

**PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL*
STEM CELLS (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α
Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Tipe 1
diinduksi dengan Streptozotocin**

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Nazzala Luthfin Amellia

30101900141

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG

2023

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL*
STEM CELLS (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α
Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Tipe 1
diinduksi dengan Streptozotocin**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

Nazzala Luthfin Amellia

30101900141

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 18 Agustus 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



dr. Arini Dewi Antari, M. Biomed

Anggota Tim Penguji



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

Pembimbing II



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



Dr. dr. Minidian Fasitasari, M. Sc. Sp. GK (K)

Semarang, 21 Agustus 2023

Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
Dekan,



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

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini saya:

Nama : Nazzala Luthfin Amellia

NIM : 30101900141

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

“PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α

Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 diinduksi dengan Streptozotocin”

adalah hasil karya skripsi saya dan dengan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi. Apabila saya terbukti melakukan plagiasi, saya siap menerima sanksi yang berlaku.

Semarang, 21 Agustus 2023

Yang menyatakan,



Nazzala Luthfin Amellia

PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah Penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan tugas skripsi dengan Judul “PENGARUH PEMBERIAN *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α (Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 diinduksi dengan Streptozotocin)” sebagai syarat kelulusan pada Studi Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Sholawat serta Salam tak lupa Penulis haturkan kepada Nabi besar junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang kita nanti syafa’atnya kelak.

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih sebesar besarnya kepada berbagai pihak yang sudah membantu, memberikan bimbingan, dorongan motivasi, nasehat sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan baik. Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada:

1. Kedua Orang Tua penulis tercinta Ibunda Siti Alfiah dan Ayahanda M. Mas’Arif, adik – adik saya M. Daris Husni Majid dan Firyaaal Azmi Nafiis serta keluarga yang telah memberikan dukungan sehingga skripsi ini dapat selesai.
2. Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp. KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

3. Ibu dr. Arini Dewi Antari, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing I dan Bapak Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si, Med selaku Dosen Pembimbing II penulis yang telah berkenan membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam penyusunan menyelesaikan skripsi ini.
4. Ibu dr. Azizah Retno Kustiyah, Sp.A., M. Biomed dan Dr. dr. Minidian Fasitasari, M. Sc. Sp. GK (K) selaku Dosen Penguji I & II yang telah membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Seluruh Staff Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah membantu setiap kesulitan dalam penulisan.
6. Seluruh Staff unit Skripsi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah membantu dalam skripsi ini.
7. Teman - teman tersayang, Jajaran Mahasiswa FK Unissula Angkatan 2019, Jajaran Asisten Laboratorium Patologi Anatomi Angkatan 2018 & 2019, semua sahabat dan teman – teman penulis yang akan terlalu banyak jika disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan, arahan, dukungan, petunjuk, dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

8. Semua pihak yang telah ikut membantu penulis atas terselesaikannya skripsi ini.

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

Semarang, 21 Agustus 2023

Nazzala Luthfin Amellia



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Kadar TNF- α	6
2.1.1. Pengertian	6
2.1.2. Peran dan fungsi TNF- α	7
2.1.3. Faktor yang Mempengaruhi TNF- α	10
2.2. <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>	12
2.2.1. Pengertian	12
2.2.2. Sumber.....	13
2.2.3. Peran & Fungsi MSCs	14
2.3. Diabetes Melitus Tipe 1	15
2.3.1. Pengertian	15

2.3.2. Patofisiologi.....	16
2.4. Hubungan <i>Secretome Hypoxia</i> MSCs dengan TNF- α pada DM tipe 1 ...	17
2.5. Kerangka Teori	19
2.6. Kerangka Konsep.....	20
2.7. Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian.....	21
3.2 Variabel dan Definisi Operasional.....	22
3.2.1. Variabel Penelitian	22
3.2.2. Definisi Operasional.....	22
3.3 Populasi dan Sampel.....	23
3.3.1. Populasi	23
Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi	23
3.3.3. Teknik Pengambilan Sampel.....	24
3.3.4. Besar Sampel.....	24
3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian	24
3.4.1. Instrumen.....	24
3.4.2. Bahan.....	25
3.5 Cara Penelitian	25
3.5.1 Teknik Isolasi MSCs dari <i>Umbilical Cord</i> (Muhar A.M., <i>et al.</i> , 2018).....	25
3.5.2 Proses Persiapan <i>Passage</i>	26
3.5.3 Proses <i>Passage</i> Sel	27
3.5.4 Proses Validasi Sel	28
3.5.5 Proses Pemanenan Sel	28
3.5.6 Proses Penghitungan Sel	29
3.5.7 Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom	30
3.5.8 Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1 (Muhar A.M., <i>et al.</i> , 2018).....	31
3.5.9 Perlakuan pada Hewan Coba.....	33
3.5.10 Analisis Kadar TNF- α dengan Elisa Kit	34

3.6 Alur Penelitian	37
3.7 Tempat dan Waktu Penelitian	38
3.7.1 Tempat Penelitian	38
3.7.2 Waktu Penelitian	38
3.8 Analisis Hasil	38
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Hasil Penelitian	39
4.1.1 Analisis Deskriptif	40
4.1.2 Analisis Bivariat	44
4.2. Pembahasan	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1. Kesimpulan	50
5.2. Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	57



DAFTAR SINGKATAN

AGEs	: <i>Advanced Glycation End Products</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor -1</i>
AT	: <i>Adipose Tissue</i>
Bad	: <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bax	: <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl XL	: <i>Bcl-2-associated Extra Large</i>
BM	: <i>Bone Marrow</i>
CAMs	: <i>Cell Adhesion Molecules</i>
CBA	: <i>Cytometric Bead Array</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CD4+	: <i>Cluster of Differentiation 4+</i>
CD8+	: <i>Cluster of Differentiation 8+</i>
COX2	: <i>Cyclooxygenase 2</i>
CXCR4	: <i>Chemokine C-X-C Motif Receptor 4</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
DMT1	: <i>Diabetes Melitus Tipe 1</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	: <i>The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FADD	: <i>Fas-Associated Protein with Death Domain</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
Gal-1	: <i>Galectin-1</i>
Gal-9	: <i>Galectin-9</i>
GD	: <i>Gula Darah Puasa</i>
GDS	: <i>Gula Darah Sewaktu</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HLA-DR	: <i>Human Leukocyte Antigen- DR</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
IDDM	: <i>Insulin Dependent Diabetes Melitus</i>
IBL	: <i>Integrated Biomedical Laboratory</i>
IFN- γ	: <i>Interferron-γ</i>
IGF-1	: <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-2	: <i>Interleukin -2</i>
IL-6	: <i>Interleukin -6</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-12	: <i>Interleukin-12</i>
IL-17	: <i>Interleukin-17</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1β</i>
iNOS	: <i>Induceible Nitric Oxide Synthase</i>
IRS-1	: <i>Insulin Receptor-Substrate-1</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal kinases</i>

LSD	: <i>Least Significance Difference</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activating Protein Kinase</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Ngn 3	: <i>Neurogenin-3</i>
MPTP	: <i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
NF κ B	: <i>Nuclear Factor-kb</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
OGTT	: <i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
PAP	: <i>Penyakit Arteri Perifer</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDX1	: <i>Pancreatic Duodenal Homeobox 1</i>
PGE 2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PPOK	: <i>Penyakit Paru Obstruktif Kronik</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SABC	: <i>Streptavidin Conjugate</i>
SCCR	: <i>Stem Cell and Cancer Research</i>
SH-MSCs	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
STAT 1	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription-1</i>
STAT 3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription-3</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor- β</i>
Th	: <i>T cell -Helper</i>
TIM-3	: <i>T cell Immunoglobulin Domain and Mucin Domain-3</i>
TMB	: <i>Tetramethylbenzidine</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNFR 1	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptors 1</i>
TNFR 2	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptors 2</i>
Treg	: <i>T cell regulator</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Data Konfirmasi Tikus Penelitian.....	40
Tabel 4.2. Deskriptif Data.....	42
Tabel 4.3. Hasil Uji Normalitas Kadar TNF- α	44
Tabel 4.4. Hasil Uji Homogenitas Varian Kadar TNF- α	44
Tabel 4.5. Hasil Uji <i>One Way</i> ANOVA Kadar TNF- α	45
Tabel 4.6. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD Perbandingan Rerata Kadar TNF- α antar Dua Kelompok	45



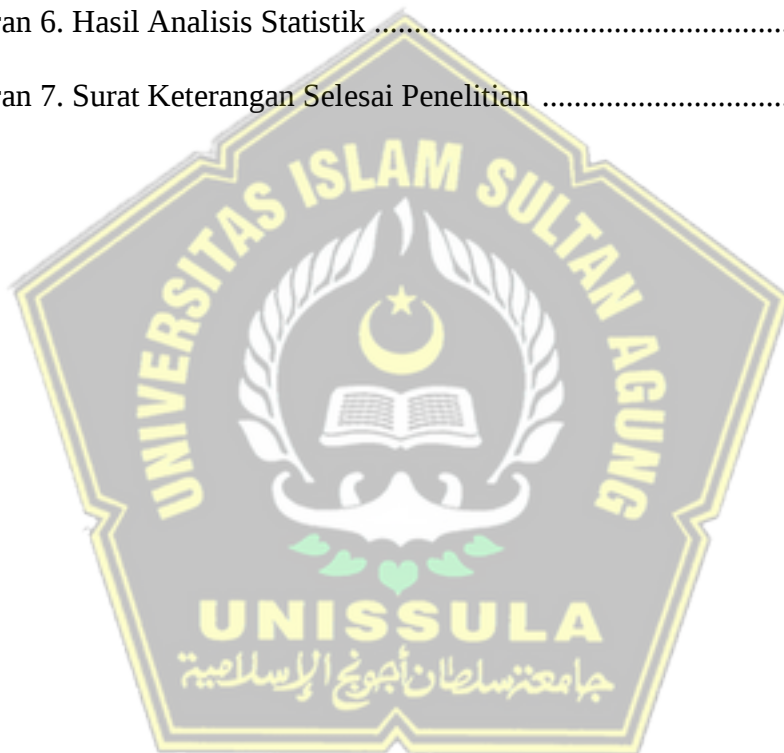
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Mekanisme Apoptosis Dalam Kondisi Hiperglikemia.....	10
Gambar 2. 5 Skema Kerangka Teori.....	19
Gambar 2.6 Skema Kerangka Konsep	20
Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian <i>Post-Test Only Group</i>	21
Gambar 3. 6 Alur Penelitian.	37
Gambar 4.1 Uji Validasi Isolasi MSCs dengan sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 200x.	41
Gambar 4.2 Uji Validasi Uji Validasi Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31.	41
Gambar 4.3 Diferensiasi MSCs	42
Gambar 4.4 Rerata Kadar TNF- α antar Kelompok.....	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Penelitian.....	57
Lampiran 2. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian	58
Lampiran 3. <i>Ethical Clearance</i>	59
Lampiran 4. Kegiatan Perawatan dan Perlakuan Hewan Coba	60
Lampiran 5. Data Penelitian	61
Lampiran 6. Hasil Analisis Statistik	61-63
Lampiran 7. Surat Keterangan Selesai Penelitian	63



INTISARI

Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT1) merupakan penyakit autoimun dimana sel T dan makrofag menyebabkan kadar $\text{TNF-}\alpha$ meningkat sehingga sel β pankreas penghasil insulin mengalami kerusakan. Kerusakan jaringan pankreas dapat menstimuli *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) memodulasi sistem imun dan memproduksi faktor pertumbuhan untuk meminimalkan inflamasi sehingga terjadi perbaikan pada insulin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Secretome Hypoxia MSCs* (SH-MSCs) terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada tikus model DMT1 yang diinduksi dengan Streptozotocin (STZ).

Penelitian eksperimental ini dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Universitas Islam Sultan Agung menggunakan desain penelitian “*posttest only control group design*”. Subjek penelitian adalah 15 ekor tikus putih jantan galur wistar model DMT1 diinduksi STZ intraperitoneal dosis 65 mg/kgBB pada hari ke-6 pemeliharaan tikus lalu dirandomisasi setelah pengujian kadar gula darah. Tikus dirandomisasi menjadi tiga kelompok: kelompok K (NaCl 0,9% 1 ml), kelompok P1 (SH-MSCs dosis 0,5 ml) dan perlakuan P2 (SH-MSCs dosis 1,0 ml). Injeksi NaCl ataupun SH-MSCs dilakukan 1 kali pada hari ke -21 dan pengambilan sampel darah melalui vena mata dilakukan pada hari ke-30 untuk memeriksa kadar $\text{TNF-}\alpha$ menggunakan ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada kelompok K adalah yang tertinggi, terendah pada kelompok P2. Perbandingan kadar $\text{TNF-}\alpha$ ketiga kelompok berbeda signifikan ($p=0,018$). Perbedaan kadar $\text{TNF-}\alpha$ antar dua kelompok ditunjukkan antara K dengan P2 ($p=0,008$), dan antara P1 dengan P2 ($p=0,021$).

Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa pemberian *Secretome Hypoxia MSCs* (SH-MSCs) berpengaruh terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada tikus model DMT1 yang diinduksi dengan STZ.

Kata kunci: MSCs, *Secretome Hypoxia*-MSCs, $\text{TNF-}\alpha$

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah penyakit metabolik kronik yang ditandai dengan kadar gula darah yang meningkat atau disebut hiperglikemia. Kondisi ini terjadi karena adanya gangguan pada sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT1) merupakan penyakit autoimun dimana sistem imun oleh sel T (CD4⁺ dan CD8⁺) dan makrofag yang menyerang sel β pankreas penghasil insulin (Afdal, A. & Rini, E. A., 2012). Makrofag dan sel T bersifat sitotoksik memproduksi beberapa sitokin, yaitu *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan *Interferon- γ* (IFN- γ) yang menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas (Burrack, A. L., et al., 2004). Kerusakan jaringan pada pankreas dapat merangsang *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) pada tubuh untuk memodulasi sistem imun dan memproduksi faktor pertumbuhan untuk mengurangi inflamasi. Saat ini, terapi insulin eksogen yang ada kurang efektif, dikarenakan mempunyai efek dapat menimbulkan hipoglikemia berat yang mengancam nyawa sehingga perlu terapi yang lebih efektif salah satunya menggunakan sekretom yang merupakan produk dari MSCs yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan (Pranowo, A. H., 2022).

Menurut *American Diabetes Association*, 2018 melaporkan didapatkan 75% kasus yang terjadi pada usia sebelum 30 tahun dan 5-10 % dari seluruh kasus DM yang ada merupakan kasus DMT1. Kasus DM di Indonesia

menurut Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) memperlihatkan peningkatan angka prevalensi yang cukup signifikan, yaitu dari 6,9% di tahun 2013 menjadi 8,5% di tahun 2018 sehingga estimasi jumlah penderita di Indonesia mencapai lebih dari 16 juta orang (Kemenkes RI, 2021). Ikatan Dokter Anak Indonesia (IDAI) pada tahun 2018 melaporkan ada 1220 anak penyandang DMT1 di Indonesia. Jumlah kematian akibat diabetes di Indonesia mencapai 236 ribu pada 2021. Pengobatan DMT1 bergantung pada insulin eksogen untuk mengontrol hiperglikemia. Namun pemberian insulin tersebut memiliki risiko tinggi menimbulkan hipoglikemia yang dapat mengancam nyawa pasien (Mathew, P. & Thoppil, D., 2021). MSCs sebagai *immunomodulator* yang dapat mengurangi aktivasi autoimun pada sel β pankreas (Ezquer, F. *et al.*, 2012).

Pada penderita DMT1, sel β pankreas adalah target serangan autoimun yang menyebabkan sebagian besar sel mengalami kematian. Kematian sel ini akan berhubungan dengan makrofag sel T dan beberapa mediator inflamasi (Cnop, M. *et al.*, 2005). Mediator inflamasi yang mengalami kenaikan adalah kadar maupun ekspresi TNF- α . Hal tersebut terjadi karena adanya proses inflamasi pada sel β pankreas. TNF- α terlibat dalam stress oksidatif inflamasi dan disfungsi endotel sehingga terjadi gangguan permeabilitas pembuluh darah dalam mengendalikan peradangan (Akhas, M. S. *et al.*, 2017). MSCs bersifat sebagai *immunomodulator* dan anti-inflamasi yang kuat yang memiliki kemampuan menghentikan produksi *self antibody* yang menyerang sel β pankreas serta merangsang produksi faktor pertumbuhan. MSCs

melepaskan IL-10, IGF-1, dan VEGF melalui mikrovesikel, yang bekerja untuk melindungi sel β pankreas dan membantu merangsang regenerasi sel islet (Pranowo, A. H., 2022). MSCs yang mengandung faktor pertumbuhan dapat meningkatkan regenerasi sel β pankreas dan dapat menekan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan. *Hypoxia* MSCs tidak hanya membantu sel punca untuk bertahan hidup di area yang cedera tetapi juga memodulasi ekspresi berbagai sitokin pelindung jaringan dan faktor pertumbuhan. Hasil histologis pada penelitian menunjukkan bahwa MSCs prakondisi hipoksia menunjukkan potensi regenerasi sel β yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan MSCs normoksik setelah transplantasi ke tikus diabetes (Waseem, M. *et al.*, 2016). Pengkondisian MSCs dalam kondisi hipoksia merangsang pengeluaran molekul larut yang mengandung lebih banyak mediator anti-inflamasi dan faktor pertumbuhan yang baik dalam regenerasi sel β pankreas. Sekretom bermanfaat dalam menurunkan ekspresi IL-17, TNF- α dan IL-1 β yang berperan pada patogenesis penyakit autoimun, seperti pada *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE) (Shiddiqi, T. *et al.*, 2017).

Pada penelitian sebelumnya, pemberian *Secretome* MSCs dengan dosis 0,45 ml intraperitoneal yang berasal dari cairan amnion manusia yang dikondisikan hipoksia 1-2 % dapat menurunkan kadar TNF- α dan ekspresi IL-17 pada mencit lupus yang diinduksi dengan pristane. *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) mengandung faktor terlarut seperti sitokin anti-inflamasi, faktor pertumbuhan dan molekul *immunomodulator*.

Molekul yang terkandung didalam SH-MSCs diharapkan dapat memperbaiki jaringan yang rusak dengan merangsang dan mendorong pembentukan jaringan baru pada sel yang rusak (Wulandari E. L. *et al.*, 2022).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian pengaruh *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap kadar TNF- α pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 diinduksi dengan Streptozotocin.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap kadar TNF- α pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 yang diinduksi dengan Streptozotocin?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap kadar TNF- α pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 yang diinduksi dengan Streptozotocin.

1.3.2. Tujuan Khusus

Untuk membuktikan pengaruh injeksi *Secretome Hypoxia MSCs* (SH-MSCs) dosis 0,5 ml dan 1,0 ml terhadap kadar TNF- α antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan kontribusi terhadap penelitian kesehatan terkait penggunaan *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs)* terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 yang diinduksi dengan Streptozotocin.

1.4.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi baru kepada masyarakat mengenai penggunaan *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs)* pada hewan coba dengan Diabetes Melitus Tipe 1.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kadar TNF- α

2.1.1. Pengertian

TNF- α merupakan sitokin yang memiliki peran dalam respon inflamasi dan terlibat dalam beberapa penyakit dengan mekanisme inflamasi (baik infeksi maupun autoimun). Sumber utama TNF- α adalah makrofag teraktivasi dan limfosit T (Jang, D. *et al.*, 2021). Makrofag teraktivasi ketika mendapat rangsangan dari lipopolisakarida untuk mensekresikan TNF- α . Sel T dan sel *Natural Killer* (NK) yang menghasilkan IFN- γ juga dapat merangsang makrofag untuk meningkatkan produksi dari TNF- α (Supit, I. A. *et al.*, 2015).

TNF- α berikatan dengan reseptor *Tumor Necrosis Factor Receptors 1* (TNFR 1) dan *Tumor Necrosis Factor Receptors 2* (TNFR 2). TNFR 1 diekspresikan oleh semua jaringan, sedangkan TNFR2 umumnya terkandung dalam sel imun dan hanya ditemukan atau hanya memperantarai pada beberapa respon biologi. TNF- α dengan reseptornya akan memulai proses *signaling* pada proses peradangan dan kematian sel (Jang, D. *et al.*, 2021).

Pengukuran kadar TNF- α yang berasal dari darah tepi dapat diukur menggunakan ELISA. Metode lain yang dapat digunakan adalah *flow Cytometric Bead Array* (CBA) dan *Immunoassay Luminex* (Valaperti, A., *et al.*, 2019). CBA dapat menganalisis lebih dari 30

parameter. *Immunoassay Luminex* dapat menganalisis sampai dengan 100 parameter. Keduanya mempunyai kelebihan dapat menghemat durasi pemeriksaan namun memungkinkan dapat menimbulkan reaksi silang, sedangkan ELISA memiliki sensitivitas lebih tinggi (Dupont, N.C., *et al.*, 2005).

2.1.2. Peran dan fungsi TNF- α

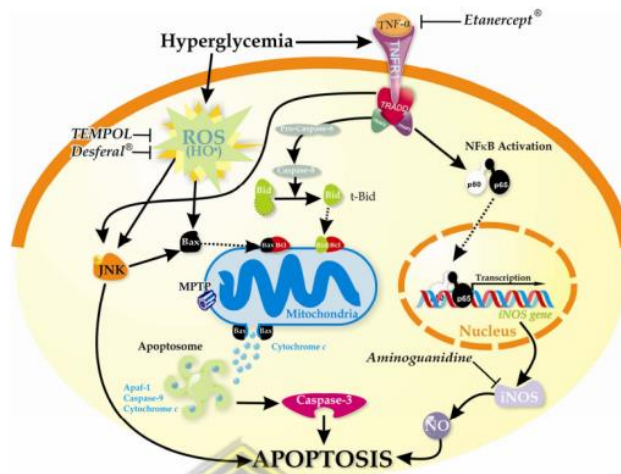
Adapun beberapa fungsi TNF- α dalam proses inflamasi, TNF- α berperan untuk meningkatkan fungsi pro-trombotik dan merangsang endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi untuk tempat perlekatan dari leukosit. TNF- α juga berperan pada kinerja makrofag dalam perekrutan leukosit serta memproduksi faktor pertumbuhan salah satunya *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF), dimana VEGF memiliki fungsi mengatur angiogenesis, permeabilitas vaskular, dan pembentukan fenestrasi endotel di pankreas. Fungsi lainnya dari TNF- α adalah memiliki peranan dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit. Selain itu, TNF- α juga memiliki fungsi sebagai immunosupresi pada penyakit SLE (Wulandari E. L. *et al.*, 2022) (Supit, I. A. *et al.*, 2015).

Pada individu obesitas, TNF- α memiliki efek yang berkaitan dengan resistensi insulin, asam lemak bebas yang meningkat oleh adiposit, sintesis adiponektin yang menurun, dan sinyal insulin yang terganggu (Supit, I. A. *et al.*, 2015). Kondisi tersebut dapat terjadi karena adanya hipertrofi pada sel adipositnya yang nantinya akan

menyebabkan hipoksia. Keadaan hipoksia tersebut akan menyebabkan kematian sel dan infiltrasi makrofag. Jika inflamasi terjadi secara terus menerus (hipertrofi berkelanjutan) maka sitokin pro-inflamasi dari infiltrasi makrofag (TNF- α , IL-6, IFN- γ) akan meningkat. Sehingga persinyalan insulin akan terganggu. Sitokin pro-inflamasi yang dilepas akan memicu terjadinya peningkatan fosforilasi serin yang bersifat menghambat *Insulin Receptor Substrate -1* (IRS-1), dimana merupakan kunci dari kaskade persinyalan inhibisi (Agus, R. P., 2019).

Pada kondisi hiperglikemia kronis, akan terjadi peningkatan produksi dari *Advanced Glycation End Products* (AGEs), proses auto oksidasi glukosa dan juga fosforilasi oksidatif yang meningkat dapat memicu terjadinya stress oksidatif sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan pada *inner membrane* mitokondria. Hal tersebut akan mengakibatkan terjadinya pembentukan dari *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) yang diregulasi oleh kelompok *anti-apoptotic* (Bcl-2, Bcl-XL) dan kelompok *pro-apoptotic* (Bad, Bax) pada membran mitokondria. Pembentukan MPTP tersebut akan menginduksi pelepasan dari sitokrom C ke sitosol, lalu sitokrom C akan bergabung dengan *Apoptotic protease activating factor-1* (Apaf -1) untuk mengaktifkan prokaspase 9 sehingga kaspase 9 aktif dan membentuk *apoptosome*, mengaktifkan dari kaspase 3 lalu memicu kematian sel (apoptosis) (Francés, D. E. *et al.*, 2013).

TNF- α merupakan sitokin utama yang dihasilkan sebagai respon dari proses inflamasi yang terjadi. TNF- α akan mengaktivasi jalur persinyalan pada proses apoptosis, respon inflamasi dan sel diferensiasi. Pada hepar, hiperglikemia kronis juga dapat meningkatkan kadar TNF- α . TNF- α yang berikatan dengan TNFR 1 akan mengaktifkan NF κ B (faktor transkripsi) yang akan menstimulasi lebih banyak mediator inflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-2, IL-12, IFN- γ), *Cell Adhesion Molecules* (CAMs), Reseptor Kemokin dan Enzim Penginduksi (COX2, iNOS). TNF- α yang sudah berikatan dengan reseptornya akan membentuk sebuah kompleks dan akan berikatan dengan FADD (*Fas Associated DD protein*) lalu menginisiasi kaspase-8 dan JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) yang nantinya akan meningkatkan apoptosis (Francés, D. E. *et al.*, 2013). Sitokin lainnya yaitu IL-1 dan TNF- α menyebabkan kerusakan struktural dari sel beta pankreas dan menurunkan kapasitas sekresi insulin. IFN- γ menyebabkan aktivitas sintesis dari *Nitrite Oxide* (NO). NO yang meningkat berhubungan dengan proses inflamasi. Efek merugikan dari NO yang tinggi akan menyebabkan terjadinya kerusakan DNA, disfungsi enzim, inflamasi, stress oksidatif, dan kerusakan endotel. NO diduga menjadi faktor patogen dalam proses autoimun pada DMTI (Sokolovska, J. *et al.*, 2020)



Gambar 2. 1 Mekanisme Apoptosis Dalam Kondisi Hiperglikemia.

2.1.3. Faktor yang Mempengaruhi TNF- α

Berikut faktor – faktor yang mempengaruhi TNF- α , yaitu :

a. Obesitas

Peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α terjadi pada obesitas. Obesitas merupakan faktor risiko penyakit metabolik dan ROS akibat dari metabolisme lemak yang tidak normal yang akan mengaktifasi makrofag untuk memproduksi TNF- α sehingga kadarnya meningkat. Pada obesitas terjadi peningkatan kadar TNF- α yang berkorelasi positif dengan peningkatan kadar IL-6. TNF- α mempengaruhi penekanan ekspresi gen pada jaringan lemak untuk transkripsi pada proses lipogenesis dan penekanan ekspresi gen pada hati yang terlibat dalam sintesis kolesterol dan asam lemak (Susantiningsih, T., & Mustofa, S., 2018).

b. Stress oksidatif

Kadar gula darah ekstraseluler yang meningkat pada DM dapat meningkatkan produksi ROS sehingga terjadi peningkatan produksi TNF- α yang menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas. TNF- α dapat menyebabkan resistensi insulin ditandai dengan penurunan dari autofosforilasi dan *insulin sensitive Glucose Ttransporter* (GLUT) (Yuniarti, E., 2017).

c. Infeksi

Infeksi Malaria Falciparum yang disebabkan oleh *Plasmodium Falciparum* ditandai dengan meningkatkan kadar TNF- α pada kondisi tersebut. Peningkatan kadar TNF- α menyebabkan terjadinya demam, depresi eritropoesis yang akan menyebabkan anemia (Irawati, L., 2014).

d. Usia

Menurut penelitian sebelumnya, peningkatan kadar TNF- α juga dipengaruhi oleh faktor usia, dimana rerata kadar TNF- α pada usia 16-17 tahun adalah 60,30 pg/ml sedangkan usia 18-19 tahun adalah 67,5 pg/ml. Proses penuaan dapat meningkatkan kadar TNF- α akibat dari sinyal apoptosis yang meningkat dan sinyal kelangsungan hidup yang menurun (Supit, I. A. *et al.*, 2015).

e. Jenis kelamin

Diabetes Melitus merupakan penyakit metabolik kronik yang ditandai dengan adanya peningkatan kadar TNF- α yang menyerang sel β pankreas. Jenis kelamin merupakan salah satu faktor risiko pada DM,

dimana perempuan cenderung lebih berisiko dibandingkan laki-laki dikarenakan kadar lemak pada perempuan lebih tinggi yaitu 20-25% dari berat badan sedangkan laki-laki hanya 15-20% dari berat badan. Hal ini berhubungan dengan obesitas yang dapat meningkatkan stress oksidatif dan peningkatan TNF- α (Gunawan, S., & Rahmawati, R., 2021).

f. Riwayat Penyakit Lain

Faktor Riwayat Penyakit lain seperti Penyakit Paru Obstruktif Kronik (PPOK) yang merupakan penyakit inflamasi kronik akibat pajanan partikel atau zat asing dapat dianggap sebagai faktor risiko DM yang menyebabkan perubahan pada *marker* peradangan seperti TNF- α yang meningkat lebih tinggi (Soemarwoto, R.A., *et al.*, 2019).

2.2. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells

2.2.1 Pengertian

Sekretom berasal dari sekret berbasis *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs). Beberapa faktor regeneratif yang dimiliki sekretom ialah sitokin anti-inflamasi dan faktor pertumbuhan yang mampu menginisiasi pembentukan jaringan baru (Benavides-Castellanos *et al.*, 2020).

Berbagai *surface marker* yang dapat diekspresikan oleh sel punca yang berasal dari MSCs yaitu berupa CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14, CD11, CD79/CD19, dan *Human Leukocyte Antigen-DR* (HLA-DR) yang jumlahnya lebih sedikit (Nugraha, A. & Putra, A., 2018). MSCs juga memiliki karakteristik mempunyai kapasitas untuk

berdiferensiasi menjadi osteosit, adiposit dan kondrosit secara *in vivo* (Sandyarani, D., 2022)

Untuk memperpanjang kelangsungan hidup MSCs yang cukup lama, maka perlu dikondisikan dalam keadaan hipoksia agar efek regeneratifnya dapat ditimbulkan, untuk menghadapi berbagai *stressor* pada lingkungan yang akan diperbaiki seperti inflamasi dan lingkungan hipoksia. MSCs dengan prekondisi hipoksia dapat meningkatkan motilitasnya melalui jalur transduksi CXCR4, serta melalui *adhesi fokal kinase* dan mekanisme persinyalan saluran kalium (Moreira, A. *et al.*, 2017).

2.2.2 Sumber

Stem cells dapat diisolasi dari berbagai sumber dalam tubuh manusia. Saat ini, sumber utama MSCs adalah sumsum tulang dan jaringan adiposa. Ada beberapa sumber MSCs yang sudah diteliti yaitu sumsum tulang/ *Bone Marrow* (BM), pulpa gigi, jaringan lemak/ *Adipocyte Tissue* (AT), jaringan yang berasal dari kelahiran (*Birth-derived tissues*) seperti *Umbilical cord* (UCB), *Warthon jelly* dan Kondrosit. (Berebichez-Fridman, R. & Montero-Olvera, P. R., 2018).

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) yang berasal dari tali pusat memiliki potensi *stemness* yang lebih kuat dibanding dengan yang berasal dari sumsum tulang, selain itu teknik pengambilan MSCs yang berasal dari tali pusat relatif lebih mudah dan tidak invasif (Nugraha, A. & Putra, A., 2018).

Molekul ini dalam bentuk eksosom memiliki ukuran sekitar 40-120 nm dan dalam bentuk mikrovesikel sekitar 50-1000 nm. Molekul yang disekresikan sekretom MSC yaitu TGF- β , IL-1, VEGF, PGE2, Gal-1, Gal-9 (Eleuteri & Fierabracci, 2019). Media terkondisi atau *secretome* yang diperoleh dapat disimpan selama 6 bulan pada suhu 80°C sebelum digunakan dalam penelitian (Damayanti, R. H., *et al.*, 2021).

2.2.3 Peran & Fungsi MSCs

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) mampu memperbarui diri sendiri (*self renewal*) dan berdiferensiasi menjadi sel spesifik (*multilineage differentiation*) termasuk menjadi sel β pankreas. MSCs berfungsi sebagai *immunomodulator* dalam meregulasi sistem imun serta memberikan pengaruh imunosupresif terhadap sel B, sel NK, sel dendritik, dan neutrofil (Sandyarani, D., 2022). MSCs juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan regenerasi vaskuler, angiogenesis dan mengurangi jumlah sel apoptosis melalui molekul bioaktif yang disekresikan secara parakrin seperti VEGF dan *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF). Sitokin pro-inflamasi yang berperan ketika ada terjadinya luka adalah TNF- α . TNF- α akan mengaktivasi MSCs untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan. Kadar faktor pertumbuhan yang digunakan sebagai indikator pertumbuhan sel islet adalah PDGF (Zakariya, H. S. & Putra, A., 2018).

2.3. Diabetes Melitus Tipe 1

2.3.1. Pengertian

Diabetes anak – anak atau *Insulin Dependent Diabetes Melitus* (IDDM) yang sekarang dikenal sebagai DMT1 merupakan diabetes yang terjadi karena adanya defisiensi insulin akibat hilangnya sel β pankreas di pulau langerhans. Populasi dewasa dan anak memiliki risiko mengalami DMT1 (Marzel, R., 2020). Beberapa faktor seperti pembentukan antibodi, genetik dan lingkungan dapat menjadi penyebab terjadinya defisiensi insulin absolut karena adanya kerusakan sel β pada pankreas. Pemaparan dari faktor lingkungan dapat menginduksi autoimunitas sel β pada individu DMT1 yang rentan secara genetik (Lucier, J. & Weinstock, R. S., 2023). DMT1 adalah penyakit dengan kadar gula darah atau glukosa melebihi batas normal, hal ini terjadi karena tubuh tidak memproduksi cukup insulin. Tambahan insulin dari luar dibutuhkan oleh penderita DMT1. Hormon insulin yang dihasilkan oleh pankreas mengendalikan kadar gula darah. Insulin bekerja mentranspor glukosa dari darah ke sel yang sebelumnya berasal dari makanan yang nantinya digunakan sebagai energi (DiMeglio, L. A. *et al.*, 2018).

Diagnosis DM dapat menggunakan pemeriksaan Gula Darah Sewaktu (GDS), Gula Darah Puasa (GDP), dan *Oral Glucose Tolerance Test* (OGTT). $GDS \geq 200$ mg/dl, $GDP > 126$ mg/dl, OGTT > 200 mg/dl sudah cukup untuk menegakkan diagnosis diabetes

mellitus (Kurniawaty, E., 2014). Gejala yang ditimbulkan berupa *polydipsia* (rasa haus yang berlebihan), *polyuria* (frekuensi buang air kecil yang meningkat), *polyfagia* (rasa lapar yang meningkat), dan penurunan berat badan tanpa sebab (Lestari, *et al.*, 2021).

2.3.2. Patofisiologi

DMT1 terjadi akibat dari adanya destruksi pada sel β pankreas oleh proses autoimun yang spesifik. Contoh dari autoantigen sel β pankreas adalah insulin, dekarboksilase asam glutamate, tirosin fosfatase, dan antigen insulinoma. Mekanisme yang terlibat dalam proses tersebut masih belum jelas, namun secara umum diyakini bahwa autoantigen sel beta, makrofag, sel dendritik, limfosit B, dan limfosit T terlibat dalam proses tersebut. Faktor penyebab yang pasti sangat penting untuk ditentukan agar meningkatkan respon dari autoimun (Szablewski L., 2014).

Kerusakan sel islet pankreas pada DMT1, terjadi karena adanya ekspresi berlebih dari sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IFN- γ (Bazzaz, J.T. *et al.*, 2014). Penelitian ekperimental pada hewan pengerat dan juga manusia dengan DMT1, sel β pankreas mengalami stress dan destruksi akibat dari paparan sitokin tersebut (Vincenz L. *et al.*, 2011). Secara genetik, faktor risiko pada DMT1 didominasi oleh gen *Human Leukocyte Antigen* (HLA) (Furlanos, S. *et al.*, 2014). Gen HLA yang signifikan adalah polimorfisme gen HLA kelas II yang

mengkode DQ dan DR4-DQ8, dengan DR3-DQ2, ditemukan pada 90% pasien DMT1 (Goyal, R. & Jialal, I., 2022).

2.4. Hubungan *Secretome Hypoxia* MSCs dengan TNF- α pada DM tipe 1

Diabetes melitus adalah kelainan autoimun lokal yang melibatkan berbagai faktor dan beberapa sel imun (Al-Azzawi, B. *et al.*, 2020). Dalam sistem imun respon bawaan, sel T memainkan peran penting dalam induksi DMT1 (Yang, S. -H. *et al.*, 2009). Infiltrat inflamasi di pulau langerhans sebagian besar terdiri dari limfosit T, tetapi didominasi CD4⁺ (Th4 atau *helper*) atau CD8⁺ (Th8 atau sitotoksik) (Szablewski L., 2014). Sel T CD4⁺ memiliki sekresi sitokin: Th1, Th2, Th17, dan Treg (sel T regulator) (Barygina, V. *et al.*, 2015). Sitokin yang diproduksi oleh Th1 adalah mediator dalam imunitas seluler seperti TNF- α dan IFN- γ , sedangkan sitokin yang diproduksi oleh Th2 adalah stimulator respon imun humoral dan menghasilkan antibodi (Taylor, A. *et al.*, 2006). Th17 bekerja pada jaringan yang rusak karena proses autoimun (Barygina, V. *et al.*, 2015). Th1 bertanggung jawab untuk penyakit agresif, sedangkan Th2 menginfiltrasi perlahan dan tidak menginduksi penyakit Diabetes Melitus (Swinkels, M. *et al.*, 2018). Inflamasi yang diperantarai oleh Th1 akan menyebabkan akumulasi sel T yang tidak normal pada islet (Ekasaputra, V. M., 2022).

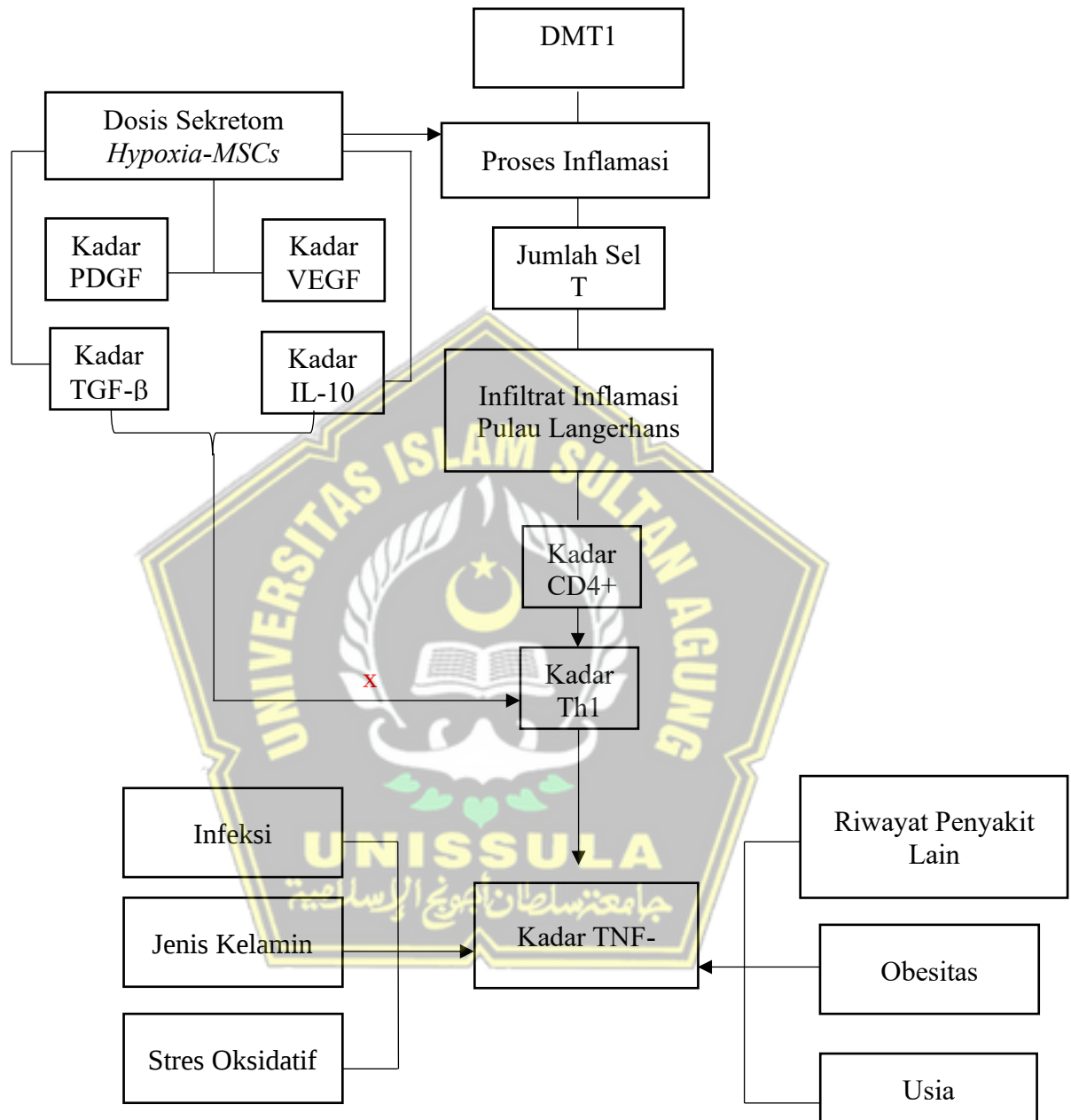
Faktor risiko yang dapat memicu terjadinya DMT1 ialah faktor lingkungan dan faktor genetik. Faktor lingkungan seperti obesitas dapat mempengaruhi kadar TNF- α . Faktor genetik oleh gen HLA kelas II

merupakan gen yang sering ditemukan pada penderita DMT1 (Lestari., *et al.*, 2021).

Terapi yang sering digunakan pada DMT1 adalah insulin eksogen yang memiliki risiko akan terjadinya episode hipoglikemi akibat dari pembentukan insulin-autoantibodi yang akan mengikat antibody insulin sehingga terjadi efek penurunan glukosa dalam darah (Su & Lin, 2016). Penggunaan SH-MSCs sebagai terapi dapat merangsang pengeluaran molekul faktor pertumbuhan seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan sitokin anti-inflamasi seperti *Interleukin-10* (IL-10), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang dapat meregenerasi pada pulau Langerhans (Pranowo, A. H., 2022).

Sitokin anti-inflamasi yang dihasilkan oleh MSCs seperti IL-10 dan TGF- β 1 dapat menurunkan kondisi inflamasi kronis dengan cara menghambat Th1 dan Th17 dan meningkatkan aktivasi dari Treg yang dapat menghambat dari produksi TNF- α sehingga kadarnya menurun (Hamra, N. F. *et al.*, 2021). Pada kasus lainya ditemukan bahwa MSC-CM (*a Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells*) dapat menurunkan kadar sitokin inflamasi seperti IL-17 dan IFN- γ (Al-Azzawi, B. *et al.*, 2020).

2.5. Kerangka Teori



Gambar 2. 5 Skema Kerangka Teori.

2.6. Kerangka Konsep



Gambar 2. 6 Skema Kerangka Konsep.

2.7. Hipotesis

Pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) berpengaruh terhadap penurunan kadar TNF- α pada Tikus Model Diabetes Tipe 1 yang diinduksi dengan Streptozotocin.



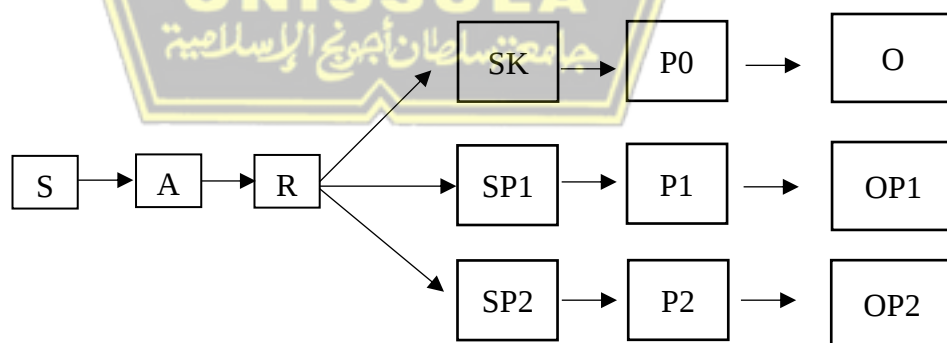
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian dan rancangan penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental in vivo dan in vitro dengan metode *post test only control group design* dengan hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar. Pengukuran data dilakukan setelah intervensi. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut:

1. Kelompok Kontrol: tikus model diabetes tanpa perlakuan diinjeksi NaCl 0,9 % 1,0 ml.
2. Kelompok P1: tikus model diabetes diinjeksi dengan SH-MSCs dosis 0,5 ml.
3. Kelompok P2: tikus model diabetes diinjeksi dengan SH-MSCs dosis 1,0 ml.



Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian *Post-Test Only Group*

S: Subyek (Tikus)

A: Adaptasi

R: Randomisasi

SK: Subyek Kontrol

SP1,2: Subyek Perlakuan 1,2

P0: Tanpa Perlakuan (diinjeksi NaCl)

P1,2: Perlakuan 1,2

O: Observasi

OP1,2: Observasi Perlakuan 1,2

Rancangan penelitian ini dipilih karena ingin mengetahui perbedaan kadar TNF- α setelah diberi SH-MSCs pada tikus kontrol dan tikus yang diberi perlakuan.

3.2 Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel Penelitian

3.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah Sekretom *Hypoxia* MSCs.

3.2.1.2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar TNF- α .

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Sekretom *Mesenchymal Stem Cells*

Sekretom *Hypoxia* MSCs merupakan supranatan yang berasal dari sekret yang telah disentrifugasi yang sebelumnya diambil dari medium MSCs yang sudah

terinkubasi selama 24 jam dengan kadar O₂ 5%. Dosis yang diambil adalah 0,5 ml dan 1,0 ml. **Skala : nominal**

3.2.2.2. Kadar TNF- α

Kadar TNF- α adalah kadar yang diukur dengan metode ELISA dengan menggunakan sampel darah vena pada mata tikus putih galur wistar jantan pada hari ke - 30. Satuan kadar TNF- α adalah pg/ml. **Skala : rasio**

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

3.3.1.1. Populasi Target

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar jantan.

3.3.1.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau yang dipilih dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar jantan yang diambil dari

Integrated Biomedical Laboratory (IBL) Fakultas

Kedokteran Unissula pada saat penelitian dilakukan.

3.3.2. Sampel Penelitian

Tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria inklusi dan kriteria eksklusi

3.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Kondisi sehat.

2. Berat sekitar 250-300 gram.

3. Usia 8-10 minggu.

3.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Pernah digunakan untuk penelitian lain.

2. Tikus yang tidak mengalami peningkatan gula darah
>200 mg/dl.

3.3.2.3. Kriteria Drop Out

1. Mati selama penelitian.

3.3.3. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Random Sampling* dimana populasi yang memenuhi kriteria inklusi yang diambil secara acak.

3.3.4. Besar Sampel

Penentuan besar sampel untuk penelitian yaitu sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Kelompok sampel dalam penelitian tersebar menjadi 3 kelompok.

3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen

Handscoen Steril, Gunting, Pinset, Aluminium foil, Scalpel, Surgical Blades, Carbon Dioxide Cylinder, Beaker glass, Thermostirrer, Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip), Conical tube (15 ml, 50 ml), alat sentrifugasi, Cryotube 1 ml, Pipette filler, Heparin tube, Tabung microcentrifuge 1,5 ml, Jarum suntik 3-

ml, Jarum suntik 23-G, *Hotplate stirrer*, 37°C *incubator*, Kandang tikus, Rat TNF- α Elisa Kit, Inkubator CO₂, *Biosafety cabinet class 2*, *Disposable pipet*, *Inverted microscope*, *Oxygen meter*, *Chamber*, *Imunocytochemistry*, *Cell counter*, *Flask*, *Disk*, Tabung CO₂.

3.4.2. Bahan

Tikus jantan Wistar: ~250 hingga 300 g, berusia 8 hingga 10 minggu, Makanan standar makanan hewan pengerat (Harlan), Serum tikus putih galur wistar, Alkohol 70%, 50 mM natrium sitrat (*enzyme grade*; *Fisher*) pH 4,5, MSCs, NaCl 0.9%, Medium dMEM, Streptozotocin (STZ; Sigma), Fungizon 0.5%, FBS, Streptomisin-penicilin 1% (penstrep), *Deionized* atau *distilled water*, 10% (b / v) sukrosa (Sigma), 50 Mm, PBS, 50 mM natrium sitrat (*enzyme grade*; *Fisher*) pH 4,5.

3.5 Cara Penelitian

3.5.1 Teknik Isolasi MSCs dari *Umbilical Cord* (Muhar A.M., *et al.*, 2018)

Semua rangkaian proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan alat dan prinsip kerja teknik yang steril.

3.5.1.1. *Umbilical Cord* diambil dari tempat penyimpanan atau langsung dari tikus, lalu dicuci menggunakan PBS.

3.5.1.2. *Umbilical Cord* dicacah menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil.

3.5.1.3. Cacahan *Umbilical Cord* diletakkan secara merata dalam *flask* T25.

3.5.1.4. Ditunggu sekitar 2 jam sampai *Umbilical Cord* melekat pada dasar *flask*. 1,0 ml medium ditambahkan atau sampai eksplan terendam.

3.5.1.5. Inkubasi *flask* pada suhu 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5%.
Lalu medium pada *flask* dibuang dan diganti sejumlah medium yang dibuang selama tiga hari sekali dalam kurun waktu 10-15 hari.

3.5.1.6. Pertumbuhan sel diamati menggunakan *Inverted microscope*.

3.5.1.7. Inkubasi ulang pada suhu 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5%.
Lalu selama 3 hari sekali, medium pada *flask* dibuang, lalu diganti dengan sejumlah medium yang dibuang.

3.5.1.8. Prosedur yang sama dilakukan berulang, hingga mencapai *stem cells konfluens* 80%.

3.5.2 Proses Persiapan *Passage*

3.5.2.1. Apabila sel sudah *konfluens* 80%, seluruh medium dibuang, kemudian sejumlah medium yang dikeluarkan ke dalam *flask* dicuci dengan PBS, setelah itu buang PBS.

3.5.2.2. Tripsin sintetik (*triple*) ditambahkan sebanyak 1,0 ml, lalu didiamkan selama 5 menit, setelah itu tapping pada *flask* untuk melepaskan perlekatan sel di dasar *flask*.

- 3.5.2.3. Medium inhibitor tripsin sintetik ditambahkan sebanyak 2,0 ml.
- 3.5.2.4. Sel dan medium dipindahkan dari *flask* T25 ke dalam *tube* 15,0 ml.
- 3.5.2.5. Sentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 1900 rpm. Buang supernatant.
- 3.5.2.6. PBS ditambahkan sebanyak 2,0 ml pada *pellet* yang tersisa, lalu dilakukan resuspensi.
- 3.5.2.7. Sentrifugasi kembali selama 8 menit dengan putaran 1900 rpm. Supernatant dibuang.
- 3.5.2.8. Medium komplit ditambahkan sebanyak 1,0 ml pada *pellet* yang tersisa di dasar tabung.
- 3.5.2.9. Jumlah sel dihitung.

3.5.3 Proses *Passage* Sel

- 3.5.3.1. 1,0 ml medium komplit / 1.500.000 sel ditambahkan ke dalam *tube* sesuai jumlah hitungan sel sebelumnya.
- 3.5.3.2. 1,0 ml sel dan medium dimasukkan kedalam *flask* T25.
- 3.5.3.3. Melakukan kultur dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama 1 hari.
- 3.5.3.4. Medium komplit sebanyak 9,0 ml ditambahkan ke dalam *flask*.
- 3.5.3.5. Inkubasi dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama 3 hari.

- 3.5.3.6. Seluruh medium dibuang, lalu medium komplit baru dimasukkan sebanyak jumlah medium yang dibuang,
- 3.5.3.7. Inkubasi kembali dengan kondisi yang sebelumnya.
- 3.5.3.8. Proses yang sama dilakukan selama 3 hari sekali hingga sel konfluen 80% dalam *flask*.
- 3.5.3.9. Dilakukan perpindahan ke *flask* yang baru setiap 80% sel konfluen.
- 3.5.3.10. Tiap fase perpindahan dihitung sebagai *passage* I, II, dan seterusnya.
- 3.5.3.11. Proses kultur dilakukan hingga *passage* ke IV-VI.

3.5.4 Proses Validasi Sel

- 3.5.4.1. Prosedur *flow cytometry* dilakukan untuk pembacaan marker dari *stem cells* CD90.1, CD29, CD45, CD31 dengan populasi CD90.1 dan CD29 bernilai positif dan negatif pada CD45 dan CD31.
- 3.5.4.2. Melakukan tes kemampuan deferensiasi *stem cells* menjadi osteosit dan adiposit secara *in vitro* dengan menggunakan medium spesifik tertentu.

3.5.5 Proses Pemanenan Sel

- 3.5.5.1. Pemanenan sel dilakukan pada *passage* ke-IV.
- 3.5.5.2. Apabila sel sudah *konfluens* 80%, seluruh medium dibuang, kemudian sejumlah medium yang dikeluarkan ke dalam *flask* dicuci dengan PBS, setelah itu buang PBS.

3.5.5.3. Tripsin sintetik (*triple*) ditambahkan sebanyak 1,0 ml didiamkan selama 5 menit.

3.5.5.4. Teknik tapping dilakukan untuk melepaskan sel yang menempel di dasar *flask*.

3.5.5.5. Medium *inhibitor* tripsin sintetik ditambahkan sebanyak 2,0 ml.

3.5.5.6. Seluruh sel dan medium pada flask dipindahkan ke dalam *tube* 15,0 ml.

3.5.5.7. Sentrifugasi selama 10 menit dengan perputaran 1900 rpm. Buang *supernatant*.

3.5.5.8. PBS ditambahkan sebanyak 2,0 ml, kemudian melakukan proses resuspensi.

3.5.5.9. Sentrifugasi selama 8 menit dengan perputaran 1900 rpm. Buang *supernatant*.

3.5.5.10. Medium komplit ditambahkan sebanyak 1,0 ml pada *pellet* yang tersisa di dasar tabung.

3.5.5.11. Lakukan hitung sel.

3.5.6 Proses Penghitungan Sel

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

3.5.6.2. 90µl *triptofan blue* dimasukkan ke dalam *cryotube*.

3.5.6.3. 10µl campuran dari *cryotube* diambil menggunakan pipet lalu diletakkan pada bilik hitung yang ditutup *deck glass*.

3.5.6.4. Sel diamati menggunakan *inverted microscope*, lalu dihitung pada keempat bilik hitung.

3.5.6.5. Hitung sel dengan menggunakan rumus perhitungan jumlah sel:

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

3.5.7 Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom

3.5.7.1. Menyiapkan *chamber*.

3.5.7.2. *Chamber* diisi dengan *hypoxia* MSCs yang sudah ada dalam well.

3.5.7.3. *Oxygen meter* disiapkan di dalam *chamber*.

3.5.7.4. *Chamber* ditutup dengan rapat.

3.5.7.5. CO₂ dialirkan pada *chamber* menggunakan selang.

3.5.7.6. *Oxygen meter* diamati hingga oksigen dalam *chamber* mencapai kadar O₂ 5%.

3.5.7.7. Inkubasi selama 24 jam.

3.5.7.8. *Oxygen meter chamber* diperhatikan secara berkala untuk memastikan kadar oksigen tetap dalam kadar 5%.

3.5.7.9. *Conditioned media* diambil menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF) agar mendapatkan *Secretome* MSCs dengan ukuran 10-50kDa.

3.5.8 Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1 (Muhar A.M., *et al.*, 2018)

- 3.5.8.1. Sebelum percobaan dimulai, 5 hari sebelumnya kandang dua sampai lima tikus jantan dengan suhu $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban $55\% \pm 5\%$, siklus terang-gelap selama 12 jam (cahaya pada jam delapan pagi dan gelap pada pukul 8 malam). Lalu tikus diberi akses makan dan minum secara bebas.
- 3.5.8.2. Seluruh tikus ditimbang secara akurat sampai 1 g.
- 3.5.8.3. Tikus dipisahkan secara *random* menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. (Jumlah tikus harus sama untuk setiap kelompok).
- 3.5.8.4. Percobaan hari ke- 6, semua tikus dipuasakan sebelum diberikan STZ selama 6 sampai 8 jam. Tetap diberi minum seperti biasa.
- 3.5.8.5. *Buffer* natrium sitrat 50 mM (pH 4,5) disiapkan lalu dimasukkan 1,0 ml *buffer* ke dalam masing-masing tabung *microcentrifuge* 1,5 ml dan tutup tabung dengan aluminium foil
- 3.5.8.6. Segera sebelum injeksi, STZ dilarutkan kedalam 50 mM *buffer* natrium sitrat (pH 4,5) hingga konsentrasi akhir 10 mg/ml. 5 menit setelah larut diinjeksikan. Larutan STZ harus disiapkan secara baru untuk setiap injeksi.

- 3.5.8.7. Larutan STZ diinjeksikan menggunakan *sprit* 3-ml dan jarum 23-G secara intraperitoneal pada 65 mg/kgBB tikus untuk kelompok perlakuan. *Buffer* sitrat dengan volume yang sama (pH 4,5) diinjeksikan secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol.
- 3.5.8.8. Tikus dimasukkan kembali ke kandangnya dan diberi makanan seperti biasa dan air sukrosa 10%.
- 3.5.8.9. Percobaan kedua, air sukrosa 10% diganti menjadi air biasa.
- 3.5.8.10. Untuk penelitian yang melibatkan DMT1 tahap awal: Pada hari percobaan ke-10, semua tikus dipuasakan selama 6 sampai 8 jam (antara jam 7 pagi dan 1 sampai 3 sore).
- 3.5.8.11. Uji kadar glukosa darah memakai sampel vena dari ekor menggunakan alat cek kadar gula digital.
- 3.5.8.12. Jika hewan diabetes untuk menilai mekanisme tahap awal DMT1 atau untuk skrining senyawa untuk pengobatan diabetes tahap awal, model divalidasi untuk studi lebih lanjut ketika hiperglikemia ditemukan pada tikus yang diinjeksi STZ (yaitu, kadar glukosa darah >150 mg/dl dan / atau secara statistik lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kontrol).
- 3.5.8.13. Biasanya penentuan kadar glukosa darah cukup untuk mendiagnosis diabetes, sehingga tidak perlu dilakukan pengukuran kadar insulin.

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

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

3.5.8.16. Apabila suatu zat uji atau senyawa sedang dinilai kemampuannya untuk mengoreksi hiperglikemia, protokolnya diperpanjang lebih lama, tergantung pada kebutuhan eksperimental. kelompok hewan dirawat seperti yang dijelaskan pada langkah 3 sampai 9 untuk membentuk status diabetes dan kemudian obati hewan dengan terapi restoratif potensial. Kelompok yang menerima suntikan *vehicle* yang sesuai disertakan sebagai kontrol.

3.5.9 Perlakuan pada Hewan Coba

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok :

3.5.9.1 Kelompok Kontrol: tikus model diabetes tanpa perlakuan yang diinjeksi NaCl 0,9 % 1,0 ml.

3.5.9.2 Kelompok P1 : tikus model diabetes dengan injeksi
Secretome Hypoxia-MSCs 0,5 ml.

3.5.9.3 Kelompok P2 : tikus model diabetes dengan injeksi
Secretome Hypoxia-MSCs 1,0 ml.

3.5.10 Analisis Kadar TNF- α dengan Elisa Kit

Pengenceran sampel dan reagen harus tercampur dengan sempurna.

3.5.10.1. Sebelum memasukkan TMB ke dalam sumuran, substrat
TMB diseimbangkan selama 30 menit pada suhu 37°C.
Direkomendasikan untuk memplot kurva standar untuk
setiap pengujian.

3.5.10.2. Menetapkan standar, sampel uji (diencerkan setidaknya 1/2
dengan *Sample Dilution Buffer*), sumuran kontrol (*blank*)
yang masing-masing pada *plate* nya telah dilapisi antibodi
dan kemudian, dicatat posisinya.

3.5.10.3. *Plate* dicuci sebanyak 2 kali sebelum memasukkan
sumuran standar, sampel dan kontrol (*blank*).

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

3.5.10.5. 100ul sampel yang diencerkan dengan benar dimasukkan
ke dalam sumuran sampel uji.

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

- 3.5.10.7. Melepas penutup dan buang isi *plate*, kemudian mencuci *plate* sebanyak 2 kali dengan *Wash Buffer*. Sumuran tidak boleh dibiarkan mengering sepenuhnya.
- 3.5.10.8. Larutan antibodi berlabel biotin 100µl dimasukkan ke dalam sumuran di atas (standar, sampel uji, dan sumur kosong).
- 3.5.10.9. Memasukkan larutan di bagian bawah setiap sumuran tanpa menyentuh dinding samping, tutup *plate* dan inkubasi pada suhu 37 ° C selama 1 jam
- 3.5.10.10. Melepas penutup, dan *plate* dicuci 3 kali dengan *Wash Buffer*, dan *Wash Buffer* dibiarkan tetap berada di dalam sumuran selama 1-2 menit.
- 3.5.10.11. Memasukkan 100µl larutan SABC ke dalam setiap sumur, *plate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
- 3.5.10.12. Melepas penutup dan melakukan pencucian 5 kali dengan *Wash Buffer*, kemudian *Wash Buffer* dibiarkan tetap di dalam sumuran selama 1-2 menit.
- 3.5.10.13. 90 µl substrat TMB dimasukkan kedalam masing-masing sumuran, tutup *plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam gelap selama 10-20 menit. (Waktu reaksi dapat dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan perubahan warna sebenarnya, tetapi tidak lebih dari 30 menit. Menghentikan

reaksi ketika gradien yang tampak muncul di sumur standar).

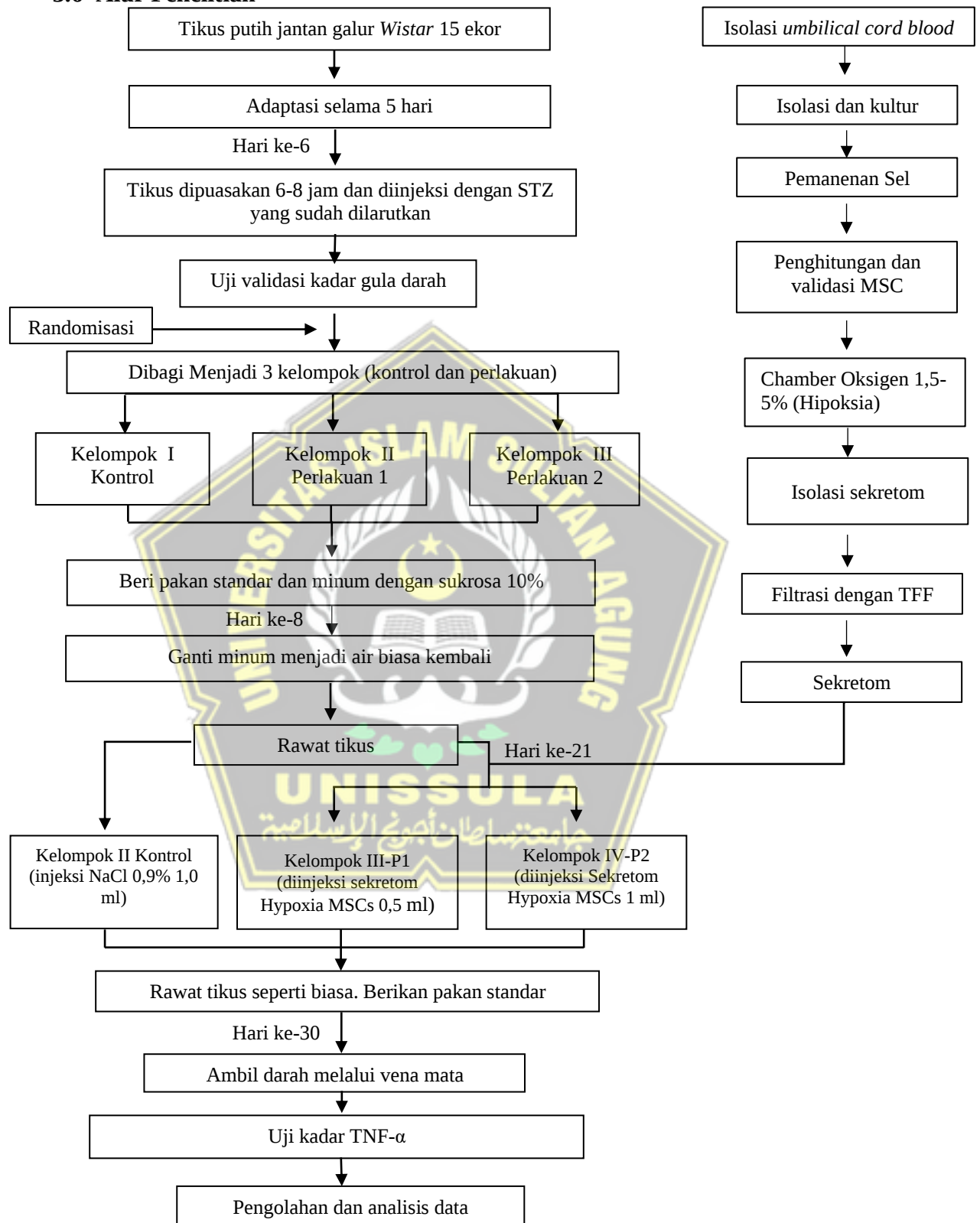
3.5.10.14. Memasukkan 50µl *Stop Solution* ke setiap sumur.

Warnanya akan langsung menguning. Urutan penambahan *Stop Solution* harus sama dengan larutan substrat TMB.

3.5.10.15. Pengukuran dengan membaca *Optical Density* (OD) absorbansi pada 450 nm di *Microplate Reader* segera setelah memasukkan *stop solution*.



3.6 Alur Penelitian



Gambar 3. 6 Alur Penelitian.

3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1 Tempat Penelitian

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

3.7.2 Waktu Penelitian

Penelitian sudah dilakukan pada bulan sampai Desember 2022 sampai Januari 2023.

3.8 Analisis Hasil

Data kadar TNF- α yang dihasilkan dari penelitian dilakukan uji deskriptif mengukur *mean*. Kemudian dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene Statistic*. Data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen. Oleh karena itu, dilanjutkan dengan pengujian parametrik uji *One Way* ANOVA untuk menentukan rerata data ketiga kelompok sampel. Pengujian *One Way* ANOVA menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan signifikan antar kelompok sampel. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD untuk menentukan perbedaan spesifik rerata kadar TNF- α masing-masing kelompok.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh SH-MSCs terhadap kadar TNF- α pada Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 1 (DMT1) diinduksi dengan Streptozotocin. Penelitian eksperimental ini dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) untuk pembuatan SH-MSCs serta pemeriksaan kadar TNF- α , dan di Laboratorium *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang untuk pemeliharaan hewan coba. Penelitian dilakukan sejak Desember 2022 sampai Januari 2023 menggunakan 15 ekor tikus putih jantan galur wistar. Jumlah kelompok yang digunakan sebanyak 3, terdiri atas kelompok kontrol (K) tikus dibuat model DMT1 dengan perlakuan injeksi NaCl 0,9% 1 ml, kelompok P1 tikus model DMT1 dengan perlakuan injeksi SH-MSCs dosis 0,5 ml dan kelompok P2 tikus model DMT1 dengan perlakuan injeksi SH-MSCs dosis 1,0 ml. SH-MSCs diambil dari medium *Mesenchymal Stem Cells* yang diinkubasi dalam keadaan O₂ 5% selama 24 jam. Medium disentrifugasi dan diambil supernatannya, medium difiltrasi menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF) sehingga didapatkan SH-MSCs.

Induksi STZ intraperitoneal dosis 65 mg/kgBB tikus dilakukan pada hari ke-6 *pasca* tikus diadaptasi selama 5 hari. Tiap kelompok uji terdiri atas 5 ekor tikus, dibagi secara random pada hari ke-7 setelah dilakukan uji validasi kadar gula darah. Tikus dinyatakan mengalami hiperglikemia atau

diabetes mellitus saat kadar gula darah mencapai > 200 mg/dl. Pemberian pakan standar pada tikus disertai dengan minum larutan sukrosa 10% pada hari ke-7. Hari ke-8 hingga hari ke-20 tikus dirawat dengan pemberian pakan dan air minum *ad libitum*. Hari ke-21 dilakukan injeksi NaCl dan SH-MSCs sesuai kelompok. Tikus kembali dirawat hingga hari ke-29. Hari ke-30 dilakukan pengambilan darah melalui vena mata untuk dilakukan pengujian kadar TNF- α menggunakan ELISA.

4.1.1 Analisis Deskriptif

4.1.1.1 Konfirmasi Tikus Penelitian

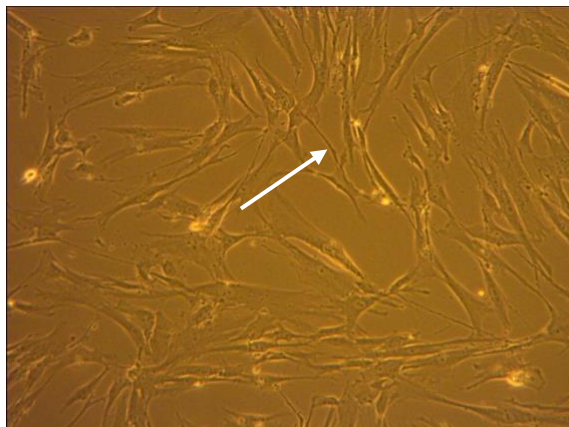
Tabel 4.1. Data Konfirmasi Tikus Penelitian

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

Kadar gula darah puasa pada tikus penelitian adalah sebesar 338 mg/dl atau lebih tinggi dari rentang nilai normal 50-135 mg/dl, menandakan bahwa tikus penelitian terkonfirmasi hiperglikemia (Hidayaturrahmah *et al.*, 2020).

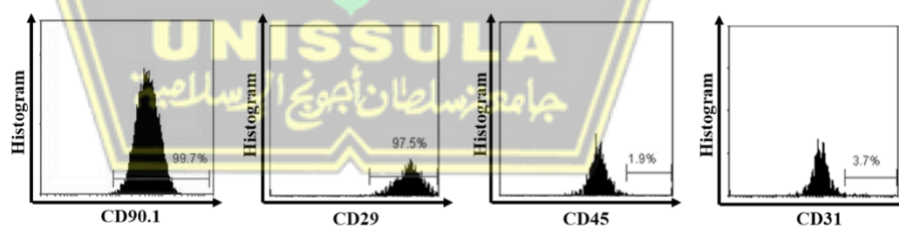
4.1.1.2 Validasi sel

Hasil kultur isolasi MSCs setelah *passage* ke 5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis.



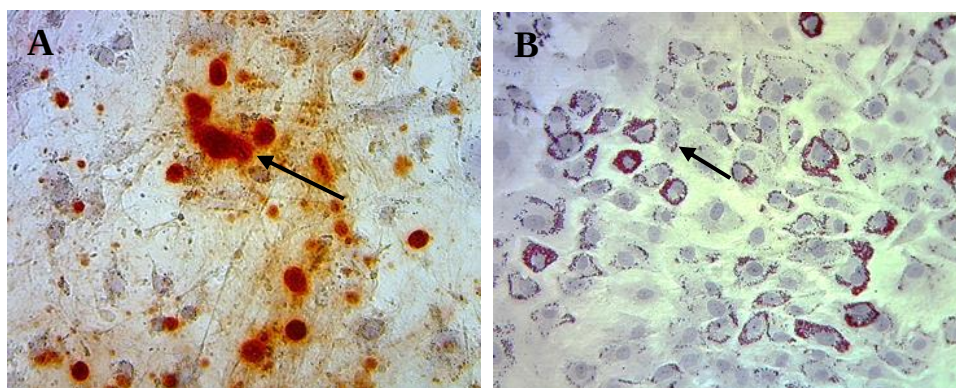
Gambar 4.1. Uji Validasi Isolasi MSCs dengan sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 200x.

Validasi sel yang telah diisolasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99,80%), CD29 (94,20%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,60%) dan CD31 (6,60%)



Gambar 4.2. Uji Validasi Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31

Penelitian ini menunjukkan MSCs dapat berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit dilihat dari endapan kalsium dan lemak berupa penampakan merah menggunakan pewarnaan *Alizarin Red* dan *Oil Red Dye*.



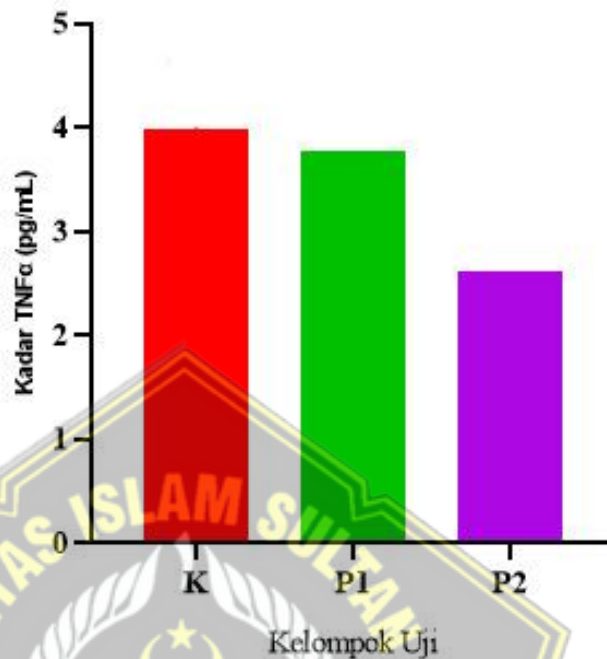
Gambar 4.3. Diferensiasi MSCs. Keterangan: **(A)** MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pewarnaan *alizarin red* dan **(B)** berdiferensiasi menjadi adiposit setelah pemberian pewarnaan *oil red* pada pembesaran 200x (ditunjukkan dengan panah hitam).

4.1.1.3 Deskriptif Data

Deskripsi kadar TNF- α antar kelompok yang disajikan pada Tabel 4.2. Berdasarkan Tabel 4.2 dan juga Gambar 4.1 tampak bahwa kadar TNF- α tikus tertinggi pada kelompok K, sedangkan terendah terdapat pada kelompok P2.

Tabel 4.2. Deskripsi kadar TNF- α (pg/ml) antar kelompok.

	Rerata $\pm$ SD
Kontrol	3,978 $\pm$ 0,669
P1	3,770 $\pm$ 0,705
P2	2,648 $\pm$ 0,628



Gambar 4.4. Rerata Kadar TNF- α antar Kelompok

Keterangan: K = kontrol (tikus model DMT1), P1= tikus model DMT1 dengan perlakuan injeksi SH-MSCs 0,5 cc, P2 = tikus model DMT1 dengan perlakuan injeksi SH-MSCs 1,0 cc

4.1.1.4 Distribusi Data

Data jumlah kadar TNF- α yang didapatkan diuji normalitasnya dengan *Shapiro-Wilk*. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.3. Tabel 4.3 memperlihatkan bahwa sebaran data kadar TNF- α tiap kelompok berdistribusi normal karena dari uji normalitas sebaran data dengan *Shapiro Wilk* didapatkan nilai $p > 0,05$, selanjutnya dilakukan analisis homogenitas dengan hasil yang ditunjukkan pada Tabel 4.4. Berdasarkan Tabel 4.4 didapatkan bahwa ketiga kelompok uji memiliki varian data yang

homogen, karena dari uji homogenitas varian dengan uji *Levene* diperoleh nilai $p=0,862$ ($p>0,05$) sehingga perbandingan kadar TNF- α antar kelompok dapat dianalisis dengan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA).

Tabel 4.3. Hasil Uji Normalitas Kadar TNF- α

	Kelompok	Nilai <i>p</i>
Kadar TNF- α	Kontrol	0,615
	P1	0,317
	P2	0,787

Tabel 4.4. Hasil Uji Homogenitas Varian Kadar TNF- α

	Kelompok	Nilai <i>p</i>
Kadar TNF- α	Kontrol	0,862*
	P1	
	P2	

* : Varian data homogen ($p>0,05$)

4.1.2 Analisis Bivariat

Hasil uji *One Way* ANOVA ditunjukkan pada Tabel 4.5. Perolehan nilai p Uji *One Way* ANOVA adalah sebesar 0,018 ($p<0,05$) menunjukkan adanya perbedaan rerata kadar TNF- α yang bermakna diantara ketiga kelompok uji. Analisis perbandingan kadar TNF- α antar dua kelompok berikutnya dilakukan dengan Uji *Post Hoc Least Significance Difference* (LSD) dan diperoleh hasil sebagaimana disajikan Tabel 4.6. Berdasarkan Tabel 4.6 diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan rerata kadar TNF- α antara kelompok K dengan P1 ($p=0,630$); terdapat perbedaan signifikan rerata kadar TNF- α antara kelompok K dengan P2 ($p=0,008$); dan terdapat perbedaan signifikan rerata kadar TNF- α antara P1 dengan P2 ($p=0,021$).

Tabel 4.5. Hasil Uji *One Way* ANOVA Kadar TNF- α .

	Kelompok	Nilai <i>p</i>
Kadar TNF- α	Kontrol	0,018*
	P1	
	P2	

* : Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 4.6. Hasil Uji *Post Hoc* LSD Perbandingan Rerata Kadar TNF- α antar Dua Kelompok

(I) Kelompok uji	(J) Kelompok uji	Nilai <i>p</i>
K	P1	0,630
	P2	0,008*
P1	P2	0,021*

* : Perbedaan rerata selisih signifikan pada $p < 0.05$

4.2. Pembahasan

Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT1) merupakan penyakit autoimun diperantarai oleh sel T (CD4+ dan CD8+) dan makrofag yang menyerang sel β pankreas penghasil insulin (Afdal, A. & Rini, E. A., 2012). Pengobatan DMT1 bergantung pada insulin eksogen untuk mengontrol hiperglikemia, namun memiliki risiko tinggi menimbulkan hipoglikemia yang mengancam nyawa pasien (Mathew, P. & Thoppil, D., 2021). MSCs memiliki fungsi sebagai *immunomodulator* dapat mengurangi aktivitas autoimun pada sel β pankreas (Ezquer, F. *et al.*, 2012).

Penelitian ini membuktikan adanya penurunan kadar TNF- α yang bermakna terhadap pengaruh injeksi *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) dosis 1,0 ml pada tikus DMT1. Pengaruh yang ditunjukkan oleh SH-MSCs adalah menurunkan kadar TNF- α , terlihat dari kadar TNF- α kelompok P2 yang signifikan lebih rendah dibandingkan kadar TNF- α

kelompok kontrol pada Gambar 4.4. Hasil ini terjadi karena SH-MSCs memiliki kapabilitas *immunodulator* atas kandungan sitokin anti-inflamasi, dan vesikel ekstraseluler di dalamnya (Eleuteri & Fierabracci, 2019). Kandungan SH-MSCs yang terlibat dalam penurunan TNF- α yaitu *Protein Galectin-1* (Gal-1) yang berperan menghambat proliferasi sel T CD4⁺ dan CD8⁺ (Gieseke et al., 2010), serta *Protein Galectin-9* (Gal-9) yang berperan dalam menginduksi kematian sel Th1 secara apoptosis dengan cara mengikat glikoreseptor *T cell Immunoglobulin Domain and Mucin Domain-3* (TIM-3). Gal-9 selain diregulasi secara intraseluler dalam MSCs juga dapat meningkatkan jumlahnya karena adanya stimuli sitokin pro-inflamasi (Gieseke et al., 2013).

Temuan penelitian ini juga mendukung hasil penelitian Sazli et al. (2023) bahwa SH-MSCs mengandung berbagai molekul terlarut aktif diantaranya yaitu sitokin dan faktor pertumbuhan yang dapat menginduksi regenerasi anti-inflamasi dan vaskular pada tikus DM dengan Penyakit Arteri Perifer (PAP). Penelitian tersebut menemukan sejumlah faktor pertumbuhan meliputi VEGF, PDGF, TGF- β , dan IL-10. IL-10 dapat menurunkan kondisi inflamasi kronis dengan cara menghambat Th1 dan Th17 dan meningkatkan aktivasi dari Treg (Hamra et al., 2021). IL-10 mengaktivasi *Signal Transducer and Activator Of Transcription-3* (STAT 3) untuk menghambat NF-kB agar tidak dapat menginduksi proses apoptosis sel β pankreas secara lebih lanjut. STAT 3 juga menghambat *Signal Transducer and Activator Of Transcription-1* (STAT 1) dari hasil jalur pensinyalan IFN- γ sehingga mencegah proses apoptosis sel β pankreas (Tsai et al., 2019).

TGF- β dapat berfungsi sebagai antiinflamasi dengan bertindak sebagai *supressor* sel T yang merupakan mediator destruksi autoimun pada sel β pankreas (Ningrum & Kurniawaty, 2019). Sel T yang teraktivasi dapat mensintesis sitokin proinflamasi semacam TNF- α , limfotoksin dan juga IFN- γ , maka supresi sel T oleh TGF- β dapat menurunkan beberapa sitokin proinflamasi tersebut (Kay *et al.*, 2000). TGF- β berperan mengaktivasi *Mitogen-Activating Protein Kinase* (MAPK) sehingga terjadi peningkatan faktor transkripsi pankreas yaitu *Neurogenin-3* (Ngn-3) serta *Pancreatic and Duodenal Homebox-1* (PDX-1) yang berperan penting pada diferensiasi, pembentukan, serta regenerasi sel β pankreas (Kubo *et al.*, 2011).

PDGF berperan dalam inisiasi inflamasi dan pertumbuhan sel islet (Zakariya & Putra, 2018). PDGF berperan sebagai regulator proliferasi sel β pankreas (Liu *et al.*, 2020), sedangkan VEGF berperan dalam mengatur angiogenesis, permeabilitas vaskular, dan pembentukan fenestrasi endotel di pankreas (Supit, *et al.*, 2015; Wulandari *et al.*, 2022). VEGF memproteksi kelangsungan hidup dan meningkatkan viabilitas sel β pankreas (Sun *et al.*, 2022).

Pelepasan TNF- α pada DMT1 mengaktivasi sel-sel imun adaptif dan berkaitan dengan peningkatan ROS pada pankreas. Pada penelitian terdahulu disebutkan bahwa pemberian SH-MSCs dapat mencegah stres oksidatif melalui penghambatan ekspresi IL-6 pada tikus DMTI. Efek penghambatan IL-6 tersebut terkait dengan keberadaan sitokin anti-inflamasi IL-10 dan TGF- β dalam SH-MSCs. IL-10 menghambat IL-6 melalui upregulasi

ekspresi gen *Superoxide Dismutase* (SOD) (Utami et al., 2023), sedangkan TGF- β menghambat IL-6 melalui reduksi ekspresi reseptor IL-6 (Wiegertjes et al., 2019). Penurunan kadar TNF- α oleh karena efek injeksi SH-MSCs juga dapat disebabkan oleh penghambatan ekspresi IL-6, karena IL-6 berkorelasi positif dengan TNF- α (Popko et al., 2010). Penelitian Sutrisman et al. (2022) melaporkan bahwa penurunan kadar TNF- α terjadi karena injeksi SH-MSCs dapat meningkatkan kadar IL-10 pada tikus DMT1.

Pengaruh injeksi SH-MSCs pada kadar TNF- α tikus model DMT1 juga menunjukkan pola terkait dosis (*dose dependent relationship*), karena pada dosis lebih rendah (0,5 ml) menghasilkan kadar TNF- α yang tidak berbeda signifikan dengan kadar TNF- α tikus kontrol; dan pada injeksi SH-MSCs dosis 1,0 ml secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan tikus kontrol pada tikus di DMT1. Dosis SH-MSCs yang lebih rendah (0,5 ml) terkait dengan kandungan sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, protein, faktor anti-inflamasi serta vesikel ekstraseluler yang juga lebih rendah daripada dosis yang lebih tinggi (1,0 ml), sehingga mempengaruhi efikasinya. Penggunaan SH-MSCs dosis 0,5 ml sudah tampak penurunan kadar TNF- α , namun belum signifikan. Hal ini juga dapat disebabkan karena durasi pemberian SH-MSCs yang kurang lama (Sutrisman, et al., 2022).

Penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu hanya mengamati pengaruh injeksi SH-MSCs pada penurunan salah satu sitokin pro-inflamasi yaitu TNF- α . Pengukuran kadar gula darah pada akhir penelitian tidak dilakukan, pada aspek klinis pengukuran kadar gula darah penting untuk dilakukan.

Pemeriksaan histopatologi sel β pankreas juga tidak dilakukan sehingga belum diketahui bagaimana pengaruh SH-MSCs pada regenerasi sel β pankreas pada tikus model DMT1. Regenerasi sel β pankreas dapat diamati dari replikasi keberadaan sel β dan pembentukan sel-sel β pankreas baru dari sel-sel yang tidak mengekspresikan insulin baik melalui konversi tipe sel yang berdiferensiasi (*transdifferensiasi*) atau diferensiasi dari progenitor (*neogenesis*) (Aguayo-Mazzucato & Bonner-Weir, 2018).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Injeksi *Secretome Hypoxia* MSCs (SH-MSCs) dosis 1,0 ml berpengaruh terhadap kadar TNF- α pada tikus model diabetes tipe 1 yang diinduksi dengan streptozotocin, sedangkan pada dosis 0,5 ml tidak berpengaruh.

5.2. Saran

Saran dilakukan penelitian selanjutnya mengenai:

1. Pengaruh SH-MSCs terhadap kadar gula darah pada tikus model diabetes tipe 1 yang diinduksi dengan streptozotocin.
2. Pengaruh SH-MSCs terhadap gambaran sel β pankreas pada tikus model diabetes tipe 1 yang diinduksi dengan streptozotocin.
3. Penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan terapi *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) dosis 0,5 ml dengan durasi yang lebih lama.
4. Penelitian lebih lanjut mengenai efek samping dari pengaruh pemberian SH-MSCs pada tikus model diabetes tipe 1 yang diinduksi dengan streptozotocin.

DAFTAR PUSTAKA

- Afdal, A. and Rini, E.A. (2012) 'Neglected-noncompliant type 1 diabetes mellitus with complications', *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(2). doi:10.25077/jka.v1i2.61.
- Aguayo-Mazzucato, C. & Bonner-Weir, S. (2018). Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metabolism*, 27(1): 57–67. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.007.
- Agus, R.P. (2019) 'Mekanisme Resistensi Insulin Terkait Obesitas', *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 8(2), pp. 354–358. doi:https://doi.org/10.35816/jiskh.v10i2.190.
- Akash, M.S., Rehman, K. and Liaqat, A. (2017) 'Tumor necrosis factor-alpha: Role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus', *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), pp. 105–110. doi:10.1002/jcb.26174.
- Al-Azzawi, B. *et al.* (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), pp. 1–12. doi:10.2174/1876893802006010001.
- Barygina, V. *et al.* (2015) 'Treatment with low-dose cytokines reduces oxidative-mediated injury in perilesional keratinocytes from Vitiligo Skin', *Journal of Dermatological Science*, 79(2), pp. 163–170. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.05.003.
- Bazzaz, J.T. *et al.* (2014) 'TNF- α and IFN- γ gene variation and genetic susceptibility to type 1 diabetes and its microangiopathic complications', *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13(1). doi:10.1186/2251-6581-13-46.
- Benavides-Castellanos, M.P., Garzón-Orjuela, N. and Linero, I. (2020) 'Effectiveness of mesenchymal stem cell-conditioned medium in bone regeneration in animal and human models: A systematic review and meta-analysis', *Cell Regeneration*, 9(1). doi:10.1186/s13619-020-00047-3.
- Berebichez-Fridman, R. and Montero-Olvera, P.R. (2018) 'Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells: State-of-the-art review', *Sultan Qaboos University Medical Journal [SQUMJ]*, 18(3), p. 264. doi:10.18295/squmj.2018.18.03.002.
- Burrack, A.L., Martinov, T. and Fife, B.T. (2017) *T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes*, *Frontiers*. Available at: https://doi.org/10.3389%2Ffendo.2017.00343 (Accessed: July 2022).

- Cnop, M. *et al.* (2005) 'Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes', *Diabetes*, 54(suppl_2). doi:10.2337/diabetes.54.suppl_2.s97.
- DiMeglio, L.A., Evans-Molina, C. and Oram, R.A. (2018) 'Type 1 diabetes', *The Lancet*, 391(10138), pp. 2449–2462. doi:10.1016/s0140-6736(18)31320-5.
- Dupont NC., Wang K., Wadhwa PD., Culhane JF., Nelson EL. 2005. *Validation and comparison of LUMINEX multiplex cytokine analysis kits with Elisa: Determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants.* Journal of reproductive immunology. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16029895/>.
- Ekasaputra, V.M. *et al.* (2022) 'Combination of sleeve gastrectomy and mesenchymal stem cells improves insulin resistance by modulating pro-inflammatory milieu in obese type 2 diabetic rat model', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 10(B), pp. 158–163. doi:10.3889/oamjms.2022.8211.
- Eleuteri, S. & Fierabracci, A. 2019. eleuteri_Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications - PMC. *Int J Mol Sci*, 20(18): 4597. doi:10.3390/ijms20184597.
- Ezquer, F. *et al.* (2012) 'The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore th1/th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment', *STEM CELLS*, 30(8), pp. 1664–1674. doi:10.1002/stem.1132.
- Fourlanos, S. *et al.* (2014) 'Higher body mass index in adults at diagnosis of the slowly progressive form of type 1 diabetes mellitus is associated with lower risk HLA genes', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 104(3). doi:10.1016/j.diabres.2014.03.009.
- Francés, D.E. *et al.* (2013) 'Diabetes, an inflammatory process: Oxidative stress and TNF-alpha involved in hepatic complication', *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 06(06), pp. 645–653. doi:10.4236/jbise.2013.66079.
- Gieseke, F., Bohringer, J., Bussolari, R., Dominici, M., Handgretinger, R. & Muller, I. 2010. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*, 116(19): 3770–3779.
- Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., Dominici, M. & Müller, I. 2013. Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, 43(10): 2741–2749. doi:10.1002/eji.201343335.

- Goyal, R. and Jialal, I. (2022) *Type 2 diabetes*, *StatPearls*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/> (Accessed: July 2022).
- Gunawan, S., & Rahmawati, R. (2021). *Hubungan Usia, Jenis Kelamin Dan Hipertensi Dengan Kejadian diabetes mellitus tipe 2 di Puskesmas Tugu Kecamatan Cimanggis kota depok tahun 2019*. ARKESMAS (Arsip Kesehatan Masyarakat). <https://journal.uhamka.ac.id/index.php/arkesmas/article/view/5829>.
- Hamra, N.F. *et al.* (2021) 'Hypoxia mesenchymal stem cells accelerate wound closure improvement by controlling α -smooth muscle actin expression in the full-thickness animal model', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(A), pp. 35–41. doi:10.3889/oamjms.2021.5537.
- Hidayaturrahmah, Budi Santoso, H., Aulia Rahmi, R. & Kartikasari, D. 2020. Blood glucose level of white rats (*Rattus norvegicus*) after giving catfish biscuit (*Pangasius hypophthalmus*). *BIO Web of Conferences*, 20: 04005.
- Irawati, L. (2014). Hubungan tumor necrosis factor-alfa (TNF-A) dengan kadar hemoglobin Dan Parasitemia Pada infeksi malaria falciparum. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3(2). <https://doi.org/10.25077/jka.v3i2.36>.
- Jang, D. *et al.* (2021) 'The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), p. 2719. doi:10.3390/ijms22052719.
- Kahanovitz, L., Sluss, P.M. and Russell, S.J. (2017) 'Type 1 diabetes—a clinical perspective', *Point of Care: The Journal of Near-Patient Testing & Technology*, 16(1), pp. 37–40. doi:10.1097/poc.000000000000125.
- Kemenkes RI (2021) *Pola Hidup Sehat dan Deteksi Dini Bantu Kontrol Gula Darah Pada Penderita Diabetes*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Available at: <https://www.kemkes.go.id/article/view/21111600001/pola-hidup-sehat-dan-deteksi-dini-bantu-kontrol-gula-darah-pada-penderita-diabetes.html> (Accessed: August 2022).
- Kubo, A., Stull, R., Takeuchi, M., Bonham, K., Gouon-Evans, V., Sho, M., Iwano, M., Saito, Y., Keller, G. & Snodgrass, R. 2011. Pdx1 and Ngn3 overexpression enhances pancreatic differentiation of mouse ES cell-derived endoderm population. *PLoS ONE*, 6(9).
- Liu, X., Zhang, F., Chai, Y., Wang, L. & Yu, B. 2020. The role of bone-derived PDGF-AA in age-related pancreatic β cell proliferation and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(1): 22–27.

- Lucier, J. and Weinstock, R.S. (2023) *Type 1 Diabetes*, *StatPearls*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507713/> (Accessed: August 2022).
- Marzel, R. (2020) 'Terapi Pada DM tipe 1', *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 3(1), pp. 51–62. doi:10.37287/jpppp.v3i1.297.
- Mathew, P. and Thoppil, D. (2021) *Hypoglycemia*, *StatPearls*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534841/> (Accessed: 20 January 2023).
- Moreira, A., Kahlenberg, S. and Hornsby, P. (2017) 'Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes', *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(3). doi:10.1530/jme-17-0117.
- Muhar A.M., Putra A., Warli SM., Munir. (2018). *Hypoxia-mesenchymal stem cells inhibit intra-peritoneal adhesions formation by upregulation of the Il-10 expression*. Open access Macedonian journal of medical sciences. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32165932/>
- Nugraha, A. and Putra, A. (2018) 'Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats', *Universa Medicina*, 37(2), pp. 135–142. doi:10.18051/univmed.2018.v37.135-142.
- Popko, K., Gorska, E., Stelmaszczyk-Emmel, A., Plywaczewski, R., Stoklosa, A., Gorecka, D., Pyrzak, B. & Demkow, U. 2010. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *European Journal of Medical Research*, 15(2): 120–122.
- Putra, A. et al. (2021) 'The role of mesenchymal stem cells in regulating PDGF and VEGF during pancreatic islet cells regeneration in diabetic animal model', *Folia Medica*, 63(6), pp. 875–883. doi:10.3897/folmed.63.e57636.
- Sandyarani, D. (2022) *Pengaruh sekretom hypoxia mesenchymal stem cells terhadap peningkatan ekspresi gen VEGF dan PDX1 sel β pancreas*, *Unissula Institutional Repository*. thesis. Available at: <http://repository.unissula.ac.id/id/eprint/25174> (Accessed: 29 January 2023).
- Sazli, B.I., Lindarto, D., Hasan, R., Putra, A., Pranoto, A., Sembiring, R.J., Ilyas, S. & Syafril, S. 2023. Sazli_Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease - PMC. *Med Arch*, 77(2): 90–96.

- Soemarwoto, R. A., Putri, M., Esfandiari, F., Triwahyuni, T., & Setiawan, G. 2019. *Hubungan diabetes melitus terhadap derajat Berat Penyakit Paru obstruktif kronis (PPOK) Di Klinik Harum Melati Pringsewu Provinsi Lampung*. Jurnal Kedokteran Universitas Lampung. <https://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/JK/article/view/2293>.
- Sokolovska, J. *et al.* (2020) 'Nitric oxide metabolism is impaired by type 1 diabetes and diabetic nephropathy', *Biomedical Reports* [Preprint]. doi:10.3892/br.2020.1288.
- Sun, F., Sun, Y., Wu, F., Xu, W. & Qian, H. 2022. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Potential Therapy for Diabetes Mellitus and Diabetic Complications. *Pharmaceutics*, 14(10).
- Supit, I.A., Pangemanan, D.H.C. and Marunduh, S.R. (2015) 'Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNSRAT Angkatan 2014', *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 3(2), pp. 640–643.
- Susantiningsih, T., & Mustofa, S. (2018). *Ekspresi IL-6 dan TNF- α pada obesitas*. Jurnal Kedokteran Universitas Lampung. <https://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/JK/article/view/1956/1923>.
- 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 Diabetes Rats. *International Journal of Cell and Biomedical Science*, 1: 2–10.
- Swinkels, M. *et al.* (2018) 'Emerging concepts in immune thrombocytopenia', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 880. doi:10.3389/fimmu.2018.00880.
- Szablewski, L. (2014) 'Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis', *International Immunopharmacology*, 22(1), pp. 182–191. doi:10.1016/j.intimp.2014.06.033.
- Taylor, A. *et al.* (2006) 'Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: The role of T Regulatory Cells', *Immunology*, 117(4), pp. 433–442. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x.
- Tsai, M.H., Pai, L.M. & Lee, C.K. 2019. Fine-tuning of type I interferon response by STAT3. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN): 1–10.

- Utami, A., Putra, A., Wibowo, J.W., Amalina, N.D. & Satria Irawan, R.C. 2023. Hypoxic secretome mesenchymal stem cells inhibiting interleukin-6 expression prevent oxidative stress in type 1 diabetes mellitus. *Medicinski Glas (Zenica)*, 20(2): 176–183. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37300468>.
- Vincenz, L. *et al.* (2011) ‘Cytokine-induced β -cell stress and death in type 1 diabetes mellitus’, *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments* [Preprint]. doi:10.5772/22765.
- Wajchenberg, B.L. (2007) ‘ β -Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment’, *Endocrine reviews*, 28(22), pp. 187–218. doi:<https://doi.org/10.1210/10.1210/er.2006-0038>.
- Waseem, M. *et al.* (2016) ‘Hypoxic preconditioning improves the therapeutic potential of aging bone marrow mesenchymal stem cells in streptozotocin-induced type-1 diabetic mice’, *Cellular Reprogramming*, 18(5), pp. 344–355. doi:10.1089/cell.2016.0002.
- Wulandari, E.L. *et al.* (2022) ‘Efek secretome Sel Punca mesenkimal TERHADAP Ekspresi interleukin 17 dan tumor necrosis factor alpha’, *Smart Medical Journal*, 5(1), p. 52. doi:10.13057/smj.v5i1.48954.
- Yang, S.-H. *et al.* (2009) ‘Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10’, *Experimental and Molecular Medicine*, 41(5), p. 315. doi:10.3858/emm.2009.41.5.035.
- Yuniarti, E. (2017). *Perbedaan Kadar tumor necrosis factor - alfa antara diabetes mellitus Tipe 2 Terkontrol Dengan Tidak Terkontrol*. Bioscience. <https://ejournal.unp.ac.id/index.php/bioscience/article/view/7186>.
- Zakariya, H. S. & Putra, A. (2018) ‘Peran mesenchymal stem cells Dalam regulasi PDGF Dan Sel Islet Pada diabetes’, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 30(2), pp. 98–102. doi:10.21776/ub.jkb.2018.030.02.4.