 Variabel dan Definisi Operasional

### 3.2.1 Variabel

#### 3.2.1.1 Variabel bebas

Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dosis 0,5 dan 1 cc

#### 3.2.1.2 Variabel tergantung

Kadar IL-10

### 3.2.2 Definisi Operasional

#### 3.2.2.1 Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells*

Sekretom *Hypoxia MSCs* adalah sekret yang diambil dari medium *Mesenchymal Stem Cells* yang diinkubasi dalam keadaan O<sub>2</sub> 5% selama 24 jam, kemudian sekret diekstrak dengan cara sentrifugasi dan diambil supernatannya, dengan jumlah masing-masing dosis 0,5 cc dan 1 cc.

Skala data: rasio

#### 3.2.2.2 Kadar IL-10

Kadar IL-10 adalah kadar sitokin antiinflamasi yang diperoleh dari darah tikus galur wistar melalui vena mata lalu diukur menggunakan metode ELISA dalam satuan pg/ml.

Skala data: rasio

### **3.3 Populasi dan Sampel**

#### **3.3.1 Populasi**

##### **3.3.1.1 Populasi Target**

Populasi yang diambil pada penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar.

##### **3.3.1.2 Populasi Terjangkau**

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berusia 10 minggu dengan bobot badan rerata 280 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang dan timbul terjadai DMT1 setelah paparan STZ dosis 4mg/minggu dan dikonfirmasi terjadi peningkatan kadar gula darah  $> 200$  mg/dL pada hari ke-7 setelah induksi.

#### **3.3.2 Sampel**

Populasi target yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

##### **3.3.2.1 Kriteria Inklusi :**

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

##### **3.3.2.2 Kriteria Eksklusi :**

Tikus yang sakit selama penelitian

### **3.3.2.3 Kriteria Drop Out :**

Tikus yang mati selama penelitian

### **3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *Random sampling* yaitu teknik pengambilan sampel dimana semua individu dalam populasi baik secara sendiri-sendiri atau bersama-sama memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai anggota sampel.

### **3.3.4 Besar Sampel**

Penentuan besar sampel dihitung dengan menggunakan kriteria World Health Organization (WHO) untuk penelitian sehingga setiap kelompok terdapat sebanyak 5 ekor sampel dan terbagi menjadi tiga kelompok sampel.

## **3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian**

### **3.4.1 Instrumen**

Sarung tangan steril, *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 IL-10 Elisa Kit*, *37°C incubator*, *Tabung microcentrifuge 1,5 ml*, *Jarum suntik 3-ml*, *Jarum suntik 23-G*, *Kandang tikus*.

### 3.4.2 Bahan

*Mesenchymal Stem Cells*, Serum tikus putih galur wistar, NaCl 0.5%, FBS, Medium dMEM, Alkohol 70%, Fungizon 0.5%, Streptomisin-penicilin 1% (penstrep), PBS, *Deionized* atau *distilled water*, Tikus jantan Wistar: ~250 hingga 300 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 Cara Penelitian

### 3.5.1 Teknik Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

#### Tikus

Seluruh proses dilaksanakan 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, dilaksanakan perendaman dengan 1 cc medium. Inkubasi dilaksanakan pada suhu 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 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. Dilaksanakan kembali inkubasi ulang pada suhu 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 5%.



Selama tiga hari sekali, medium pada flask dibuang, lalu diganti sejumlah medium yang dibuang. Prosedur yang sama, terus dilakukna hingga mencapai stem cells konfluens 80%.

### **3.5.2 Tahap Persiapan Passage**

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

### **3.5.3 Proses Passage Sel**

Memasukkan medium komplit dengan ukuran 1 cc medium komplit/1.500.000sel ke dalam tube sesuai jumlah hitungan sel sebelumnya. 1 cc sel dan medium dimasukan dalam *flask* T25. Kemudian dikultur dengan kondisi 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 5% selama 1 hari. Mambahkan medium komplit ke dalam flask sebanyak 9 cc. Inkubasi dilaksanakan dengan kondisi 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 5% selama tiga hari. Seluruh

medium dibuang untuk kemudian dimasukkan medium komplet baru sebanyak jumlah medium yang dibuang, setelah itu diinkubasi kembali dengan kondisi yang sama. Proses serupa diulang selama tiga hari sekali hingga sel konfluen 80% dalam *flask*. Setiap 80% sel konfluen, dipindah ke *flask* yang baru dan dihitung tiap fase perpindahan sebagai *passage* I, II, dan seterusnya. Proses kultur dilaksanakan hingga *passage* ke IV-VI

#### **3.5.4 Proses Validasi Sel**

Melaksanakan 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. Melaksanakan tes kemampuan deferensiasi stem cells menjadi kondrosit, adiposit, dan osteosit dengan menggunakan medium spesifik tertentu secara *in vitro*.

#### **3.5.5 Proses Pemanenan Sel**

Pemanenan sel dilaksanakan pada *passage* ke-IV. 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. 2 cc tripsin sintetik (triple) ditambahkan dan diamkan selama 5 menit, kemudian dilaksanakan teknik tapping pada *flask* untuk melepaskan sel yang menempel di dasar *flask*. 4 cc medium inhibitor tripsin sintetik ditambahkan. Seluruh sel dan medium pada *flask* dipindah ke dalam *tube* 15 cc, lalu dilaksanakan sentrifugasi selama 10 menit dengan perputaran 1900 rpm. *Supernatant* dibuang kemudian ditambahkan 2 cc

PBS, dilanjutkan dengan proses resuspensi, dan sentrifugasi selama 8 menit dengan perputaran 1900 rpm. *Supernatant* dibuang kemudian ditambahkan 1 cc medium komplit pada pellet yang tersisa di dasar tabung. Hitung sel kembali dilaksanakan.

### 3.5.6 Proses Penghitungan Sel

10 $\mu$ l sel dimasukkan ke dalam cryotube. Ditambahkan 90 $\mu$ l triptofan blue ke dalam cryotube. 10 $\mu$ l dari campuran dari cryotube dipipet ke bilik hitung yang ditutup deck glass. Pengamatan dilaksanakan menggunakan inverted microscope, dan dihitung pada 4 bilik hitung. Perhitungan menggunakan rumus perhitungan jumlah sel:

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

### 3.5.7 Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom

Chamber disiapkan di awal prosedur. MSC yang sudah ada dalam well dimasukkan ke dalam chamber. *Oxygen meter* disiapkan dalam chamber. Chamber ditutup dan dipastikan rapat. CO<sub>2</sub> dialirkan ke dalam chamber melalui selang. *Oxygen meter* diamatai hingga oksigen dalam chamber mencapai kadar O<sub>2</sub> 5%. Selama 24 jam dilaksanakan inkubasi. *Oxygen meter* chamber secara berkala diawasi untuk memastikan kadar oksigen tetap dalam kadar 5%. Pengambilan sekretom dilaksanakan menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) sehingga mendapatkan *secretome MSC* dengan ukuran 10-50kDa.

### 3.5.8 Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1

Sekitar 5 hari sebelum percobaan dimulai, kandang dua sampai lima tikus jantan pada suhu  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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. 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). Pada hari ke-6, semua tikus dipuasakan selama 6 sampai 8 jam sebelum perlakuan STZ. Minum diberikan seperti biasa. 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. 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.

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) dimasukkan secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol. Tikus dikembalikan ke kandangnya. Makanan diberikan seperti biasa dan air minum biasa. 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 >200 mg/dl dan/atau secara statistik lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kontrol).

Biasanya penentuan kadar glukosa darah cukup untuk mendiagnosis diabetes, sehingga tidak perlu dilaksanakan 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 diabetes berat dengan tingkat glukosa darah biasanya >250 sampai 600 mg/dl. Jika >60% tikus yang diinjeksi STZ namun masih tidak menunjukkan hiperglikemia ringan, diperiksa kembali apakah ada masalah dalam percobaan. Jika suatu zat uji atau senyawa sedang dinilai kemampuannya untuk mengoreksi hiperglikemia, protokol diperpanjang lebih lama, tergantung pada kebutuhan eksperimental. Kelompok hewan dirawat seperti yang dijelaskan pada langkah 3 sampai 9 untuk membentuk status diabetes dan kemudian hewan diobati dengan terapi restoratif potensial. Kelompok yang menerima suntikan *vehicle* yang sesuai disertakan sebagai kontrol.

### 3.5.9 Perlakuan pada Hewan Coba

Perlakuan pada hewan uji coba terbagi menjadi tiga kelompok yaitu:

1. Kelompok kontrol : tikus model diabetes yang diinjeksi NaCl
2. Kelompok P1 : tikus model diabetes dengan injeksi sekretom *Hypoxia-MSCs* 0,5 cc
3. Kelompok P2 : tikus model diabetes dengan injeksi sekretom *Hypoxia-MSCs* 1 cc

### 3.5.10 Analisis Kadar IL-10 Menggunakan ELISA

Pengenceran sampel dan reagen harus tercampur dengan sempurna. Sebelum memasukkan 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 dilaksanakan adalah 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 memasukkan sumuran standar, sampel dan kontrol (*blank*).

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. Memasukkan Sampel: memasukan 100µl sampel yang diencerkan dengan benar ke dalam sumuran sampel uji. Inkubasi: menutup *plate* dengan penutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Mencuci: Melepas penutup dan membuang isi *plate*,

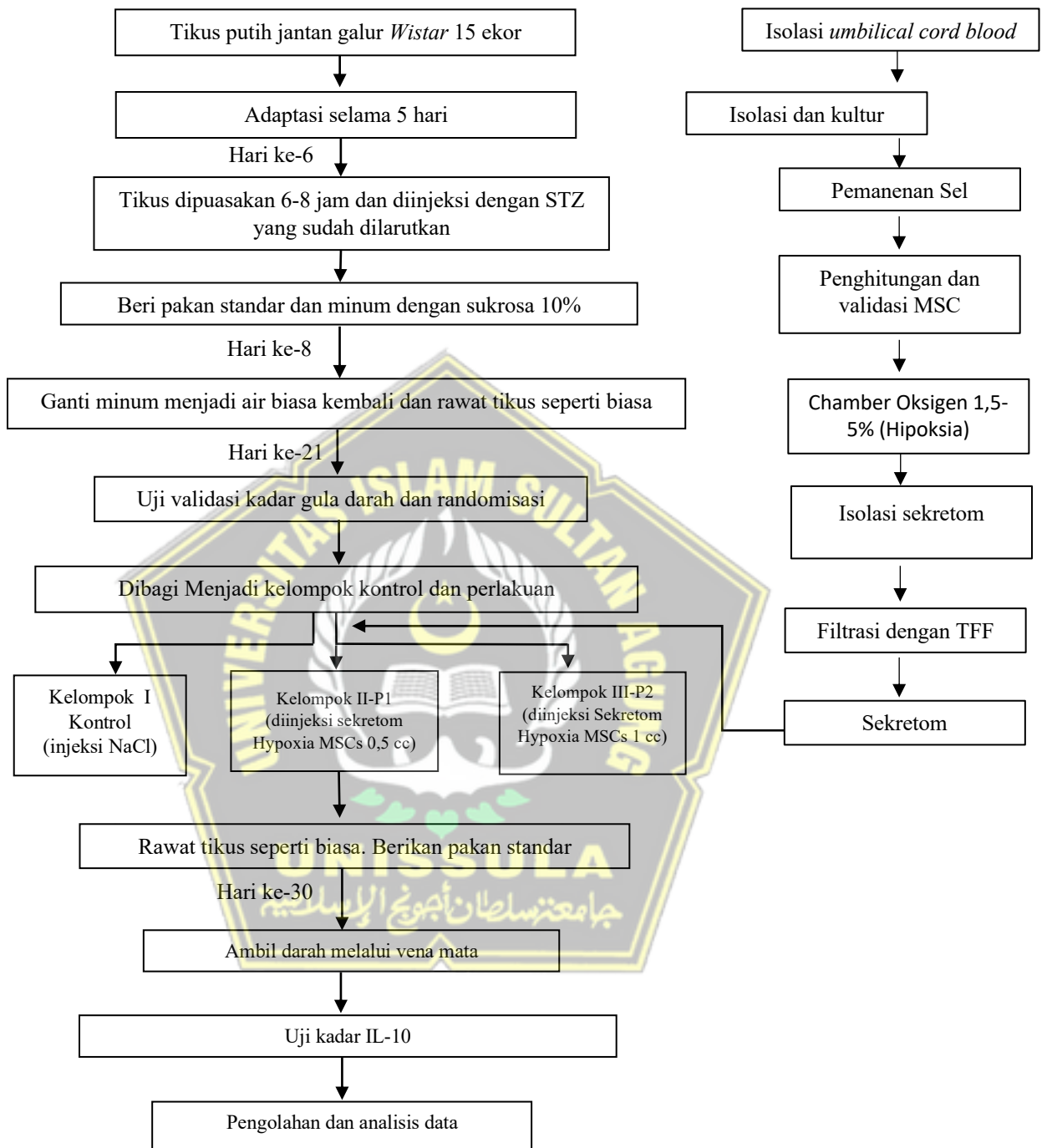


kemudian *plate* dicuci 2 kali dengan *Wash Buffer*. Sumuran tidak boleh dibiarkan mengering sepenuhnya. Antibodi berlabel biotin: Memasukkan larutan antibodi berlabel biotin 100µl ke dalam sumuran di atas (standar, sampel uji, dan sumur kosong).

Memasukkan larutan di bagian bawah setiap sumuran tanpa menyentuh dinding samping, menutup *plate* dan menginkubasi pada suhu 37 ° C selama 60 menit. Mencuci: melepas penutup, dan *plate* dicuci 3 kali dengan *Wash Buffer*, dan *Wash Buffer* dibiarkan tetap berada di dalam sumuran selama 1-2 menit. *HRP-Streptavidin Conjugate (SABC)*: Memasukkan 100µl larutan SABC ke dalam setiap sumur, *plate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Mencuci: Melepas penutup dan dilaksanakan pencucian 5 kali dengan *Wash Buffer*, kemudian *Wash Buffer* dibiarkan tetap di dalam sumuran selama 1-2 menit.

Substrat TMB: Memasukkan 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). Penghentian: Memasukkan 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 memasukkan *Stop Solution*.

### 3.6 Alur Penelitian



Gambar 3. 2 Alur Penelitian

### 3.7 Tempat dan Waktu

#### 3.7.1 Tempat

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

#### 3.7.2 Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus-September 2022.

### 3.8 Analisis Hasil

Data yang dihasilkan dari penelitian dilakukan uji deskriptif mengukur mean, median, dan modus. Kemudian dilakukan uji distribusi dan homogenitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Leuvene Statistic*. Data yang didapat terdistribusi normal, namun tidak homogen. Oleh karena itu, dilanjutkan dengan pengujian non parametrik berupa uji *Kruskal-Wallis* karena tidak memenuhi syarat uji parametrik. Pengujian *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai  $p < 0,05$  yang berarti terdapat perbedaan signifikan antar kelompok sampel. Setelah itu, uji *post hoc Mann-Whitney U* untuk melihat perbedaan spesifik rerata pada masing-masing kelompok

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah untuk diujikannya pengaruh pemberian terapi sekretom *Hypoxia MSCs* terhadap kadar IL-10 pada DM Tipe 1. Percobaan dilakukan pada tikus putih galur Wistar dengan berat badan rerata 280 gram. Berdasarkan jumlah kelompok perlakuan, maka sampel yang digunakan adalah sebanyak 15 ekor tikus putih jantan galur Wistar dengan jumlah 5 ekor per kelompok sampel. Sekretom *Hypoxia MSCs* diambil dari medium *Mesenchymal Stem Cells* yang diinkubasi dalam keadaan O<sub>2</sub> 5% selama 24 jam, dengan cara sentrifugasi dan diambil supernatannya dilakukan ekstraksi sekret. Jumlah dari masing-masing dosis adalah 0,5 cc dan 1 cc. Pengelompokan sampel adalah kelompok Kontrol (tikus model diabetes tanpa perlakuan yang diinjeksi NaCl), kelompok perlakuan 1 (P1/ tikus model diabetes dengan injeksi sekretom *Hypoxia MSCs* 0,5 cc) dan perlakuan 2 (P2/ tikus model diabetes dengan injeksi sekretom *Hypoxia MSCs* 1 cc).

Pembuatan tikus model DM tipe 1 dengan diinjeksi streptozotocin secara intraperitoneal pada 65 mg / kg untuk kelompok perlakuan selama 21 hari dan dilanjutkan perlakuan selama tiap awal minggu. Tikus 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). Pengambilan darah dilakukan pada hari ke

30 melalui vena mata pasca injeksi serta dilanjutkan dengan pengujian kadar IL-10.

#### 4.1.1 Analisis Deskriptif

##### 4.1.1.1 Konfirmasi Tikus Penelitian

Tabel 4. 1 Data Konfirmasi Tikus Penelitian

Paremeter	Hasil
Berat badan (gr)	276
Gula darah puasa (mg/dl)	338

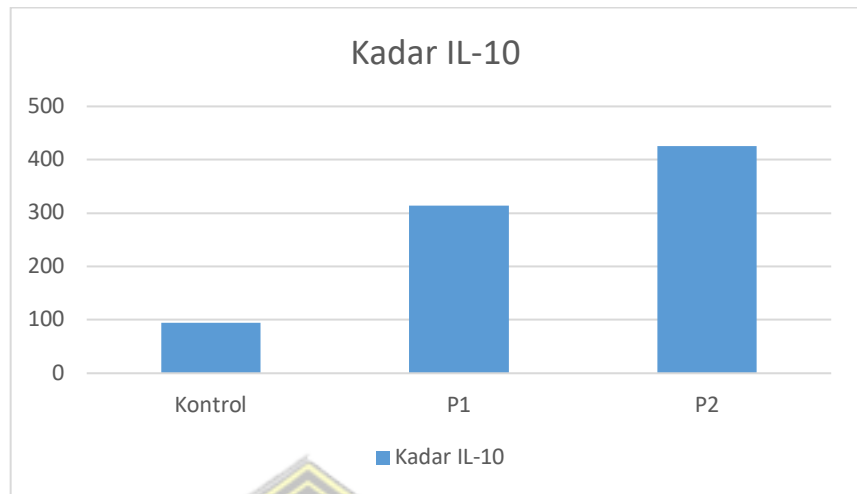
Pada tabel terlihat bahwa kadar gula darah puasa pada tikus penelitian memiliki nilai 338 mg/dl yang menandakan bahwa tikus penelitian terkonfirmasi diabetes melitus dikarenakan kadar gula darah puasa  $>200$  mg/dl (Kementerian Kesehatan RI., 2020)

##### 4.1.1.2 Deskriptif data

Dilakukan pengelolaan data rerata jumlah kadar IL-10 pada masing-masing kelompok didapat hasil seperti pada tabel dan grafik berikut:

Tabel 4. 2 Hasil Rerata Jumlah Kadar IL-10

	Rerata $\pm$ SD	Median
Kontrol	94,85 $\pm$ 18,56	95,42
P1	314,28 $\pm$ 79,14	344
P2	425,71 $\pm$ 64,16	452,57



Gambar 4. 1 Grafik Rerata Jumlah Kadar IL-10

Dari grafik diatas ditunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar IL-10 pada kelompok perlakuan P1 ( $314,28 \pm 79,14$ ) dan P2 ( $425,71 \pm 64,16$ ) dibandingkan kelompok kontrol ( $94,85 \pm 18,56$ ). Peningkatan paling banyak terdapat pada kelompok P2 ( $425,71 \pm 64,16$ ) dibanding kelompok lainnya.

#### 4.1.1.3 Distribusi data

Data jumlah kadar IL-10 yang didapatkan diuji normalitasnya dengan *Shapiro-Wilk*. Hasilnya dapat dilihat melalui tabel dibawah.

Tabel 4. 3 Hasil Uji Normalitas Jumlah Kadar IL-10

	Kelompok	Uji Normalitas
		Nilai <i>P</i>
Kadar IL-10	Kontrol	0,885*
	P1	0,432*
	P2	0,597*

Tabel diatas menunjukkan bahwa jumlah kadar IL-10 pada semua kelompok memiliki signifikasi nilai  $P > 0,05$ . Sehingga dapat



diambil pengertian bahwa data jumlah kadar IL-10 berdistribusi normal. Kemudian hasil uji homogenitas jumlah kadar IL-10 ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 4. 4 Hasil uji Homogenitas Jumlah Kadar IL-10

	Kelompok	Uji Homogenitas
		Nilai <i>P</i>
Kadar IL-10	Kontrol P1 P2	0,008

Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat bahwa data jumlah kadar IL-10 tidak mencapai homogenitas dikarenakan signifikansi nilai  $P < 0,05$ .

Dari analisis tersebut menunjukkan data jumlah kadar IL-10 tidak memenuhi syarat uji parametrik karena data berdistribusi normal, namun tidak homogen sehingga selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan uji non parametrik berupa *Kruskal-Wallis* untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan pada kelompok sampel.

#### 4.1.2 Analisis Bivariat

Data jumlah kadar IL-10 yang tidak homogen dilanjutkan menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasilnya ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 4. 5 Hasil Uji *Kruskal-Wallis* Data Jumlah Kadar IL-10

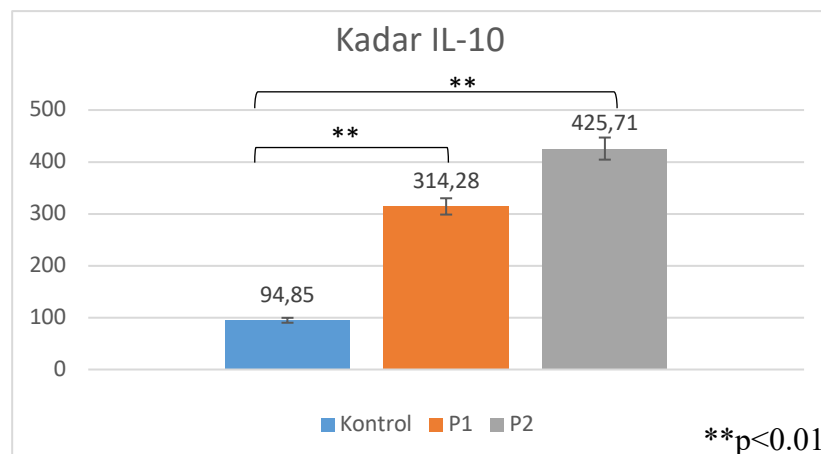
Kelompok	Uji <i>Kruskal-Wallis</i>	
	Nilai <i>P</i>	
Kontrol	0,004*	
P1		
P2		

Pengujian *Kruskal-Wallis* (0,004) menunjukkan nilai  $p < 0,05$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan dari kadar IL-10 antar kelompok sampel.

Hasil uji *Kruskal-Wallis* yang signifikan dapat dilanjutkan dengan uji post hoc berupa uji *Mann-Whitney U* yang dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4. 6 Hasil Uji *Mann-Whitney U* Data Jumlah Kadar IL-10

Kelompok	Kelompok pembandingan	Uji <i>Mann-Whitney U</i>
		Nilai <i>P</i>
Kelompok kontrol	Kelompok perlakuan 1	0.008*
	Kelompok perlakuan 2	0.008*
Kelompok perlakuan 1	Kelompok kontrol	0.008*
	Kelompok perlakuan 2	0.095
Kelompok perlakuan 2	Kelompok kontrol	0.008*
	Kelompok perlakuan 1	0.095



Gambar 4. 2 Grafik Perbedaan Signifikan Kadar IL-10 Berdasarkan Uji Post Hoc Mann Whitney U 38

Berdasarkan hasil pengujian dengan uji Mann-Whitney U, didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok kontrol dengan kelompok P1 (0,008) maupun dengan kelompok P2 (0,008). Sedangkan antara kelompok P1 dengan kelompok P2 (0,095) tidak terdapat perbedaan signifikan ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2 Pembahasan

Terapi dengan pemberian sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* berdasarkan dari hasil penelitian terbukti dapat meningkatkan kadar IL-10 pada tikus jantan galur Wistar dengan kondisi DM Tipe 1. Hasil dari penelitian yang menandakan terdapat perbedaan signifikan diantara kelompok kontrol dan kelompok P1 serta P2. Pada kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2 dari hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan yang menunjukkan bahwa pemberian injeksi sekretom *MSCs hypoxia* secara intraperitoneal dosis 0,5 cc ataupun dosis 1 cc tidak memberikan perbedaan efek pada jumlah peningkatan kadar IL-10. Meskipun begitu, kadar IL-10 pada kelompok P1 dan P2 lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol. Hasil ini sesuai dengan teori yang menyatakan *Hypoxia MSCs* bisa meregulasikan sistem imun guna menghindari sitokin pro-inflamasi serta mempercepat dalam memperbaiki jaringan yang mengalami kerusakan melalui sekresi TGF- $\beta$ , IL-35, IL-10, *hepatocyte growth factor*, *keratinocyte growth factor*, VEGF. Perbaikan jaringan pankreas diinduksi oleh sitokin-sitokin yang terdapat pada sekretom *Hypoxia MSCs*. Melalui sitokin yang terdapat pada sekretom *Hypoxia*

*MSCs* dapat menyebabkan peningkatan populasi sel, pembentukan matriks ekstraseluler, pelepasan sitokin, dan induksi pembentukan pembuluh darah baru untuk perbaikan jaringan sel pankreas. Hal ini membantu merangsang regenerasi sehingga terjadi proliferasi sel dan mengurangi kerusakan organ, sekaligus memperbaiki jaringan yang rusak (Qi et al., 2019).

Pengecekan gula darah dilakukan 2 minggu pasca injeksi STZ. Hal tersebut dilakukan pada penelitian ini dikarenakan berkaitan dengan waktu terjadinya kerusakan organ. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, induksi STZ dengan dosis 35 mg/kgBB pada tikus model menunjukkan kondisi diabetes di hari ke-14 dan terlihat adanya kerusakan pankreas (Muninggar, 2017). Pengujian kadar IL-10 dilaksanakan 1 minggu pasca injeksi sekretom *Hypoxia-MSCs* berhubungan dengan proses regenerasi jaringan. Pada saat terjadi kerusakan jaringan, terdapat masa penyembuhan yang terdiri dari 3 fase. Fase pertama adalah fase inflamasi yang terjadi selama 1 minggu pasca luka. Fase proliferasi sel meliputi pembentukan vaskular baru, pembentukan fibroblas, dan re-epitelisasi, yang terjadi 2 minggu pasca luka. Fase maturasi jaringan terjadi mulai pada minggu ketiga pasca terjadinya luka (Primadina et al., 2019).

Diabetes Mellitus Tipe 1 (DMT1) sebagai penyakit yang timbul akibat proses kerusakan jaringan pankreas, khususnya pada sel beta, oleh sel imun tubuh. Menyebabkan terjadinya defisiensi insulin (Pulungan et al., 2019). Penelitian yang telah dilakukan Matthay et al. (2013) menyatakan *MSCs* dapat menghambat sekresi sitokin pro-inflamasi seperti IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6.

Salah satu sitokin yang terdapat pada sekretom *MSCs* adalah IL-10 yang memediasi efek immunosupresif atau dikenal dengan sitokin anti-inflamasi dikarenakan perannya dalam menekan proses peradangan jaringan akibat sel imun (Rahimi et al., 2021).

IL-10 yang dikandung sekretom dapat mencegah sitokin proinflamasi melalui penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B dan inhibisi terhadap aktivasi dan fosforilasi tyrosin STAT1 yang diinduksi IFN (Wang et al., 2018). IL-10 menginduksi fosforilasi tirosin JAK1 yang menuju ke fosforilasi tirosin dan aktivasi dari STAT3. Aktivasi dari STAT3 akan menginduksi ekspresi dari beberapa gen, salah satunya SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signalling 3*) yang mensupresi TLR-mediator inflamasi. Efek dari inhibisi ini akan menyebabkan penurunan produksi sitokin proinflamasi (Zhu et al., 2015). Bersamaan dengan penghambatan proses inflamasi maka akan memudahkan jaringan untuk melakukan regenerasi atau proliferasi sel yang dimediasi oleh faktor-faktor pertumbuhan, salah satunya TGF- $\beta$ , yang terdapat dalam kandungan sekretom *Hypoxia-MSCs*.

Pada kebanyakan sel, jalur persinyalan TGF- $\beta$  mengatur ekspresi gen yang aktivitasnya menentukan proliferasi sel dan proses perbaikan jaringan. Regulasi ekspresi gen adalah hal utama dari jalur persinyalan TGF- $\beta$ . Bermula dari pengikatan serin/threonin kinase kompleks ke reseptor kinase tipe I dan II. Selanjutnya, fosforilasi dari reseptor tipe II mengaktifkan Smad, suatu protein faktor transkripsi yang merupakan transduser sinyal utama untuk faktor TGF- $\beta$  superfamily. TGF- $\beta$  setelah itu berikatan bersama reseptor yang

memfosforilasi Smad 2, Smad 3, dan Smad 1 (Aisyah & Jatmiko, 2019). Ikatan kompleks ini akan memicu aktivitas dari TGF- $\beta$  untuk perbaikan jaringan dengan mensintesis dan sekresi protein matriks ekstraselular (Hermendy, 2017). Sifat sekretom yang immunomodulator dan regeneratif ini dapat mencegah inflamasi yang terjadi pada penderita DMT1 dan meningkatkan proses proliferasi maupun perbaikan jaringan pankreas yang telah rusak. Dengan perbaikan dari jaringan pankreas dapat memberikan peningkatan kemampuan sel  $\beta$  untuk mensekresi kembali insulin (Longhini et al., 2019).

Riset yang dilaksanakan oleh Rahimi et al. (2021) menyebutkan baru-baru ini telah dikonfirmasi bahwa *MSCs* sebagian besar memberikan efek terapi melalui faktor bioaktif parakrin terlarut berupa sekretom. *MSCs* yang diprakondisikan dengan hipoksia menghasilkan sekret yang mengandung beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan dalam jumlah banyak. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terapi dapat dilakukan dengan pemberian sekretom *Hypoxia MSCs* untuk mencegah inflamasi dan memperbaiki jaringan. Bersamaan dengan penghambatan proses inflamasi maka akan memudahkan jaringan untuk melakukan regenerasi atau proliferasi sel yang dimediasi oleh faktor-faktor pertumbuhan, salah satunya TGF- $\beta$ , yang terdapat dalam kandungan sekretom *Hypoxia-MSCs*. Dengan perbaikan dari jaringan pankreas dapat memberikan peningkatan kemampuan sel  $\beta$  untuk mensekresi kembali insulin (Longhini et al., 2019).

Namun masih ada sebagian keterbatasan pada riset yang sudah dilaksanakan. Riset ini belum meneliti pengaruh dari pemberian terapi sekretom



*Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* pada penanda inflamasi lain selain kadar IL-10 dari tikus model diabetes tipe 1. Selain itu juga penelitian ini belum melihat pengaruh dari perbaikan sel beta pankreas dengan injeksi sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* ini.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

- 5.1.1 Terdapat pengaruh dari sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells dosis 0,5 dan 1 cc terhadap kadar IL-10 pada tikus model diabetes tipe 1.
- 5.1.2 Terdapat peningkatan kadar IL-10 pada kelompok perlakuan yang mendapatkan sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells dosis 0,5 dan 1 cc dibanding kelompok kontrol.

#### 5.2 Saran

Terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini yang dapat menjadi saran dalam melakukan penelitian selanjutnya yaitu:

- 5.2.1 Perlunya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek dari pemberian sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dengan melihat penanda inflamasi ataupun antiinflamasi lain pada diabetes selain kadar IL-10.
- 5.2.2 Perlu adanya penelitian lebih lanjut dalam mengetahui efek terapi sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* terhadap perbaikan sel beta pankreas.

## DAFTAR PUSTAKA

- ADA. (2020). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*, 43(January), S14–S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>
- Adelita, Miranda, Arto, Sugih, K., Deliana, & Melda. (2020). Kontrol Metabolik pada Diabetes Melitus Tipe-1. *Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RS Pendidikan Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia*, 47(3), 227–232. <http://www.cdkjournal.com/index.php/CDK/article/viewFile/377/175>
- Adnyana, I. A. (2019). Interleukin-6 ( IL-6 ), Interleukin-8 ( IL-8 ), and Tumor Necrosis Factor- Alpha ( TNF- a ): Their Role in the Development and Metastasis of. *Sains Medika*, 10(2), 78–83.
- Amend, A., Wickli, N., Schäfer, A. L., Sprenger, D. T. L., Manz, R. A., Voll, R. E., & Chevalier, N. (2021). Dual role of interleukin-10 in murine nzb/w fl lupus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms22031347>
- 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>
- Chehelcheraghi, F., Chien, S., & Bayat, M. (2019). Mesenchymal stem cells improve survival in ischemic diabetic random skin flap via increased angiogenesis and VEGF expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 17491–17499. <https://doi.org/10.1002/jcb.29013>
- Clark, M., Kroger, C. J., & Tisch, R. M. (2017). Type 1 diabetes: A chronic anti-self-inflammatory response. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01898>
- Dang, L. T.-T., Phan, N. K., & Truong, K. D. (2017). Mesenchymal stem cells for diabetes mellitus treatment: new advances. *Biomedical Research and Therapy*, 4(1), 1062. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v4i1.144>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2019). Type 1 Diabetes. HHS Public Access. *Lancet (London, England)*, 176(3), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5).Type

- Ejtehadifar, M., Shamsasenjan, K., Movassaghpour, A., Akbarzadehlaleh, P., Dehdilani, N., Abbasi, P., Molaeipour, Z., & Saleh, M. (2015). The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2), 141–149. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.021>
- Ferdian, F., Limanan, D., Ferdinal, F., & Yulianti, E. (2020). Pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada darah dan paru tikus Sprague dawley setelah diberi daun ara. *Tarumanagara Medical Journal*, 3(1), 55–62. <https://journal.untar.ac.id/index.php/tmj/article/view/9726>
- 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>
- Fesseha, H. (2021). Stem cells: source and therapeutic application. *Journal of Life Science and Biomedicine*, 11(1), 01–12. <https://doi.org/10.51145/jlsb.2021.1>
- 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>
- Islam, H., Chamberlain, T. C., Mui, A. L., & Little, J. P. (2021). Elevated Interleukin-10 Levels in COVID-19: Potentiation of Pro-Inflammatory Responses or Impaired Anti-Inflammatory Action? *Frontiers in Immunology*, 12(June), 10–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.677008>
- Katuchova, J., Harvanova, D., Spakova, T., Kalanin, R., Farkas, D., Durny, P., Rosocha, J., Radonak, J., Petrovic, D., Siniscalco, D., Qi, M., Novak, M., & Kruzliak, P. (2015). Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrine Pathology*, 26(2), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s12022-015-9362-y>
- Kementerian Kesehatan RI. (2020). Infodatin tetap produktif, cegah, dan atasi Diabetes Melitus 2020. In *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI* (pp. 1–10). <https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/Infodatin-2020-Diabetes-Melitus.pdf>
- Kodrati, A., Salim, E. M., & Hafy, Z. (2021). Comparison of Serum Interleukin 10 Levels between Leprosy and Non-Leprosy Population. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 21(1), 39–44. <https://doi.org/10.18196/mmjkk.v21i1.6514>
- Longhini, A. L. F., Salazar, T. E., Vieira, C., Trinh, T., Duan, Y., Pay, L. M., Calzi, S. L., Losh, M., Johnston, N. A., Xie, H., Kim, M., Hunt, R. J., Yoder, M. C., Santoro, D., McCarrel, T. M., & Grant, M. B. (2019). Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells demonstrate immunomodulatory potential for therapeutic use in horses. *PLoS ONE*, 14(3), 1–15.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212642>

- Marzel, R. (2020). Terapi pada DM Tipe 1. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 3(1), 51–62. <https://doi.org/10.37287/jppp.v3i1.297>
- Matthay, M. A., Goolaerts, A., Howard, J. P., & Lee, J. W. (2013). Mesenchymal stem cells for acute lung injury: Preclinical evidence. *Critical Care Med*, 38(10), 1–9. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ff1d>. Mesenchymal
- Monti, M., Perotti, C., del Fante, C., Cervio, M., & Redi, C. A. (2012). Stem cells: Sources and therapies. *Biological Research*, 45(3), 207–214. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000300002>
- Muninggar, J. (2017). GULA DARAH PUASA DAN JUMLAH SEL BETA TIKUS DIABETES SETELAH PEMBERIAN TEMPE DAUN YAKON. *Jtphp*, 12(2), 59–63.
- Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine Connections*, 7(1). <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
- Primadina, N., Basori, A., & Perdanakusuma, D. S. (2019). Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekuler. *Qanun Medika - Medical Journal Faculty of Medicine Muhammadiyah Surabaya*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.30651/jqm.v3i1.2198>
- Pulungan, A. B., Annisa, D., & Imada, S. (2019). Diabetes Melitus Tipe-1 pada Anak: Situasi di Indonesia dan Tata Laksana. *Sari Pediatri*, 20(6), 392. <https://doi.org/10.14238/sp20.6.2019.392-400>
- Qi, Y., Ma, J., Li, S., & Liu, W. (2019). Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1362-2>
- 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>
- Rahmayani, T., Putra, I. B., & Jusuf, N. K. (2019). Association of serum interleukin-10 (IL-10) with the severity of acne vulgaris. *Bali Medical Journal*, 8(3), 753. <https://doi.org/10.15562/bmj.v8i3.1514>
- Salari, V., Mengoni, F., Gallo, F. Del, Bertini, G., & Fabene, P. F. (2020). The anti-inflammatory properties of mesenchymal stem cells in epilepsy: Possible treatments and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21249683>



- Saraiva, M., Saraiva, M., Vieira, P., Vieira, P., Vieira, P., O'Garra, A., & O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1), 1–19. [https://doi.org/10.1084/jem\\_20190418](https://doi.org/10.1084/jem_20190418)
- Setyawati, A. D., Ngo, T. hai L., Padila, & Andri, J. (2020). OBESITY AND HEREDITY FOR DIABETES MELLITUS AMONG ELDERLY. *SELL Journal*, 5(1), 55. <https://doi.org/10.21539>
- Sharma, A., Chakraborty, A., & Jaganathan, B. G. (2021). Review of the potential of mesenchymal stem cells for the treatment of infectious diseases. *World Journal of Stem Cells*, 13(6), 568–593. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.568>
- Tsalamandris, S., Antonopoulos, A. S., Oikonomou, E., Papamikroulis, G. A., Vogiatzi, G., Papaioannou, S., Deftereos, S., & Tousoulis, D. (2019). The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *European Cardiology Review*, 14(1), 50–59. <https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>
- 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>
- Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., O'Brien, T., & Samali, A. (2011). Cytokine-Induced  $\text{ER}^{\text{stress}}$ -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. In *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. InTech. <https://doi.org/10.5772/22765>
- Wang, J., Ren, H., Yuan, X., Ma, H., Shi, X., & Ding, Y. (2018). Interleukin-10 secreted by mesenchymal stem cells attenuates acute liver failure through inhibiting pyroptosis. *Hepatology Research*, 48(3), E194–E202. <https://doi.org/10.1111/HEPR.12969>
- Weston, L. L., Jiang, S., Chisholm, D., Jantzie, L. L., & Bhaskar, K. (2021). Interleukin-10 deficiency exacerbates inflammation-induced tau pathology. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02211-1>
- Wu, H., Wen, D., & Mahato, R. I. (2013). Third-party mesenchymal stem cells improved human islet transplantation in a humanized diabetic mouse model. *Molecular Therapy*, 21(9), 1778–1786. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.147>
- Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T., & Davies, M. J. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: A 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 92(1084), 63–69. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133281>