

**PENGARUH PEMBERIAN *SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL CELL* TERHADAP KADAR IL-17 TIKUS MODEL DM TIPE 1**  
(Studi Eksperimental *in Vivo* Sekretom *Mesenchymal Stem Cell* pada Kultur Hipoksia terhadap Tikus Jantan Galur Wistar)

**Skripsi**

Untuk memenuhi persyaratan  
Mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun Oleh:

**Hibrul Ummah**  
**30.101.900096**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG**  
**SEMARANG**  
**2023**

**SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN *SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP KADAR IL-17 TIKUS MODEL DM TIPE 1  
(Studi Eksperimental in vivo Sekretom *Mesenchymal Stem Cell* pada Kultur Hypoxia terhadap Tikus Jantan Galur Wistar)**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

**Hibrul Ummah  
30.101.900096**

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Pada tanggal, 7 Februari 2023  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Penguji I

Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M. Si. Med      dr. Azizah Retno Kustivah, Sp.A., M.Biomed

Pembimbing II

Penguji II

dr. Nur Anna Chalimah Sa'dyah, Sp.PD-KEMD      Drs. Purwito Soegeng Prasetyono, M.Kes

Semarang, 7 Februari 2023

Fakultas Kedokteran

Dekan,



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

## SURAT PENYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Hibrul Ummah

NIM : 30101900096

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM HYPOXIA MESENCHYMAL  
STEM CELL TERHADAP KADAR IL-17 TIKUS MODEL DM TIPE 1”**

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 7 Februari 2023

Yang menyatakan



UNISSULA  
ان أجمع الإسلام  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG  
NIM 30101900096

Hibrul Ummah

## PRAKATA

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

*Alhamdulillahirabbil'alamin*, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT berkat segala rahmat dan karunia-Nya penulis telah diberi kesehatan, ketabahan, kesehatan, kesabaran, dan kekuatan sehingga dapat menyelesaikan dengan baik skripsi yang berjudul, “Pengaruh Pemberian *Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* Terhadap Kadar IL-17 Tikus Model DM Tipe 1” (Studi Eksperimental In Vivo *Sekretom Mesenchymal Stem Cell* pada Kultur Hipoksia Terhadap Tikus Jantan Galur Wistar)” sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan studi serta untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang .

Penulis ingin 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. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si, Med dan dr. Eko Setiawan Sp.B, selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A,M.Biomed dan Drs. Purwito Soengeng Prasetijono, M.Kes selaku dosen penguji yang telah dengan sabar

meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.

4. Kedua orang tua saya tercinta Ibu dan Abah, serta kedua kakak saya yang telah memberikan dukungan sehingga Skripsi ini selesai.
5. Staf Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah membantu dalam berjalannya penelitian ini.
6. Mas Asyif yang sudah menemani dan membantu menyelesaikan skripsi mulai dari awal hingga akhir, mengorbankan waktu dan tenaganya selama proses skripsi, sekaligus menjadi support system terbaik. Saranghee <3
7. Terimakasih kepada sahabat-sahabat tersayang seperti Imma Hikmatun Nuzul, Resky Septiyani, Eva Nur Hidayah, Alfida Fitratunnisa Aldian 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.
8. Semua pihak yang telah ikut membantu 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, 7 Februari 2023

Penulis,



**Hibrul Ummah**

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>SURAT PENYATAAN</b> .....	iii
<b>PRAKATA</b> .....	iv
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
<b>INTISARI</b> .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	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 .....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Interleukin (IL – 17) .....	6
2.1.1 Definisi .....	6
2.1.2 Struktur .....	7
2.1.3 Sintesis .....	7
2.1.4 Faktor yang Mempengaruhi Kadar Interleukin (IL – 17) .....	8
2.2 Sekretom .....	10
2.2.1 Definisi .....	10
2.2.2 Komposisi .....	10
2.2.3 <i>Mesenchymal Stem Cell</i> .....	11
2.2.3.1 Definisi .....	11

2.2.3.2	Fungsi .....	12
2.2.3.3	Sumber .....	14
2.2.3.4	Karakteristik.....	14
2.2.4	Modifikasi Pendorong Sekret Mesenchymal Stem Cell	15
2.2.5	Hipoksia .....	16
2.2.5.1	Definisi.....	16
2.2.5.2	Mekanisme Fisiologi Selular .....	16
2.3	DM (Diabetes mellitus ) .....	18
2.3.1	Definisi.....	18
2.3.2	Klasifikasi .....	18
2.3.3	DM Tipe 1 .....	20
2.3.3.1	Definisi.....	20
2.3.3.2	Etiologi.....	21
2.3.3.3	Insulinoma-associated 2 (IA-2).....	22
2.3.3.4	Patofisiologi.....	22
2.3.4	Diabetes Tipe 2 .....	23
2.3.4.1	Definisi .....	23
2.3.4.2	Etiologi .....	24
2.3.4.3	Patofisiologi .....	24
2.3.5	Diagnosis DM .....	24
2.3.5.1	A1C.....	25
2.3.5.2	Glukosa Plasma Puasa/ fasting plasma glucose (FPG) .....	25
2.3.5.3	Tes Toleransi Glukosa Oral / Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) .....	26
2.3.5.4	Gula Darah Sewaktu (GDS) .....	26
2.3.6	Fisiologi Pengaturan Glukosa Darah .....	26
2.3.7	Streptozotocin .....	28
2.4	Hubungan Sekretom <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> terhadap Kadar Interleukin (IL – 17) Pada Kerusakan Islet.....	29
2.5	Kerangka Teori .....	31
2.6	Kerangka Konsep.....	31
2.7	Hipotesis .....	31
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>		<b>32</b>

3.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	32
3.2	Variabel dan Definisi Operasional.....	33
3.2.1	Variabel Penelitian.....	33
3.2.1.1	Variabel bebas.....	33
3.2.1.2	Variabel tergantung.....	33
3.2.2	Definisi Operasional .....	33
3.2.2.1	Sekretom <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i> .....	33
3.2.2.2	Kadar IL-17 dalam Darah .....	33
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian.....	33
3.3.1	Populasi.....	33
3.3.1.1	Populasi Target .....	34
3.3.1.2	Populasi Terjangkau .....	34
3.3.2	Sampel Penelitian.....	34
3.3.2.1	Kriteria Inklusi.....	34
3.3.2.2	Kriteria Eksklusi .....	34
3.3.2.3	Kriteria Drop Out.....	34
3.3.3	Besar Sampel .....	35
3.4	Instrumen dan Bahan.....	35
3.4.1	Instrumen .....	35
3.4.2	Bahan .....	36
3.5	Prosedur dan Teknik Penelitian.....	36
3.5.1	Teknik Isolasi <i>Human Mesenchymal Stem Cell</i> dari Umbilical Cord.....	36
3.5.2	Proses Persiapan Passage .....	37
3.5.3	Proses <i>Passage</i> Sel.....	38
3.5.4	Proses Validasi Sel.....	38
3.5.5	Proses Pemanenan Sel.....	39
3.5.6	Proses Penghitungan Sel .....	39
3.5.7	Pembuatan Tikus Model DM Tipe 1 .....	40
3.5.8	Perlakuan pada Hewan Coba .....	43
3.5.9	Analisis Kadar IL-17 Menggunakan ELISA .....	43
3.6	Tempat dan Waktu Penelitian.....	45
3.6.1	Tempat Penelitian .....	45



3.6.2 Waktu Penelitian.....	45
3.7 Analisis Data.....	46
3.8 Alur Penelitian.....	47
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>48</b>
4.1 Hasil Penelitian.....	48
4.1.1. Uji Validasi MSC.....	48
4.1.2. Kadar IL-17.....	52
4.2 Pembahasan.....	54
4.2.1. Beda Penelitian terdahulu.....	57
4.2.2. Keterbatasan Penelitian.....	58
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>59</b>
5.1. Kesimpulan.....	59
5.2. Saran.....	59
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>60</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>68</b>



## DAFTAR SINGKATAN

ADA	: <i>American DM Association</i>
AIRE	: <i>Autoimmune Regulator</i>
AMP	: <i>Antimicrobial Peptide</i>
AT	: <i>Adeocyte Tissue</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
BM	: <i>Bone Marrow</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CTLA-4	: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DM	: <i>DM</i>
DMT1	: <i>DM Tipe 1</i>
DMT2	: <i>DM Tipe 2</i>
ER	: <i>Endoplasmic Reticulum</i>
ERBB3	: <i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3</i>
EZH2	: <i>Enhancer Zeste Homolog 2</i>
FoxP3	: <i>Forkhead box P3</i>
FPG	: <i>Fasting Plasma Glucose</i>
GAD	: <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
GDM	: <i>Gestational DM</i>
GDS	: <i>Gula Darah Sewaktu</i>
HIF	: <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HIP14	: <i>Huntingtin-Interacting Protein 14</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HNF-1a	: <i>Hepatocyte Nuclear Factor-1a</i>
HYMAI	: <i>Hydatiform Mole Associated and Imprinted Transcript</i>
IA2	: <i>Islet Antigen 2</i>
IAA	: <i>Insulin Autoantibodies</i>
IFIH1	: <i>Interferon Induced With Helicase C Domain 1</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
KCNJ11	: <i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11</i>
MODY	: <i>Maturity-Onset DM of The Young</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stemcell</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
ODD	: <i>Oxygen-Dependent Degeneration</i>
OGTT	: <i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
PIGF	: <i>Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein</i>
PTPN22	: <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>

SRP	: <i>Signal Recognition Protein</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TGN	: <i>Trans-Golgi Network</i>
TNF	: <i>Tumour Necrosis Factor</i>
UCB	: <i>Umbilical Cord Blood</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	: <i>Von Hippel–Lindau</i>
VNTR	: <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
ZAC	: <i>Zinc Finger Protein Regulating Apoptosis and Cycle Arrest</i>



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Nilai A1C .....	25
Tabel 2.2. Nilai Glukosa Plasma Puasa.....	25
Tabel 2.3. Nilai Toleransi Glukosa Oral .....	26
Tabel 4.1. Deskripsi Kadar IL-17 dalam Darah Tiap Minggu .....	52



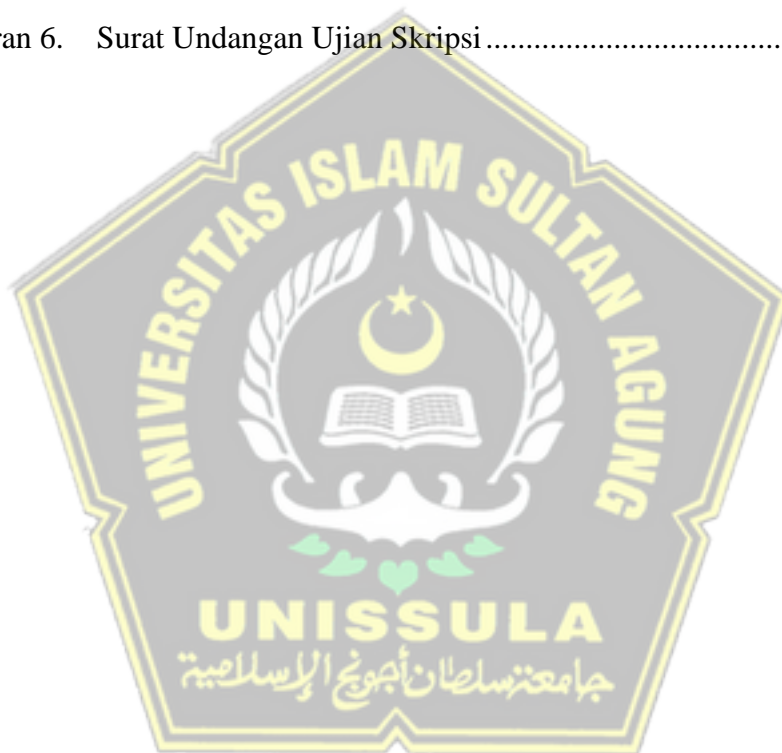
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Kerangka Teori.....	31
Gambar 2.2.	Kerangka Konsep .....	31
Gambar 3.1.	Skema rancangan penelitian post-test only group .....	32
Gambar 3.2.	Alur Penelitian.....	47
Gambar 4.1.	Uji validasi MSCs.....	47
Gambar 4.2.	Uji validasi MSCs diferensiasi <u>adipogenik</u> .....	47
Gambar 4.3.	Uji validasi MSCs diferensiasi <u>osteogenik</u> .....	47
Gambar 4.4.	Deteksi marker .....	47
Gambar 4.5.	Kadar IL-17 darah pada kelompok Sham .....	50
Gambar 4.6.	Efek injeksi IP sekretom <i>Hypoxia</i> MSC.....	51



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Izin Penelitian .....	68
Lampiran 2.	Surat Keterangan selesai Penelitian.....	69
Lampiran 3.	Surat <i>Ethical Clearence</i> .....	70
Lampiran 4.	Hasil SPSS.....	71
Lampiran 5.	Kegiatan perawatan dan Perlakuan Hewan Coba.....	74
Lampiran 6.	Surat Undangan Ujian Skripsi.....	77



## INTISARI

Diabetes melitus tipe 1 adalah penyakit autoimun kronis yang disebabkan oleh kerusakan lebih dari 70%-90% sel  $\beta$  pankreas sehingga terjadi kegagalan produksi insulin. Proses autoimun pada DM1 berkaitan dengan proliferasi dan aktivasi sel T helper 17 (Th17). *Mesenchymal Stem Cells (MSC)* merupakan terapi yang memiliki potensi dalam meregenerasi islet dan memperbaiki fungsi jaringan pankreas yang rusak dalam keterlibatan growth factor sebagai molekul sekretom yang disekresikan MSC. MSC hipoksia menunjukkan potensi terapeutik yang dimediasi oleh MSC ini dikaitkan dengan respons imun yang dilemahkan dan ditandai dengan berkurangnya frekuensi sel Th17 dan pembentukan sel T regulator. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan penurunan kadar IL-17 serum tikus model diabetes pada kelompok perlakuan 1 dengan sekretom *Hypoxia-MSC* yang dibandingkan dengan kontrol.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik in vivo yang menggunakan metode “*post test only control group design*” dengan 24 tikus model diabetes yang dirandomisasi menjadi 4 kelompok meliputi kelompok : Sham (tanpa perlakuan), kontrol (STZ 65mg/kgBB), P1 (0,5 cc sekretom *Hypoxia-MSC*), P2 (1 cc sekretom *Hypoxia-MSC*). Pembuatan tikus model diabetes menggunakan Streptozotocin (STZ) 1 kali kemudian dipelihara selama 3 minggu. Pemberian terapi sekretom *Hypoxia-MSC* diberikan 1 kali pada setiap awal minggu dan dilakukan pengukuran kadar IL-17 menggunakan darah supraorbitalis tikus pada setiap akhir minggu selama 3 minggu penelitian setelah induksi STZ.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya penurunan signifikan pada kelompok perlakuan 1 dan 2 terhadap kelompok kontrol pada minggu ke 1 hingga 3 ( $P < 0,05$ ).

Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa terapi sekretom *Hypoxia-MSC* dapat menurunkan kadar IL-17 pada tikus model diabetes tipe-1.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

DM dalam pandangan medis merupakan serangkaian kondisi metabolik yang disebabkan oleh insufisiensi insulin parsial atau total (Egan, 2018). Pembagian klasifikasi DM yang sering digunakan adalah DM tipe 1, tipe 2, dan gestasional (Husein et al., 2016). Diabetes melitus tipe 1 adalah penyakit autoimun kronis yang disebabkan oleh kerusakan lebih dari 70%-90% sel  $\beta$  pankreas sehingga terjadi kegagalan produksi insulin. Proses autoimun pada DMT1 telah dilaporkan dengan proliferasi dan aktivasi sel T helper 17 (Th17) (Wibisono et al., 2016). Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa penderita DM tipe 1 memiliki risiko lebih tinggi terserang penyakit kardiovaskular dan menjadi penyebab kematian lainnya dibandingkan dengan penderita DM tipe 2 (Y. Bin Lee et al., 2019).

Data dari Amerika Serikat pada tahun 2001 hingga 2015 menunjukkan sekitar 22,9 kasus DM tipe 1 per 100.000 orang penduduk terjadi di bawah usia 65 tahun. Peningkatan kasus tertinggi juga terjadi pada anak-anak di bawah usia 15 tahun dengan puncak prevalensi pada usia di bawah 5 tahun (Freeman, 2018). Berdasarkan data Ikatan Dokter Anak Indonesia (IDAI) pada tahun 2018, sebanyak 1220 anak penyandang DM tipe-1 di Indonesia. Kejadian DM tipe-1 pada anak dan remaja mengalami peningkatan sekitar tujuh kali lipat dari 3,88 menjadi 28,19 per 100 juta penduduk di tahun 2000 dan 2010. Pada tahun 2003-2009 menunjukkan data kelompok usia 10-14



tahun, jumlah perempuan dengan DM tipe 1 (60%) lebih tinggi dibandingkan laki-laki (28,6%). Di tahun 2017, 71% anak dengan penderita DM tipe-1 untuk pertama kali terdiagnosis dengan Ketoasidosis Diabetikum (KAD), meningkat pada tahun 2016 dan 2015, sekitar 63% (Pulungan et al, 20). Tingkat kematian pasien dengan DM tipe 1 adalah 26,93 per 1.000 orang-tahun untuk seluruh kelompok pasien, 29,25 per 1.000 orang-tahun untuk laki-laki, dan 24.90 per 1.000 orang-tahun untuk perempuan (Lu et al, 2020).

Terapi ekstrak insulin menjadi sebuah pengobatan yang menggunakan rekayasa analog insulin, terapi ini dapat meningkatkan kontrol DM serta mengurangi ataupun menunda komplikasi pasien (Quianson & Cheikh, 2012; Secret et al., 2014). Meski demikian terapi ini dianggap suboptimal, terkait dengan masalah frekuensi injeksi, dosis, maupun absorpsi (Aghazadeh & Nostro, 2017). Masalah lain yang ditemukan adalah efek penurunan glukosa yang tidak stabil dan menyebabkan hipoglikemia dalam waktu yang lama. Terapi lainnya yang bisa diterapkan adalah transplantasi pankreas. Akan tetapi, permasalahan muncul kembali terkait sedikitnya pendonor dan respon sistem imun yang tidak diinginkan terhadap jaringan asing (Pathak et al., 2019).

Mesenchymal Stem Cell (MSC) dapat meningkatkan islet pankreas dengan menekan kerusakan inflamasi dan menjadi reaksi penolakan antigen yang dimediasi oleh kekebalan (Katuchova et al., 2015). Sampai saat ini tidak ada efek samping yang serius maupun episode hipoglikemik yang signifikan pada penderita DM yang diobati dengan MSC (Li et al., 2021). Kemudian, MSC yang dibuat dalam keadaan hipoksia di awal kultur menunjukkan

peningkatkan dalam efek regeneratif dan *survival* yang berasal dari sel tersebut (Ferreira et al., 2018). Selain itu terapi MSC hipoksia secara histologis dapat meningkatkan regenerasi sel  $\beta$  pankreas secara signifikan dibandingkan MSC normoksik setelah ditransplantasikan pada tikus model DM (Waseem et al., 2016). Penelitian lain menunjukkan bahwa MSC yang dikondisikan hipoksia dapat mensekresikan sekretom dengan kadar molekul terlarut yang lebih tinggi. Sekretom MSC dengan kadar molekul terlarut termasuk di dalamnya yaitu sitokin, kemokin, molekul imunomodulator, dan faktor pertumbuhan. Sekretom yang mengandung molekul-molekul tersebut dapat memperbaiki jaringan yang rusak dengan cara memodulasi dan mendorong pembentukan jaringan baru.

Sekretom merupakan sekret MSC yang berupa faktor trofik, sitokin imunomodulator, kemokin, faktor pertumbuhan, protein, dan vesikel ekstraseluler (Ahangar & Mills, 2020; Eleuteri & Fierabracci, 2019). Efek regeneratif MSC lebih bergantung pada aksi parakrinnya, dibandingkan dengan pengikatannya terhadap jaringan penerima dan diferensiasinya telah membuat strategi baru terapi bebas sel untuk pengobatan yang sifatnya regeneratif (González-González et al., 2020). Bukti terkini menunjukkan bahwa dalam memperbaiki sel  $\beta$  pankreas yang rusak, sekretom MSC bekerja dengan merangsang proliferasi dan angiogenesis pada sel  $\beta$  pankreas yang sebelumnya kurang optimal (Waseem et al., 2016).

Berdasarkan penjelasan di atas dapat disimpulkan bahwa DM tipe 1 lebih berbahaya dibanding tipe yang lain dan pengobatan yang masih kurang optimal. Terapi sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* belum pernah

dilakukan terhadap perbaikan DM tipe 1, diperlukan upaya penelitian terhadap sekretom MSC dengan prakondisi hipoksia sebagai pendorong sekresi sekretom MSC, untuk mengetahui pengaruhnya terhadap tikus model DM tipe 1.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Bagaimana pengaruh sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar IL-17 tikus model DM tipe 1.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh dari sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar IL-17 pada tikus model DM tipe 1

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Membuktikan penurunan kadar IL-17 tikus model DM pada kelompok perlakuan 1 dengan sekretom *Hypoxia-MSC* dosis 0,5 cc dan 1 cc yang dibandingkan dengan kontrol.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan sekretom *Hypoxia-MSC* terhadap kadar IL-17 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 dari *Hypoxia-MS* terhadap kadar IL-17 tikus model DM tipe 1



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Interleukin (IL – 17)**

##### **2.1.1 Definisi**

Interleukin-17 (IL-17) adalah sitokin yang disekresikan secara eksklusif dan diaktifkan T-sel. Sitokin ini diproduksi oleh sekelompok sel T helper yang dikenal sebagai T helper 17 sel dalam menanggapi rangsangan inflamasi dengan IL-23. Keluarga IL-17 terdiri dari IL17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E dan IL-17F. IL-17E juga dikenal sebagai IL-25. Semua anggota keluarga IL-17 memiliki struktur protein yang sama (Sparber & Leibundgut-Landmann, 2019)

Interleukin-17 (IL-17) memproduksi sel T mewakili subset yang berbeda dari subset sel T CD4+ lainnya, yang dikenal sebagai Th17. Sel Th17 menyediakan perlindungan terhadap beberapa infeksi dan terkait dengan perkembangan penyakit autoimun. Sel Th17 sebagai sitokin pleiotropik dapat memicu peradangan akut respon yang didominasi oleh rekrutmen garis keturunan granulosit, terutama neutrofil terhadap ekstraseluler bakteri dan beberapa jamur (Sawyer et al., 2019). IL-17 didefinisikan sebagai sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh sel T teraktivasi sebagai respons terhadap stimulasi melalui reseptor sel T. Th17 sel mengeluarkan tidak hanya IL-17A, tetapi juga IL-17F, IL-21, IL-22 dan IL-23; sitokin ini kemungkinan besar bekerja sama untuk menginduksi beberapa efek inflamasi dan

hematopoietik pada epitel, endotel, dan sel fibroblastik (Malhotra et al., 2013).

### 2.1.2 Struktur

Gen IL-17 manusia dipetakan pada kromosom manusia 6p12. Gen produk adalah protein dari 150 asam amino dengan molekul berat 15 kDa dan disekresikan sebagai ikatan disulfida homodimer glikoprotein 30-35 kDa. polipeptida IL-17 terdiri dari urutan sinyal 19 asam amino diikuti oleh fragmen matang 136-asam amino. Ini terdiri dari setidaknya satu situs glikosilasi terkait-N dan secara biokimia, IL-17 A bermigrasi sebagai dimer, tampaknya melalui enam sistein residu yang membentuk interaksi ikatan antarmolekul (Sawyer et al., 2019).

Keluarga IL-17 terdiri dari IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E dan IL-17F. IL-17E juga dikenal sebagai IL-25. Semua anggota keluarga IL-17 memiliki struktur protein yang sama. Urutan protein mereka mengandung empat residu sistein. Residu sistein ini sangat penting untuk bentuk 3-dimensi yang tepat dari seluruh molekul protein. Anggota keluarga IL-17 tidak menunjukkan homolog urutan yang signifikan dengan sitokin lain. Di antara anggota keluarga IL-17, IL-17F memiliki homolog urutan tertinggi dengan IL-17. Mereka mengikuti IL-17B, yang memiliki 29% kemiripan dengan IL-17A, IL-17D (25%), IL-17C (23%), dan IL-17E (17%) (Sparber & Leibundgut-Landmann, 2019).

### 2.1.3 Sintesis

Gen untuk manusia IL-17 adalah 1874 pasangan basa panjang dan dikloning dari sel T CD4<sup>+</sup>. Setiap anggota keluarga IL-17 memiliki pola ekspresi seluler yang berbeda (Sawyer et al., 2019). Sintesis IL-17 sekarang diketahui disekresikan oleh jenis sel lain selain sel T CD8<sup>+</sup>, sel T<sub>H</sub>, sel T sel pembunuh T (NKT), sel pembunuh alami (NK), monosit, makrofag, sel dendritik (DC), mikroglia, neutrofil, eosinofil, astrosit, dan oligodendrosit. Dengan demikian, sel dari kedua sistem kekebalan bawaan dan adaptif sebagai serta sel non-imun [23] menghasilkan IL-17A dan IL-17F (Shabgah et al., 2014).

Beberapa kelompok telah mengidentifikasi cara untuk menginduksi produksi IL-17 baik secara *in vitro* dan *in vivo* oleh sitokin yang berbeda, yang disebut TGF- $\beta$  dan IL-6, tanpa perlu IL-23. Meskipun IL-23 tidak diperlukan untuk ekspresi IL-17 dalam situasi ini, IL-23 dapat memainkan peran dalam mempromosikan kelangsungan hidup dan/atau proliferasi IL-17 yang menghasilkan T-sel (Sparber & Leibundgut-Landmann, 2019).

#### **2.1.4 Faktor yang Mempengaruhi Kadar Interleukin (IL – 17)**

Interleukin IL-17 sekarang diketahui disekresikan oleh jenis sel lain selain sel T CD8<sup>+</sup>, sel T<sub>H</sub>, sel T sel pembunuh T (NKT), sel pembunuh alami (NK), monosit, makrofag, sel dendritik (DC), mikroglia, neutrofil, eosinofil, astrosit, dan oligodendrosit. Dengan demikian, sel dari kedua sistem kekebalan bawaan dan adaptif sebagai

serta sel non-imun menghasilkan IL-17A dan IL-17F (Sparber & Leibundgut-Landmann, 2019).

Faktor yang mempengaruhi kadar untuk IL-17A (IL-17R) adalah protein transmembran single-pass sekitar 130 kDa. Selagi IL17A diekspresikan hanya oleh sel-T, reseptornya adalah diekspresikan di semua jaringan yang diperiksa sampai saat ini. aktivasi dari reseptor oleh IL-17A umumnya menghasilkan induksi sitokin pro-inflamasi lainnya, melalui aktivasi NF- $\kappa$ B (Shabgah et al., 2014).

Empat faktor tambahan telah diidentifikasi, melalui pencarian basis data, yang berbagi homologi urutan parsial untuk IL-17R. Dari jumlah tersebut, hanya IL-17RH1 (juga disebut IL-17B reGbr). Pertama, penyelarasan keluarga sitokin IL-17: penyelarasan anggota keluarga sitokin IL-17 manusia menunjukkan fitur umum mereka, bayangan lebih gelap dan jenis huruf tebal mewakili identitas urutan. Sistein yang dilestarikan berwarna merah yang mungkin terlibat dalam ikatan disulfida intra dan antar rantai. Kedua, pada filogenetik menunjukkan bagaimana kadar ini terkait secara evolusi. Ketiga, reseptor yang telah terbukti mengikat sitokin IL-17, yaitu IL-17B dan IL-17E. Protein seperti reseptor IL-17 (juga disebut IL-17RL atau IL17RC), IL-17RD (juga disebut SEF atau IL-17RLM) dan IL-17RE hanya diidentifikasi berdasarkan kesamaan urutan dengan IL-17R. Keempat, banyak dari reseptor ini menjadi isoform alternatif yang



disambung, beberapa di antaranya mungkin tidak mengandung domain transmembran atau sitoplasma, dan dengan demikian mungkin bertindak sebagai reseptor umpan larut. Mereka menunjukkan distribusi jaringan yang luas, dan tidak banyak yang diketahui tentang fungsi atau jalur transduksi sinyal (Malhotra et al., 2013).

Keluarga interleukin IL-17 yang baru diidentifikasi dari reseptor, dan ekspresi mereka dalam jaringan yang berbeda, aktivitas dan ekspresi sitokin IL-17 melebihi respon inflamasi yang dimediasi oleh sistem imun sel T. Sitokin IL-17 dan reseptornya dapat memainkan peran penting dalam homeostasis jaringan dan perkembangan penyakit (Sawyer et al., 2019).

## **2.2 Sekretom**

### **2.2.1 Definisi**

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

### **2.2.2 Komposisi**

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

### 2.2.3 *Mesenchymal Stem Cell*

#### 2.2.3.1 Definisi

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

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

### 2.2.3.2 Fungsi

#### 1. Kemampuan Diferensiasi

MSC memiliki kapabilitas untuk memperbarui diri sambil mempertahankan multipotensinya. Penelitian menunjukkan bahwa  $\beta$ -catenin, melalui regulasi EZH2, adalah molekul sentral dalam mempertahankan sifat "stemness" dari MSC. Tes standar untuk memastikan multipotensi adalah diferensiasi sel menjadi osteoblas, adiposit dan kondrosit serta miosit (Sen et al., 2020).

MSC bersifat multipoten, artinya mereka dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel mesenkim, termasuk diantaranya yaitu : sel endotel, osteoblas, kondrosit, fibroblas, tenosit, sel otot polos pembuluh darah, mioblas, dan neuron (Berebichez-Fridman et al., 2017).

#### 2. Immunomodulator

MSC telah terbukti menunjukkan penghambatannya terhadap proliferasi sel-T yang

diaktifkan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dan menginduksi dari proliferasi sel T-regulator. MSC juga dikenal sebagai imunogenik lemah yang memberikan efek immunosupresif pada sel B, sel *Natural Killer* (NK), sel dendritik, dan neutrofil melalui berbagai mekanisme (Wada et al., 2013). MSC dapat bermigrasi ke lokasi peradangan untuk memberikan kemudian menahan efek immunomodulator dan antiinflamasi yang kuat melalui interaksi sel-sel, antara MSC dan limfosit ataupun produksi faktor molekul terlarut (Zhao et al., 2016).

### 3. Antimikrobia

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

### 2.2.3.3 Sumber

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

Sumber MSC yang sudah diteliti hingga kini yaitu Sumsum tulang/ Bone Marrow (BM), Jaringan lemak/ Adipocyte Tissue, (AT), Pulpa gigi, Jaringan yang berasal dari kelahiran (*Birth-derived tissues* : Umbilical cord (UCB), Warthon jelly, Kondrosit) Cairan amnion dan plasenta, Darah tepi, Cairan synovial dan synovial, Endometrium, Kulit, Otot

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

### 2.2.3.4 Karakteristik

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

1. Harus menunjukkan sifat perlekatannya pada plastik dalam kultur standar
2. Memiliki seperangkat penanda permukaan sel tertentu, yaitu :

- a. *Cluster of differentiation* (CD) 73, CD90, CD105 dengan total populasi  $\geq 95\%$
  - b. Sedikit mengekspresikan CD14, CD34, CD45 dan antigen leukosit manusia-DR (HLA- DR) dengan total populasi  $\leq 2\%$
3. Memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi secara *in vitro* menjadi adiposit, kondrosit, dan osteoblas.

Seluruh karakteristik tersebut berlaku untuk semua MSC, meskipun terdapat sedikit perbedaan karakteristik MSC yang diisolasi dari sumber jaringan yang berbeda (Dominici et al., 2006; Ullah et al., 2015).

#### **2.2.4 Modifikasi Pendorong Sekret Mesenchymal Stem Cell**

Terdapat beberapa bukti yang menunjukkan bahwa modifikasi MSC dapat meningkatkan efek terapeutik sekretomnya. Berbagai rangsangan dan kondisi yang telah dikembangkan antara lain (Vizoso et al., 2017): kultur sel dalam kondisi hipoksia, meningkatkan produksi faktor pertumbuhan dan molekul anti-inflamasi;

1. Rangsangan pro-inflamasi, menginduksi sekresi lebih tinggi dari faktor-faktor yang berhubungan dengan imunitas;
2. Kultur pada sistem tiga dimensi, yaitu kultur sferoid, meningkatkan produksi faktor anti-inflamasi dan anti-tumor
3. Rekayasa mikropartikel.

## 2.2.5 Hipoksia

### 2.2.5.1 Definisi

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

### 2.2.5.2 Mekanisme Fisiologi Selular

Ketergantungan kuat pada oksigen untuk homeostasis metabolik dan kelangsungan hidup menyebabkan evolusi awal mekanisme molekuler yang memungkinkan sel, jaringan, dan organisme untuk beradaptasi dengan hipoksia. Respon adaptif ini terutama diatur oleh keluarga faktor transkripsi yang disebut *hypoxiainducible factors* (HIFs) (Fabian, 2019).

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

prolin dalam domain *oxygen-dependent degradation* (ODD) dari HIF $\alpha$ . Reaksi hidroksilasi ini, yang dikatalisis oleh *HIF-regulating prolyl-4hydroxylases*, digabungkan dengan dekarboksilasi oksidatif- ketoglutarat menjadi suksinat dan karbon dioksida (Lee et al., 2020).

Dalam hipoksia, bagaimanapun, subunit HIF- $\alpha$  lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerisasi dengan HIF-1 $\beta$  dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi peralihan dari metabolisme bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik (Fabian, 2019). HIF-1 $\alpha$  diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 $\alpha$  dan HIF-3 $\alpha$  diekspresikan pada jaringan yang lebih terbatas dan pada tahap perkembangan, seperti paru-paru janin atau endotel vaskular yang berkembang. Dalam merefleksikan pola ekspresi jaringan spesifik mereka, HIF-1 $\alpha$  memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respons terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 $\alpha$  dan HIF-3 $\alpha$  memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen (Chen et al., 2020).



## 2.3 DM (Diabetes mellitus )

### 2.3.1 Definisi

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

### 2.3.2 Klasifikasi

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

1. DM tipe 1 (kerusakan sel- $\beta$ , biasanya menyebabkan defisiensi insulin absolut) :
  - a. Dimediasi kekebalan
  - b. Idiopatik

2. DM tipe 2 (dapat berkisar dari resistensi insulin yang didominasi dengan defisiensi insulin relatif hingga defek sekresi yang didominasi oleh resistensi insulin)
3. DM gestasional
4. Jenis khusus lainnya

a. Cacat genetik fungsi sel-β :

MODY 3 (Kromosom 12, HNF-1a), MODY 1 (Kromosom 20, HNF-4a), MODY 2 (Kromosom 7, glukokinase), Bentuk MODY lain yang sangat langka (misalnya, MODY 4: Kromosom 13, faktor promotor insulin1; 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-β), 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,  $\gamma$ -Interferon.

f. Infeksi :

Rubella bawaan, Sitomegalovirus, Lainnya.

g. Bentuk DM dimediasi kekebalan yang jarang :

*Stiff-man syndrome* , antibodi reseptor anti-insulin.

h. Sindrom genetik lainnya terkadang berhubungan dengan DM:

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

### 2.3.3 DM Tipe 1

#### 2.3.3.1 Definisi

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

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

#### 2.3.3.2 Etiologi

DM tipe 1 biasanya hadir pada individu tanpa riwayat keluarga. Hanya 10-15% pasien yang memiliki kerabat tingkat pertama atau kedua dengan penyakit ini. Risiko seumur hidup untuk mengembangkan DMT1 meningkat secara signifikan pada kerabat pasien, sekitar 6% pada anak-anak mereka, 5% saudara kandung dan 50% anak kembar monozigot menunjukkan penyakit ini dibandingkan dengan prevalensi 0,4% dari populasi umum. Lebih dari 50 lokus

risiko genetik DMT1 telah diidentifikasi oleh studi asosiasi genom dan metaanalisis (Paschou et al., 2018):

1. HLA
2. CTLA-4
3. Insulin-VNTR
4. Gen-gen lain yang berpengaruh (FoxP3, PTPN22, AIRE, STAT3, HIP14, ERBB3, IFIH1)

Adanya autoantibodi pankreas yang bersirkulasi menunjukkan bahwa individu tersebut berisiko atau telah mengembangkan DMT1. Antibodi ini termasuk (Speight & Pouwer, 2019) :

1. Antibodi sitoplasma sel pulau/islet *cell cytoplasmic antibodies* (ICA)
2. Antibodi terhadap insulin/*insulin autoantibodies* (IAA)
3. Asam glutamat dekarboksilase/*glutamic acid decarboxylase* (GAD65)

#### **2.3.3.3 Insulinoma-associated 2 (IA-2)**

1. Antibodi protein tirosin fosfatase dan
2. Zinc transporter8 (ZnT8).

#### **2.3.3.4 Patofisiologi**

DM tipe 1 dihasilkan dari penghancuran sel penghasil insulin di pankreas yang disebut sel beta oleh sistem imun adaptif. Proses ini didorong oleh interaksi yang tidak

sepenuhnya dipahami antara genetika dan lingkungan dari seseorang. Faktor genetik yaitu, individu dengan ekspresi berlebih dari *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dari kelas HLA DR4, DQ8, dan DQ2 yang meningkatkan kerentanannya terdapat pada sekitar 90% pasien DM1) dan satu atau lebih faktor lingkungan menyebabkan pengenalan komponen sel beta sebagai autoantigen yang salah dikenali oleh sistem kekebalan sebagai benda asing yang mengarah ke serangan autoimun (Giwa et al., 2020).

#### **2.3.4 Diabetes Tipe 2**

##### **2.3.4.1 Definisi**

Lebih dari 90% dari kasus diabetes mellitus adalah DM tipe 2, 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. 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).

#### **2.3.4.2 Etiologi**

Faktor risiko DM Tipe 2 termasuk kombinasi dari faktor yang tidak dapat dimodifikasi (riwayat keluarga dan etnis) dan dapat dimodifikasi. Studi epidemiologi menunjukkan bahwa DM tipe 2 dapat dicegah dengan memperbaiki faktor yang dapat dimodifikasi (pola makan tidak sehat, aktifitas fisik yang rendah, obesitas) (Galicia-Garcia et al., 2020).

#### **2.3.4.3 Patofisiologi**

Diabetes mellitus 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. Diabetes tipe 2 biasanya berkembang pada orang dewasa, dan frekuensinya makin meningkat seiring dengan penuaan (Solis-Herrera et al., 2018).

#### **2.3.5 Diagnosis DM**

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. American DM Association mengelompokan tingkat DM berdasarkan jenis tes yang diterapkan (*Diagnosis / ADA, n.d.*) :

### 2.3.5.1 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-DM	5,7%-6,4%
DM	$\geq$ 6,5%

### 2.3.5.2 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-DM	100 mg/dl – 125 mg/dl
DM	$\geq$ 126 mg/dl

### 2.3.5.3 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-DM	140 mg/dl – 199 mg/dl
DM	$\geq$ 200 mg/dl

### 2.3.5.4 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.

### 2.3.6 Fisiologi Pengaturan Glukosa Darah

Pankreas adalah kunci dari regulasi pencernaan makronutrien untuk menjaga homeostasis energi dengan melepaskan berbagai enzim pencernaan dan hormon. Pankreas terdiri dari organ sekretorik dimana sebagian besar terdiri dari sel asinar — atau eksokrin — yang mengeluarkan jus pancreas (*pancreatic juice*) yang mengandung berbagai enzim pencernaan, seperti lipase pankreas, amilase, dan

tripsinogen, ke dalam saluran utama pankreas (duktus pankreatikus) dan saluran aksesori pancreas (duktus aksesorius). Sebaliknya, hormon pankreas dilepaskan dengan cara endokrin, yaitu sekresi secara langsung ke dalam aliran darah. Sel-sel endokrin berkumpul bersama, sehingga membentuk apa yang disebut pulau/islet Langerhans, yang merupakan struktur kecil seperti pulau di dalam jaringan pankreas eksokrin yang hanya mencakup 1-2% dari seluruh organ (Röder et al., 2016).

Islet Langerhans manusia terdiri dari sekitar 30% sel  $\alpha$  penghasil glukagon, sekitar 60% sel  $\beta$  penghasil insulin, dengan sisanya sekitar 10% terdiri dari sel- $\delta$  (penghasil somatostatin), sel  $\gamma$ - atau sel PP (penghasil polipeptida pankreas), dan sel- $\epsilon$  (penghasil ghrelin). Seluruh sel-sel endokrin ini didistribusikan secara acak dalam islet (Da Silva Xavier, 2018). Masing-masing hormon memiliki fungsi berbeda.

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

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

### 2.3.7 Streptozotocin

DM diinduksi menggunakan streptozotocin pada sebagian besar hewan laboratorium, seperti : marmot, tikus, tikus, kelinci, monyet dan anjing. Namun, spesies hewan yang berbeda, bahkan dalam famili yang sama, seringkali memiliki kepekaan berbeda terhadap STZ. Diyakini bahwa hewan pengerat, terutama tikus, paling

sensitif terhadap STZ, sementara manusia dan ikan memiliki penolakan paling tinggi (Gvazava et al., 2018).

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

#### **2.4 Hubungan Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell terhadap Kadar Interleukin (IL – 17) Pada Kerusakan Islet**

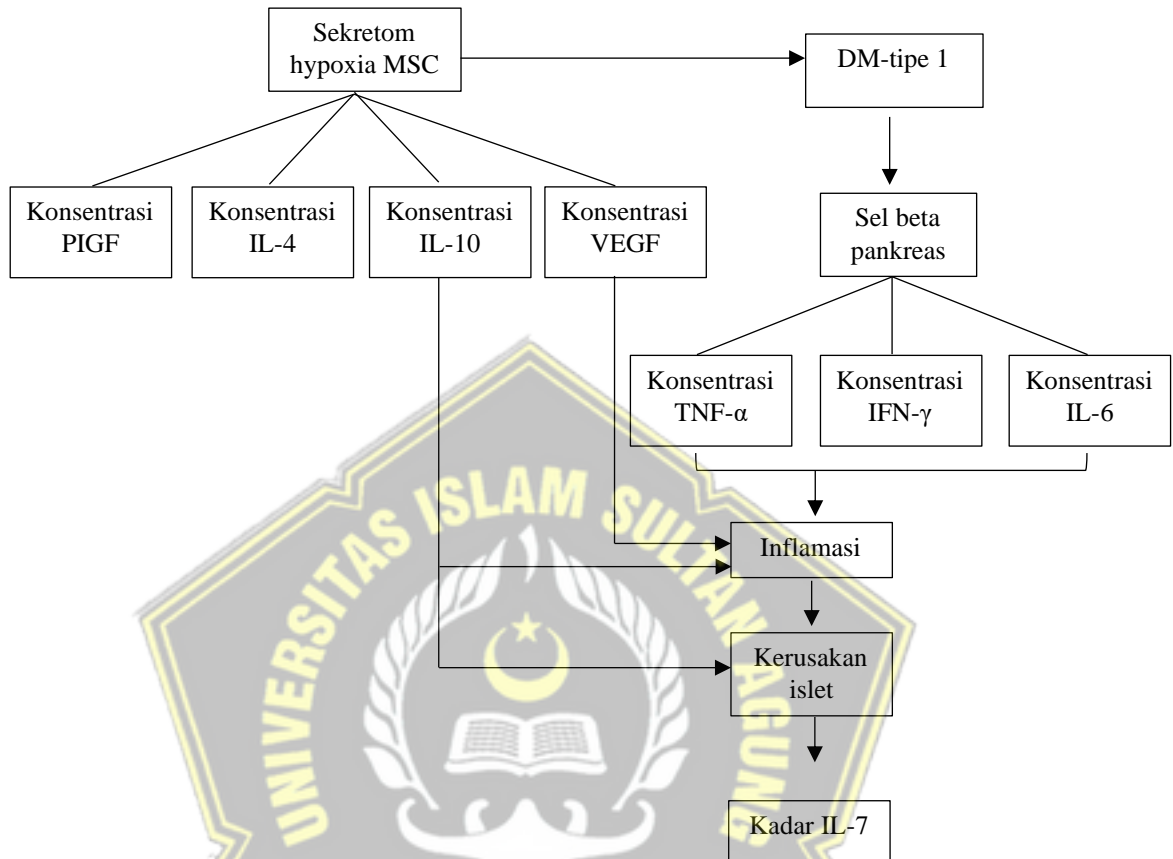
Pemberian Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (MSC) untuk mengobati berbagai penyakit inflamasi seperti DM tipe 1 menunjukkan hasil terapi yang menjanjikan. Sifat terapeutik yang dimediasi oleh MSC ini dikaitkan dengan respons imun yang dilemahkan dan ditandai dengan berkurangnya frekuensi sel Th17 dan pembentukan sel T regulator. Sel T CD4+ pro-inflamasi ini mengekspresikan sitokin IL-17A, IL-17F, dan IL-22, serta reseptor kemokin CCR6 dan reseptor terkait RAR T (ROR $\gamma$ T), faktor transkripsi utama dari manusia dan diferensiasi sel Th17 serta ciri khas sel T spesifik Th17 (Bai et al., 2018).

Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (MSC) sebelum perawatan dengan interleukin-17A (IL-17A) mewakili sebuah alur strategi imunomodulator dan alternatif pengobatan interferongamma (IFN) MSC

dalam meningkatkan imunosupresi MSC sel T (Sivanathan, Rojas-Canales dkk., 2017). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa MSC-17 manusia berpotensi menekan sel Th manusia berproliferasi dan mengaktivasi sel. Pembuatan kultur MSC dengan sel T CD4+CD25- manusia yang dimurnikan, MSC-17 menginduksi peningkatan jumlah regulasi sel Th yang menekan secara fungsional (Bai et al., 2018). MSC-17 tampaknya menjadi modulator sel Th yang unggul, mekanisme imunomodulasi yang dimediasi MSC-17 akan diteliti lebih lanjut.

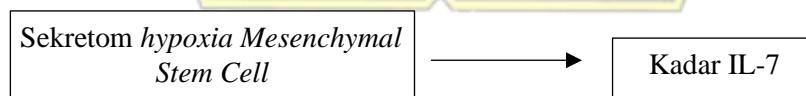
Pada penelitian sebelumnya menggunakan MSC manusia, peneliti menunjukkan bahwa efek Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (MSC) dapat menghambat produksi IL-17 oleh sel Th17 yang matur. Pada penelitian ini, menggunakan sisipan kultur sel transwell, dan ini menunjukkan bahwa kontak sel tidak diperlukan untuk MSC murni untuk menekan diferensiasi sel T CD4+ yang diaktifkan menjadi sel Th1 atau Th17 atau untuk mengubah fenotipe sel Th1 yang sepenuhnya terdiferensiasi. Namun, kontak sel-ke-sel diperlukan untuk represi yang dimediasi MSC dari program gen Th17 matang yang mendukung sub tipe sel pembantu T noninflamasi alternatif (Bai et al., 2018).

## 2.5 Kerangka Teori



Gambar 2.1. Kerangka Teori

## 2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.2. Kerangka Konsep

## 2.7 Hipotesis

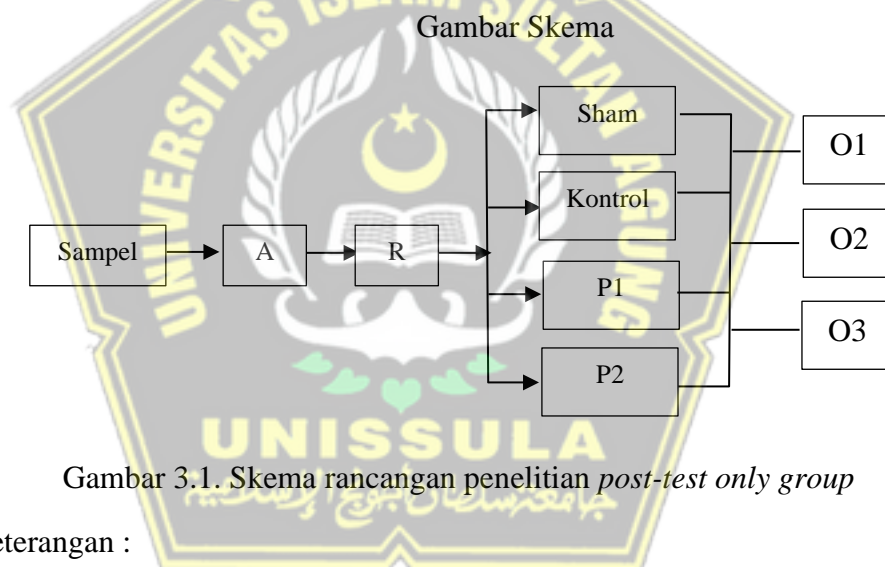
Terdapat pengaruh sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell terhadap kadar IL-17 pada DM tipe 1. Semakin tinggi dosis pemberian MSC semakin terjadi penurunan kadar IL-17.

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *in vivo* 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.



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

Keterangan :

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

Perlakuan terdiri dari :

1. Kelompok : Sham (tidak diberi perlakuan)
2. Kelompok : kontrol (DMT1 diinduksi STZ 4 mg/minggu)
3. Kelompok : P1 (pemberian H-MSCs secara IP dosis 0,5 cc)
4. Kelompok : P2 (pemberian H-MSCs secara IP dosis 1 cc)

## 3.2 Variabel dan Definisi Operasional

### 3.2.1 Variabel Penelitian

#### 3.2.1.1 Variabel bebas

Sekretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell dosis 0,5 cc dan 1 cc

#### 3.2.1.2 Variabel tergantung

Kadar IL-17 dalam darah

### 3.2.2 Definisi Operasional

#### 3.2.2.1 Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*

Sekretom MSC Hipoksia adalah sekret yang diambil dari medium *Mesenchymal Stem Cell* 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 : rasio

#### 3.2.2.2 Kadar IL-17 dalam Darah

Kadar IL-17 dalam darah adalah kadar serum IL-17 yang diambil dari supraorbitalis tikus galur wistar yang diukur konsentrasinya menggunakan metode ELISA dengan satuan pengukuran pg/ml.

Skala : rasio

## 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

### 3.3.1 Populasi



### 3.3.1.1 Populasi Target

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

### 3.3.1.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* di *Integrated Biomedical Laboratory (IBL)*, Fakultas Kedokteran UNISSULA yang dipilih secara acak dengan mempertimbangkan kriteria inklusi dan eksklusi.

## 3.3.2 Sampel Penelitian

### 3.3.2.1 Kriteria Inklusi

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

### 3.3.2.2 Kriteria Eksklusi

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

### 3.3.2.3 Kriteria Drop Out

1. Tikus mati selama penelitian

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

### 3.3.3 Besar Sampel

Penentuan besar sampel dihitung dengan menggunakan kriteria menurut World Health Organization (WHO) untuk penelitian yaitu sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Pada penelitian ini setiap kelompok diberi tambahan 1 ekor tikus. Kelompok sampel dalam penelitian disebar menjadi empat kelompok, maka besar sampel dapat dirumuskan :

$$\begin{aligned}
 \text{Besar sampel} &= \text{Jumlah kelompok penelitian} \times 6 \text{ ekor/kelompok} \\
 &= 4 \times 6 \text{ ekor} \\
 &= 24 \text{ ekor tikus jantan galur wistar.}
 \end{aligned}$$

## 3.4 Instrumen dan Bahan

### 3.4.1 Instrumen

Micropipette dengan beberapa warna tip (biru, kuning, dan merah muda), Pipet, Tabung kerucut (15 ml, 50 ml), Cryotube 1 ml, Pinset, Tabung CO<sub>2</sub>, Gunting, Pisau bedah dan bisturi, Thermostirrer, Beaker glass, Aluminium foil, Piring, Tabung labu, Sentrifugator, Chamber, Oxygen meter, CO<sub>2</sub> Incubator, Immunocytochemistry, Biosafety Cabinet class 2, Hotplate stirrer, Disposable pipet, Tabung Heparin, Inverted microscope, Cell counter, Rat IL-17 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 Cell, Serum tikus putih galur wistar, NaCl 0.9%, FBS, Medium dMEM, Alkohol 70%, Fungizon 0.5%, Streptomisin-penicilin 1% (penstrep), PBS, Deionized atau distilled water, Tikus jantan Wistar: ~150 hingga 200 g, berusia 8 hingga 10 minggu, Makanan standar hewan pengerat (Harlan), 50 mmol/L natrium sitrat (enzyme grade; Fisher) pH 4,5, Streptozotocin (STZ; Sigma), 10% sukrosa.

## 3.5 Prosedur dan Teknik Penelitian

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

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

1. *Umbilical cord* diambil dari tempat penyimpanan maupun langsung dari tikus, kemudian dicuci menggunakan PBS.
2. Pisahkan antara *Wharton jelly* dan pembuluh darah *umbilical cord*.
3. *Wharton jelly* diambil dan dicacah menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil.
4. Letakkan cacahan *Wharton jelly* secara merata dalam *flask* T25.
5. Tunggu sekitar 2-3 menit sampai *Wharton jelly* melekat pada dasar flask. Tambahkan 1cc sampai medium eksplan terendam.

6. Inkubasi pada suhu 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 5%,. Medium pada flask dibuang dan diganti selama tiga hari sekali dalam kurun waktu 10-15 hari.
7. Amati pertumbuhan sel menggunakan Inverted microscope.
8. 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.
9. Lakukan prosedur yang sama, hingga mencapai stem cells konfluens 80%.

### 3.5.2 Proses Persiapan Passage

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

6. Buang supernatant. Tambahkan 1 cc medium komplit pada pellet yang tersisa di dasar tabung, kemudian lakukan hitung sel.

### 3.5.3 Proses *Passage* Sel

1. Tambahkan medium komplit dengan ukuran 1 cc medium komplit / 1.500.000sel ke dalam tube sesuai jumlah hitungan sel sebelumnya.
2. Masukkan 1 cc sel dan medium dalam *flask* T25. Kultur dengan kondisi 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 5% selama 1 hari.
3. Tambahkan ke dalam flask medium komplit sebanyak 9 cc.
4. Inkubasi dengan kondisi 37°C, pH 7, O<sub>2</sub> 20% dan CO<sub>2</sub> 5% selama tiga hari.
5. Buang seluruh medium untuk kemudian masukkan medium komplit baru sebanyak jumlah medium yang dibuang, setelah itu inkubasi kembali dengan kondisi yang sama.
6. Lakukan proses serupa setiap tiga hari sekali hingga sel konfluen 80% dalam *flask*.
7. Pindahkan ke *flask* yang baru setiap 80% sel konfluen dan hitung tiap fase perpindahan sebagai *passage* I, II, dan seterusnya
8. Proses kultur dilakukan hingga *passage* ke IV-VI.

### 3.5.4 Proses Validasi Sel

1. Lakukan prosedur flowsitometri untuk pembacaan marker dari stem cells CD90, CD105, CD34, CD73 dengan populasi  $\geq 95\%$ .

2. 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

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

### 3.5.6 Proses Penghitungan Sel

1. Masukkan 10 $\mu$ l sel lalu ke dalam cryotube.

2. Masukkan 90µl triptofan blue ke dalam cryotube.
3. Pipetkan 10µl dari campuran dari cryotube ke bilik hitung yang ditutup deck glass.
4. Amati menggunakan *inverted microscope*, hitung pada 4 bilik hitung. Hitung menggunakan rumus perhitungan jumlah sel:
 
$$\frac{\sum n}{4} \times 10^4 \times \text{Pengenceran}$$
5. Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom
6. Siapkan chamber.
7. Masukkan MSC yang sudah ada dalam well ke dalam chamber.
8. Siapkan *Oxygen meter* di dalam chamber.
9. Tutup dan pastikan chamber tertutup rapat.
10. Alirkan chamber dengan CO<sub>2</sub> melalui selang.
11. Amati *oxygen meter* hingga oksigen dalam chamber mencapai kadar O<sub>2</sub> 5%.
12. Inkubasi selama 24 jam.
13. Awasi *oxygen meter* chamber secara berkala untuk memastikan kadar oksigen tetap dalam kadar 5%.
14. Pengambilan sekretom dilakukan menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) sehingga mendapatkan *secretome MSC* dengan ukuran 10-50kDa

### 3.5.7 Pembuatan Tikus Model DM Tipe 1

1. Sekitar 5 hari sebelum percobaan dimulai, kandang dua sampai lima tikus jantan pada suhu 24 C° ± 1°C dan kelembaban 55% ±

5%, dengan siklus terang-gelap selama 12 jam (cahaya pada jam 8 : 00 dan mati pada pukul 20:00) Beri tikus akses menuju makanan dan air secara bebas.

2. Timbang semua tikus secara akurat sampai 1 g. Sebar hewan secara acak menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. (Jumlah tikus harus sama untuk setiap kelompok)
3. Pada percobaan hari 1, puasakan semua tikus selama 6 sampai 8 jam sebelum perlakuan STZ. Berikan minum seperti biasa.
4. Siapkan buffer natrium sitrat 50 mM (pH 4,5). Tempatkan 1 ml buffer ke dalam masing-masing tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tutup tabung dengan aluminium foil.
5. 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.
6. Menggunakan spuit 3-ml dan jarum 23-G, injeksi larutan STZ secara intraperitoneal pada 65 mg / kg untuk kelompok perlakuan. Masukkan buffer sitrat dengan volume yang sama (pH 4,5) secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol.
7. Kembalikan tikus ke kandangnya. Berikan makanan seperti biasa dan air sukrosa 10%.
8. Pada hari percobaan ke-2, ganti air sukrosa 10% menjadi air biasa



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 DMT1 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.

9. 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.
10. 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 (lihat Parameter Kritis dan Pemecahan Masalah)

11. 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 kontrol.

### **3.5.8 Perlakuan pada Hewan Coba**

Kelompok perlakuan dibagi menjadi empat kelompok :

1. Kelompok Sham : Tikus sehat diinjeksi NaCl
2. Kelompok Kontrol : Tikus model DM tanpa perlakuan yang diinjeksi NaCl
3. Kelompok P1 : Tikus model DM dengan injeksi sekretom Hypoxia-MSC 0,25 cc
4. Kelompok P2 : Tikus model DM dengan injeksi sekretom Hypoxia-MSC 0,5 cc

### **3.5.9 Analisis Kadar IL-17 Menggunakan ELISA**

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

Ditetapkan standar, sampel uji (diencerkan setidaknya 1/2 dengan *Sample Dilution Buffer* ), sumuran kontrol (*blank*) masing-masing pada *plate* yang telah dilapisi antibodi sebelumnya, dan kemudian, catat posisinya. Cuci *plate* 2 kali sebelum menambahkan sumuran standar, sampel dan kontrol (*blank*). Siapkan 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

1. Tambahkan 100ul sampel yang diencerkan dengan benar ke dalam sumuran sampel uji.
2. Tutup *plate* dengan penutup dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
3. Penutup dilepas dan dibuang isi *plate-nya*, kemudian cuci *plate* 2 kali dengan *Wash Buffer*. Jangan biarkan sumuran mengering sepenuhnya.
4. Tambahkan larutan antibodi berlabel biotin 100ul ke dalam sumuran di atas (standar, sampel uji, dan sumur kosong). Tambahkan larutan di bagian bawah setiap sumuran tanpa menyentuh dinding samping, tutup *plate* dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
5. Lepas penutup, dan cuci *plate* 3 kali dengan *Wash Buffer*, dan biarkan *Wash Buffer* tetap berada di dalam sumuran selama 1-2 menit.

6. Tambahkan 100µl larutan SABC ke dalam setiap sumur, tutup *plate* dan inkubasi pada suhu 37 ° C selama 30 menit.
7. Lepaskan penutup dan cuci 5 kali dengan *Wash Buffer*, kemudian biarkan *Wash Buffer* tetap di dalam sumuran selama 1-2 menit.
8. Tambahkan 90 µl substrat TMB ke masing-masing sumuran, tutup *plate* dan inkubasi 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. Hentikan reaksi ketika gradien yang tampak muncul di sumur standar)
9. Tambahkan 50µl *Stop Solution* ke setiap sumur. Warnanya akan langsung menguning. Urutan penambahan *Stop Solution* harus sama dengan larutan substrat TMB.
10. Baca O.D. absorbansi pada 450nm di *Microplate Reader* segera setelah menambahkan *Stop Solution*.

### **3.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **3.6.1 Tempat Penelitian**

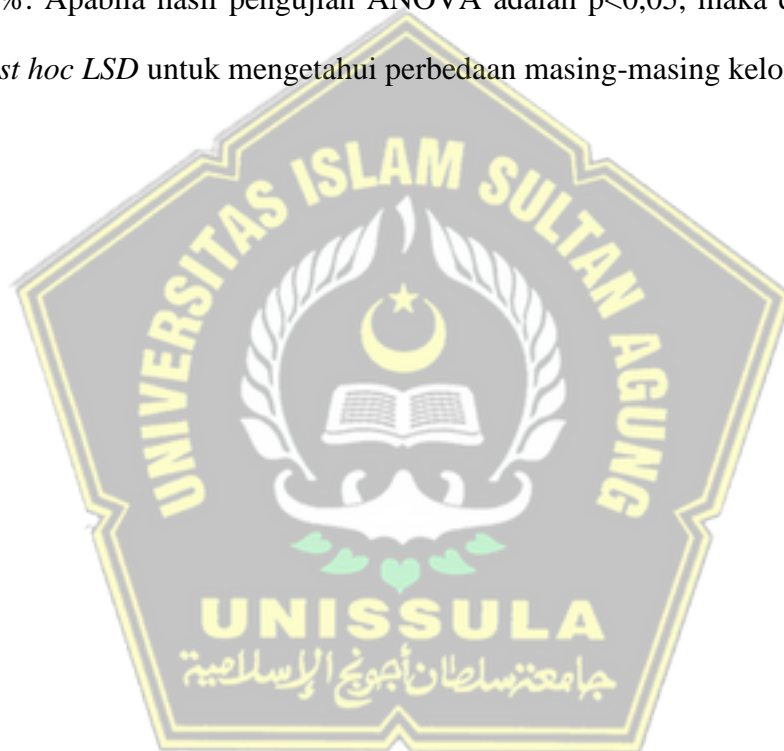
Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang.

#### **3.6.2 Waktu Penelitian**

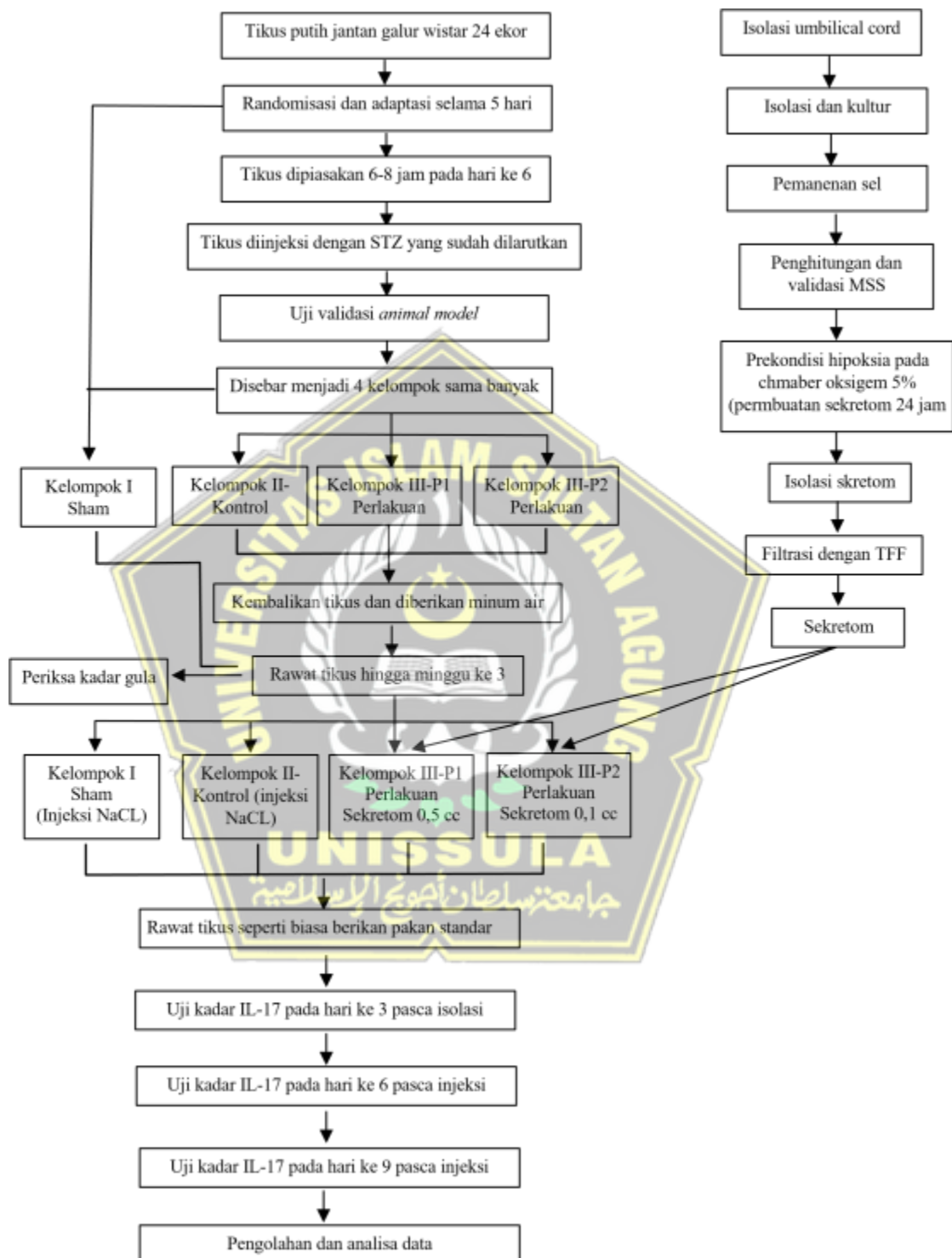
Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2022.

### 3.7 Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian diproses dan diolah untuk dilakukan uji deskriptif menggunakan mean, median, dan modus. Setelah itu dilakukan uji distribusi dan homogenitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Leuvene Statistic*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan pengujian *one-way ANOVA* pada tingkat kemaknaan 95%. Apabila hasil pengujian ANOVA adalah  $p < 0,05$ , maka dilanjutkan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.



### 3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur Penelitian

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

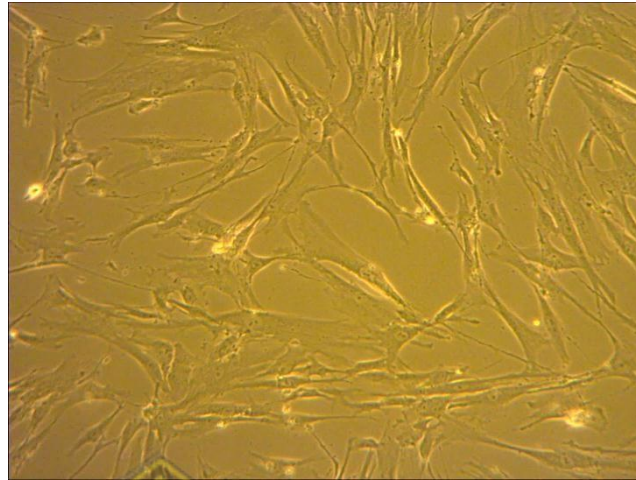
Penelitian mengenai pengaruh pemberian sekretom *hypoxia mesenchymal stem cell* terhadap kadar IL-17 tikus model DM tipe 1 dilaksanakan di Laboratorium *Stem Cell & Cancer Research (SCCR)* FK Unissula Semarang yang berlangsung selama 30 hari. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only control group design* menggunakan tikus sebagai hewan coba. Hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk pembahasan, data deskriptif untuk nilai variable penelitian dan data analisis untuk hasil akhir.

##### 4.1.1. Uji Validasi MSC

Karakteristik MSC ditentukan oleh International Society for Cell and Gene Therapy comete. MSC harus memiliki kemampuan melekat di permukaan plastik dan secara *in vitro* dapat berdiferensiasi menjadi adiposity, chondrosyte dan osteoblast (Viswanathan et al., 2019).

##### 4.1.1.1. Morfologi *Stem Cell*

Sel Mesenchymal *Stem Cell* yang dibiakan dalam medium DMEM kemudian diamati menggunakan mikroskop inerveter.



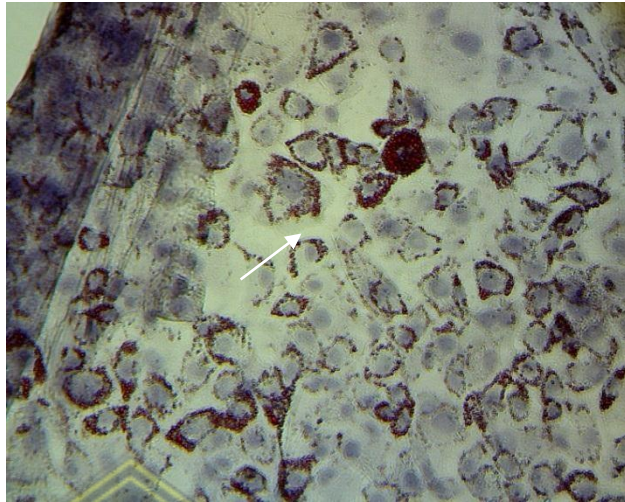
Gambar 4.1. Uji validasi MSCs: Perbesaran 200x

Terlihat gambaran MSCs yang menyerupai fibroblast dan melekat pada permukaan plastik dengan konfluensi 80%.

#### 4.1.1.2. Uji diferensiasi adipogenik

Kemampuan diferensiasi adipogenik menjadi kriteria identifikasi MSC. Sel Mesenchymal *Stem Cell* yang dibiakkan dalam medium induksi adipogenik dan diinkubasi selama 20 hari kemudian diamati menggunakan mikroskop inverter. Sel yang menyerupai mesenkim akan melekat tumbuh sebagai sel berbentuk bintang dan berkembang menjadi sel fibroblastoid multi-polar. Bentuknya berubah menyerupai adiposity setelah dilakukan induksi diferensiasi adipogenik.



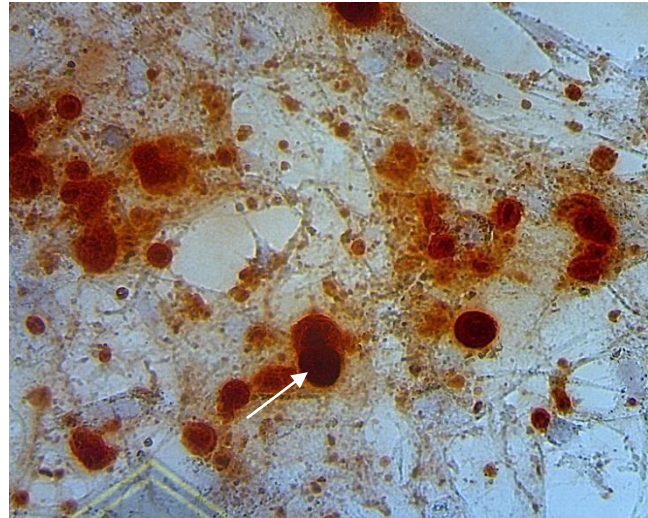


Gambar 4.2. Uji validasi MSCs diferensiasi adipogenik: Perbesaran 200x.

Dengan diberi pewarnaan *Oil Red O* maka akan tampak gambaran MSCs yang berdiferensiasi adipogenik pada anak panah yang menunjukkan terdapat sel berisi akumulasi droplet lipid.

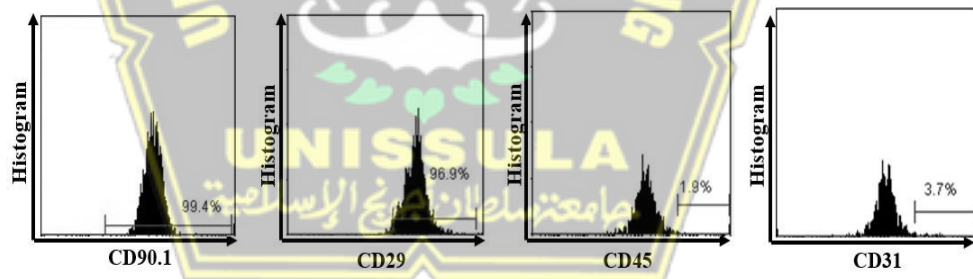
#### 4.1.1.3. Uji diferensiasi osteogenic

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



**Gambar 4.3.** Uji validasi MSCs diferensiasi osteogenik: Perbesaran 200x.

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



**Gambar 4.4.** Deteksi marker CD90.1, CD29, CD45, dan CD31 menggunakan *flowcytometry*.

Validitas MSC menunjukkan nilai positif pada CD90.1 dan CD29, sedangkan nilai negatif pada CD45 dan CD31. Didapatkan hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi CD90.1 99.4% dan CD 29 96,9%.

#### 4.1.2. Kadar IL-17

Data kadar IL-17 dalam darah dianalisis normalitasnya dengan uji Saphiro-Wilk, serta diuji homogenitasnya menggunakan uji Levene Statistic. Hasil dari uji normalitas dan uji homogenitas pada data didapatkan  $p > 0,05$  pada seluruh data kadar IL-17 dalam darah, maka dapat disimpulkan bahwa data normal dan homogen, sehingga uji perbandingan yang digunakan adalah uji One Way ANOVA karena lebih dari dua kelompok.

**Tabel 4.1. Deskripsi Kadar IL-17 dalam Darah Tiap Minggu**

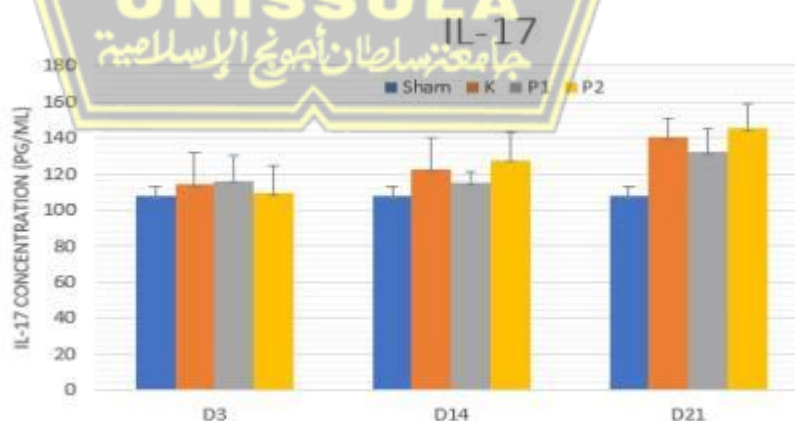
Kelompok	D3	D14	D21
Sham	103,55±5,60	107,23±11,10	107,62±7,24
Kontrol	125,65±5,56	127,79±11,05	140,20±9,73
Perlakuan 1	112,27±6,85	115,18±5,65	120,42±8,35
Perlakuan 2	105,49±8,79	106,46±6,73	114,41±11,25

**Keterangan :**

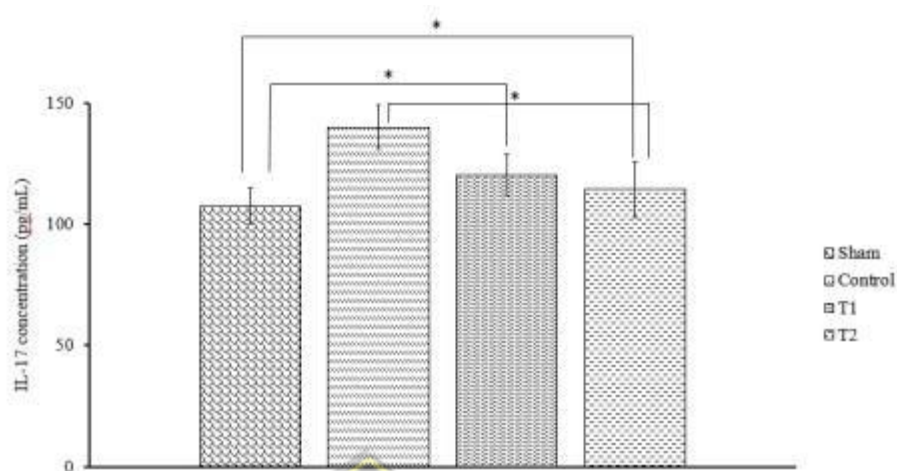
D3 : Hari Ke-1

D14 : Hari ke-14

D21 : Hari ke-21



**Gambar 4.5.** Kadar IL-17 darah pada kelompok Sham: subyek sehat tanpa perlakuan, K: subyek induksi DM tanpa perlakuan, Keterangan: P1: subyek induksi DM dengan perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC 0,5 cc, P2: subyek induksi DM dengan perlakuan injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC 1 cc. (*Post-Hoc* Sig. < 0,05)



**Gambar 4.6.** Efek injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC pada konsentrasi IL-17.

Data uji ANOVA memperlihatkan bahwa adanya perbedaan kadar IL-17 serum yang signifikan diantara semua kelompok ( $p < 0,05$ ) sejak Hari ke-3 hingga Hari ke-21. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pada perlakuan 1 dan perlakuan 2 terdapat penurunan kadar IL-17 serum sejak Hari ke-14 hingga Hari ke-21 dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ ). Sedangkan kelompok perlakuan 1 dan 2 secara statistic tidak terdapat perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok sham dan kedua kelompok perlakuan ( $p > 0,05$ ).

Kadar IL-17 serum tikus tiga minggu pengukuran (Hari-7, Hari14 dan Hari-21) pada kelompok sham, kontrol, P1 dan P2 setelah perlakuan dari hasil analisis *Post-Hoc* menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ( $P < 0,05$ ). Kelompok P1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol pada tiga minggu berurutan ( $P = 0,000; 0,000; 0,000$ ), kelompok P2 juga menunjukkan hasil yang

lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol pada tiga minggu berurutan ( $P=0,006;0,002;0,000$ ).

## 4.2 Pembahasan

Penelitian ini diawali dengan pembuatan model tikus DM tipe 1 yang diinduksi oleh STZ dan dipelihara hingga 21 hari, selanjutnya diberikan perlakuan selama 21 hari dan pada awal minggu dilakukan pengambilan data IL-17 serum darah tikus. Terdapat empat kelompok penelitian yang terdiri dari kelompok sham berupa tikus sehat tanpa perlakuan atau induksi, kelompok kontrol yaitu tikus model diabetes tanpa perlakuan, kelompok perlakuan satu merupakan tikus model diabetes dengan perlakuan injeksi 0,5 ml sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*, dan kelompok perlakuan dua adalah tikus model diabetes dengan perlakuan injeksi 1 ml sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*.

Sekretom hipoksia dapat ditemukan dengan memfiltrasi molekul hasil sekresi MSC yang telah mengalami hipoksia. MSC yang dapat digunakan yaitu yang telah tervalidasi dengan melihat kemampuan dalam melakukan diferensiasi menjadi kondrosit, adiposit, atau osteosit dan ekspresi *Cluster of Differentiation* (CD) dari CD90, CD105, CD34, CD73 dengan jumlah total >95% dari populasi. MSC yang telah divalidasi kemudian dilanjutkan dengan proses hipoksia selama 24 jam dan diambil sekretnya dengan *tangential flow filtration* (TFF).

DM tipe 1 adalah kelainan autoimun yang melibatkan berbagai faktor dan sel imun dalam tubuh terhadap beberapa auto antigen sel islet yang

akhirnya mengarah pada penghancuran sel  $\beta$  pankreas dan kemudian bergiliran terjadi defisiensi insulin yang parah (Sutrisman et al., 2022). Kerusakan sel  $\beta$  pankreas kronis pada DM tipe 1 dihasilkan dari sel-T yang menyerang sel-sel penghasil insulin yang mengarah ke ekspresi sitokin proinflamasi yang tinggi, termasuk IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-1 $\beta$ , dan dikendalikan oleh aktivitas sitokin antiinflamasi. Mediator inflamasi yang diduga berperan dalam inflamasi sel pankreas adalah aksi sinergis dari IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-1 $\beta$  (Qiu et al., 2012; Swinkels et al., 2018; Urbán et al., 2008). Oleh karena itu, agen antiinflamasi seperti IL-10, TGF $\beta$ 1, dan IL-35 diperlukan untuk mencegah perkembangan proses inflamasi (Al-Azzawi et al., 2020).

Variabel yang diteliti pada penelitian ini adalah konsentrasi IL-17 setelah dilakukan injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC pada tikus DM tipe 1. Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa pemberian IP sekretom *Hypoxia* MSC dengan konsentrasi rendah (0.05%) sudah dapat meningkatkan konsentrasi IL-17 dalam serum darah tikus DM tipe 1. Hasil data penelitian kelompok T1 dan T2 terlihat adanya peningkatan kadar IL-17 yang signifikan dibandingkan dengan kelompok sham. Pada hasil penelitian kelompok kontrol dengan DMT1 diinduksi STZ 4 mg/minggu terlihat hasil yang sangat signifikan dibandingkan dengan semua kelompok yaitu kelompok sham, P1 dan P2. Pemberian injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC terhadap tikus DM tipe 1 pada kelompok T1 dengan dosis 0,5 cc menunjukkan hasil lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok T2 dengan dosis 1 cc. Hal ini

menunjukkan bahwa injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC terhadap tikus DM tipe 1 lebih efektif pada dosis rendah.

Secretome of Hypoxia MSC (S-HMSC), diperoleh sesuai dengan kultur hipoksia MSC yang dimodifikasi, mengandung konsentrasi sitokin dan faktor pertumbuhan yang relatif tinggi (Jeon et al., 2018). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa hipoksia sedang bersyarat dari sel punca sumsum tulang mesenkim (BM-MCS) yang dibiakkan dengan oksigen 2% meningkatkan pelepasan faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), Interleukin 6 (IL-6), dan Interleukin 8 (IL -8) (Bartaula-Brevik, 2017; Lotfinia et al., 2017). Penelitian lain mengungkapkan bahwa vesikel ekstraseluler (EV) turunan MSC secara signifikan mengurangi produksi IFN- $\gamma$ , IL-12, dan TNF- $\alpha$ , menunjukkan bahwa vesikel ekstraseluler turunan MSC EV turunan MSC menekan sitokin yang diproduksi oleh pengembangan Th1. Selain itu, EV yang diturunkan dari MSC secara signifikan menekan produksi IL-6, sitokin kunci untuk komitmen garis keturunan sel Th17 penghasil IL-17 yang patogen (AlAzzawi et al., 2020).

Salah satu strategi untuk mengobati DM tipe 1 diperlukan adanya penggunaan sitokin spesifik, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang mungkin memodulasi lingkungan mikro inflamasi. Studi sebelumnya mengungkapkan bahwa terapi MSC-CM menyebabkan penurunan glukosa darah yang signifikan, dan rekonstruksi pulau pankreas pada tikus DM tipe 1 dan tipe 2 (Gvazava et al., 2018). Kapasitas regenerasi MSC-CM atau SHMSC mungkin berhubungan dengan sifat anti-inflamasinya. MSC menghasilkan sitokin

antiinflamasi yang kuat dan faktor trofik yang memodulasi lingkungan mikro inflamasi dan mencegah respons inflamasi yang berkepanjangan (Masyithah Darlan et al., 2020; Putra et al., 2018). Beberapa penelitian juga melaporkan bahwa mediator larut yang disekresikan oleh MSC, terutama sitokin antiinflamasi seperti IL-10, IL-4, dan TGF- $\beta$ 1, dapat menurunkan kondisi inflamasi kronis dengan menghambat Th1 dan Th17 serta meningkatkan aktivasi Th2 dan Treg. Kasus lain menunjukkan bahwa pemberian MSC-CM dapat menurunkan jumlah sitokin inflamasi seperti IL-17 dan IFN- $\gamma$ .4. Studi saat ini lebih lanjut menunjukkan bahwa S-HMSC dapat memberikan efek perlindungan dan imunomodulator pada tikus DM tipe 1 (English, 2013; Hamra et al., 2021; Zufferey et al., 2017).

Pemberian injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC dapat mengatur konsentrasi IL-17 pada tikus DM Tipe 1. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin turun konsentrasi IL-17 yang dihasilkan oleh tikus DM, sehingga dengan pemberian injeksi IP sekretom *Hypoxia* MSC terhadap tikus DM tipe 1 menurunkan jumlah sitokin inflamasi.

#### 4.2.1. Beda Penelitian terdahulu

Diketahui pada penelitian sebelumnya terdapat penelitian tentang terapi injeksi sekretom melalui intraperitoneal pada tikus yang diinduksi STZ, dari penelitian tersebut dapat diketahui bahwa terapi injeksi sekretom intraperitoneal menurunkan kadar IL-17 serum secara signifikan ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol. (Hashemi, Hassan, Hossein-Khannazer, Pourfathollah, & Soudi, 2020)



#### 4.2.2. Keterbatasan Penelitian

4.2.2.1. Penelitian ini belum memiliki kelompok yang lengkap sebagai pembanding terapi yang telah dilakukan. Hasilnya akan menjadi lebih baik jika terdapat kelompok sekretom normoksia sebagai pembandingnya.

4.2.2.2. Penelitian dengan model terapi sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* pada tikus model diabetes tipe 1 dengan parameter kadar IL-17 belum pernah dilakukan pada penelitian-penelitian sebelumnya, sehingga belum ada literatur yang bisa dijadikan pembanding yang tepat pada penelitian ini.

4.2.2.3. Penelitian ini kurang mengevaluasi beberapa sitokin marker inflamasi dan non inflamasi pada kondisi DM tipe 1.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

- 5.1.1. Terdapat pengaruh sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 0,5 cc terhadap kadar IL-17 pada model tikus DM tipe 1 berupa penurunan kadar IL-17.
- 5.1.2. Terdapat pengaruh sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 1 cc terhadap kadar IL-17 pada model tikus DM tipe 1 berupa penurunan IL-17.
- 5.1.3. Penurunan kadar IL-17 paling tinggi dihasilkan dengan terapi sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 1 cc.

#### 5.2. Saran

Terdapat kekurangan pada penelitian ini yang dapat menjadi saran dalam melakukan penelitian selanjutnya yaitu:

- 5.2.1. Penambahan kelompok terapi sekretom normoksia sebagai pembanding sekretom hipoksia.
- 5.2.2. Penambahan waktu penelitian untuk mengetahui apakah dalam terapi ini akan terjadi peningkatan atau penurunan kadar IL-17 dalam jangka waktu tertentu.
- 5.2.3. Penambahan evaluasi dan pembahasan beberapa sitokin marker inflamasi dan non inflamasi pada kondisi DM tipe 1.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aghazadeh, Y., & Nostro, M. C. (2017). Cell Therapy for Type 1 DM: Current and Future Strategies. *Current DM Reports*, 17(6). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0863-6>
- Ahangar, P., & Mills, S. J. (2020). *Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair*.
- Al-Azzawi, B., McGuigan, D. H., Koivula, F. N. M., Elttayef, A., Dale, T. P., Yang, Y., Kelly, C., & Forsyth, N. R. (2020). The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. *The Open Stem Cell Journal*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.2174/1876893802006010001>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., & Khoury, M. (2017). Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: Current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00339>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Martin, A., Contreras, L., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2015). Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 199. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0192-0>
- Association, A. D. (2014). Diagnosis and classification of DM . *DM Care*, 37(SUPPL.1), 81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Bai, M., Zhang, L., Fu, B., Bai, J., Zhang, Y., Cai, G., Bai, X., Feng, Z., Sun, S., & Chen, X. (2018). IL-17A improves the efficacy of mesenchymal stem cells in ischemic-reperfusion renal injury by increasing Treg percentages by the COX-2/PGE2 pathway. *Kidney International*, 93(4), 814–825. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.08.030>
- Bartaula-Brevik, S. (2017). Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *International Journal of Stem Cell Research and Therapy*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.23937/2469-570x/1410045>
- Benavides-Castellanos, M. P., Garzón-Orjuela, N., & Linero, I. (2020). Effectiveness of mesenchymal stem cell-conditioned medium in bone regeneration in animal and human models: a systematic review and metaanalysis. *Cell Regeneration*, 9(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13619-02000047-3>

- Berebichez-Fridman, R., Gómez-García, R., Granados-Montiel, J., BerebichezFastlicht, E., Olivos-Meza, A., Granados, J., Velasquillo, C., & Ibarra, C. (2017). The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells - Their Current Uses and Potential Applications. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2638305> 53
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98–103. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Care, D., & Suppl, S. S. (2021). 2. Classification and Diagnosis of DM: Standards of Medical Care in DM d 2021. 44(January), 15–33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- Chen, P. S., Chiu, W. T., Hsu, P. L., Lin, S. C., Peng, I. C., Wang, C. Y., & Tsai, S. J. (2020). Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12929020-00658-7>
- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- DM, D. O. F. (2010). Diagnosis and classification of DM . *DM Care*, 33(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/dc10-S062> *Diagnosis / ADA*. (n.d.).
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Egan, A. M. (2018). *What is DM? Key points*. 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.002>
- Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>

- English, K. (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and Cell Biology*, 91(1), 19–26. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.56>
- Fabian, Z. (2019). The Signaling Nature of Cellular Metabolism: The Hypoxia Signaling. In *Cell Signalling - Thermodynamics and Molecular Control*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79952>
- Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. (2018). Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
- Freeman. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1117/12.2549369.Hyperspectral>
- Giwa, A. M., Ahmed, R., Omidian, Z., Majety, N., Karakus, K. E., Omer, S. M., Donner, T., & Hamad, A. R. A. (2020). Current understandings of the pathogenesis of type 1 DM: Genetics to environment. *World Journal of DM*, 11(1), 13–25. <https://doi.org/10.4239/wjd.v11.i1.13>
- González-González, A., García-Sánchez, D., Dotta, M., Rodríguez-Rey, J. C., & Pérez-Campo, F. M. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 12(12), 1439–1690. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>
- Gupta, N., Krasnodembskaya, A., Kapetanaki, M., Mouded, M., Tan, X., Serikov, V., & Matthay, M. A. (2012). Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine *Escherichia coli* pneumonia. *Thorax*, 67(6), 533–539. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201176>
- Gvazava, I. G., Rogovaya, O. S., Borisov, M. A., Vorotelyak, E. A., & Vasiliev, A. V. (2018). Pathogenesis of type 1 DM and rodent experimental models. *Acta Naturae*, 10(1), 24–33. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-1-24-33>
- Hamra, N. F., Putra, A., Tjipta, A., Amalina, N. D., & Nasihun, T. (2021). Hypoxia mesenchymal stem cells accelerate wound closure improvement by controlling  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in the full-thickness animal model. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9, 35–41. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.5537>
- 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>

- Husein, R., DepkesRI, Soelistijo, S. A., Novida, H., Rudijanto, A., BPJS, Of, S., CareDM, M., Ceriello A, Gavin JR, Boulton AJM, Blickstead R, McGill M,
- R.I., M. ΘΕΟΔΩΡΟΥ, M. M., Kemenkes, Al-Arouj, M., Ben-Nakhi, A., Hasasanein, M., Clinical Guidelines Task Force, WHO, Hidayat, B.,
- Soewondo, P., Ferrario, A., ... Malanda, B. (2016). Consultation Notes to the MoH Indonesia. In *Department for Management of NCD, Disability, Violence and Injury Prevention* (Vol. 138, Issue 9). MDText.com, Inc.
- Jeon, S. H., Zhu, G. Q., Bae, W. J., Choi, S. W., Jeong, H. C., Cho, H. J., Ha, U. S., Hong, S. H., Lee, J. Y., Kwon, E. B., Kim, H. J., Lee, S. M., Kim, H. Y., & Kim, S. W. (2018). Engineered mesenchymal stem cells expressing stromal cell-derived factor-1 improve erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms19123730>
- Kahanovitz, L., Sluss, P. M., & Russell, S. J. (2017). Type 1 DM-a clinical perspective. *Point of Care*, *16*(1), 37–40. <https://doi.org/10.1097/POC.0000000000000125>
- Katuchova, J., Harvanova, D., Spakova, T., Kalanin, R., Farkas, D., Durny, P., & Radonak, J. (2015). *of Type 1 DM . March*. <https://doi.org/10.1007/s12022015-9362-y>
- Lee, Y. Bin, Han, K., Kim, B., Lee, S. E., Jun, J. E., Ahn, J., Kim, G., Jin, S. M., & Kim, J. H. (2019). Risk of early mortality and cardiovascular disease in type 1 DM: a comparison with type 2 DM , a nationwide study. *Cardiovascular Diabetology*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0953-7>
- Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(5), 268–283. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y>
- Li, Y., Wang, F., Liang, H., Tang, D., Huang, M., Zhao, J., Yang, X., Liu, Y., Shu, L., Wang, J., He, Z., & Liu, Y. (2021). *Efficacy of mesenchymal stem cell transplantation therapy for type 1 and type 2 DM : a meta-analysis*. 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13287-021-02342-5>
- Lotfinia, M., Lak, S., Ghahhari, N. M., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Tabrizi, B. S., & Kadivar, M. (2017). Hypoxia pre-conditioned embryonic mesenchymal stem cell secretome reduces IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells. *Iranian Biomedical Journal*, *21*(1), 24–31. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ibj.21.1.24>

- Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). *A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods*. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>
- Malhotra, N., Narayan, K., Cho, O. H., Sylvia, K. E., Yin, C., Melichar, H., Rashighi, M., Lefebvre, V., Harris, J. E., Berg, L. J., & Kang, J. (2013). A network of high-mobility group box transcription factors programs innate interleukin-17 production. *Immunity*, 38(4), 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.010>
- Masyithah Darlan, D., Munir, D., Karmila Jusuf, N., Putra, A., Ikhsan, R., & Alif, I. (2020). In vitro regulation of IL-6 and TGF- $\beta$  by mesenchymal stem cells in systemic lupus erythematosus patients. *Medicinski Glasnik : Official Publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*, 17(2), 408–413. <https://doi.org/10.17392/1186-20>
- Paschou, S. A., Papadopoulou-marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanakagantenbein, C. (2018). *On type 1 DM pathogenesis*. 38–46.
- Pathak, V., Pathak, N. M., O'Neill, C. L., Guduric-Fuchs, J., & Medina, R. J. (2019). Therapies for Type 1 DM: Current Scenario and Future Perspectives. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and DM*, 12. <https://doi.org/10.1177/1179551419844521>
- Pavlacky, J., & Polak, J. (2020). Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. *Frontiers in Endocrinology*, 11(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00057>
- Putra, A., Ridwan, F. B., Putridewi, A. I., Kustiyah, A. R., Wirastuti, K., Sadyah, N. A. C., Rosdiana, I., & Munir, D. (2018). The role of tnf- $\alpha$  induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- $\beta$  and il-10. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(10), 1779–1783. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.404>
- Qiu, X., Sun, C., Yu, W., Lin, H., Sun, Z., Chen, Y., Wang, R., & Dai, Y. (2012). Combined strategy of mesenchymal stem cell injection with vascular endothelial growth factor gene therapy for the treatment of DM-associated erectile dysfunction. *Journal of Andrology*, 33(1), 37–44. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012666>
- Quianzon, C. C., & Cheikh, I. (2012). *History of insulin*. 1(6), 1–3. <https://doi.org/10.3402/jchimp.v2i2.18701>

- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(November 2015), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Sapra, A., & Bhandari, P. (2021). DM . In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Sawyer, L. M., Malottki, K., Sabry-Grant, C., Yasmeen, N., Wright, E., Sohr, A., Borg, E., & Warren, R. B. (2019). Assessing the relative efficacy of interleukin-17 and interleukin-23 targeted treatments for moderate-to-severe plaque psoriasis: A systematic review and network meta-analysis of PASI response. In *PLoS ONE* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220868>
- Secret, A. M., Washington, R. E., & Orchard, T. J. (2014). Chapter 35: Mortality in Type 1 DM. *DM in America*, 1–16.
- Sen, B., Paradise, C. R., Xie, Z., Sankaran, J., Uzer, G., Styner, M., Meyer, M., Dudakovic, A., van Wijnen, A. J., & Rubin, J. (2020).  $\beta$ -Catenin Preserves the Stem State of Murine Bone Marrow Stromal Cells Through Activation of EZH2. *Journal of Bone and Mineral Research*, 35(6), 1149–1162. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3975>
- Shabgah, A. G., Fattahi, E., & Shahneh, F. Z. (2014). Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 31(4), 256–261. <https://doi.org/10.5114/pdia.2014.40954>
- Sivanathan, K. N., Rojas-Canales, D., Grey, S. T., Gronthos, S., & Coates, P. T. (2017). Transcriptome Profiling of IL-17A Preactivated MSC A Comparative Study to Unmodified and IFN- $\gamma$  Modified MSC. *Hindawi*, 2017.
- Sparber, F., & Leibundgut-Landmann, S. (2019). Interleukin-17 in antifungal immunity. *Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens8020054>
- Speight, J., & Pouwer, F. (2019). DM , type 1. In *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine: Third Edition* (pp. 477–480). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1016/b978-3-437-42502-8.00153-4>
- Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., & Altaner, C. (2014). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(3), 373–377. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>



- Sung, D. K., Chang, Y. S., Sung, S. I., Yoo, H. S., Ahn, S. Y., & Park, W. S. (2016). Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signalling. *Cellular Microbiology*, *18*(3), 424–436. <https://doi.org/10.1111/cmi.12522>
- Sutrisman, I. P., Antari, A. D., Putra, A., Chandra, R., Irawan, S., & Handoyo, F. E. (2022). Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells Regulate IL-10 Concentrations in STZ-induced Type 1 DM Rats. *International Journal of Cell and Biomedical Science*, *1*(2), 56–64.
- Sutton, M. T., Fletcher, D., Ghosh, S. K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., Sadeghi, Z., Hijaz, A., Reese, J., Lazarus, H. M., Lennon, D. P., Caplan, A. I., & Bonfield, T. L. (2016). Antimicrobial Properties of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment. *Stem Cells International*, *2016*, 5303048. <https://doi.org/10.1155/2016/5303048>
- Swinkels, M., Rijkers, M., Voorberg, J., Vidarsson, G., Leebeek, F. W. G., & Jansen, A. J. G. (2018). Emerging concepts in immune thrombocytopenia. *Frontiers in Immunology*, *9*(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00880>
- 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>
- Urbán, V. S., Kiss, J., Kovács, J., Góczy, E., Vas, V., Monostori, É., & Uher, F. (2008). Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of DM. *Stem Cells*, *26*(1), 244–253. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0267>
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
- Wada, N., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2013). Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontology* *2000*, *63*(1), 198–216. <https://doi.org/10.1111/prd.12024>
- Waseem, M., Khan, I., Iqbal, H., Ejaz, S., Usman, S., Ahmed, N., Alam, G., & Salim, A. (2016). Hypoxic Preconditioning Improves the Therapeutic Potential of Aging Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Streptozotocin-Induced Type-1 Diabetic Mice. *Cellular Reprogramming*, *18*(5), 344–355. <https://doi.org/10.1089/cell.2016.0002>

- Wibisono, Wahyu., Tjahjono, Harjoedi A., Wijayanto, E., (2016). Hubungan Kadar 25-Hidroksi-Vitamin D dengan HbA1c Melalui Interleukin-17 pada Anak Diabetes Melitus Tipe 1. *Sari Pediatri*, Vol. 17, No. 6 :469-77.
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 DM in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *DM, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 8, 181–188. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S82272>
- Yang, J. (2014). Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 121). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800101-1.00005-3>
- Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2016). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. In *Journal of Cellular Immunotherapy* (Vol. 2, Issue 1, pp. 3–20). Shanghai Hengrun Biomedical Technology Research Institute. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
- Zufferey, A., Kapur, R., & Semple, J. W. (2017). Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP). *Journal of Clinical Medicine*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/jcm6020016>

