

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*
STEM CELLS TERHADAP KADAR VEGF
(Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)**

SKRIPSI

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun Oleh:

Finanda Jumena Asmara Lintang

30101900084

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2023

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*
STEM CELLS TERHADAP KADAR VEGF**

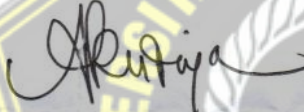
(Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh
Finanda Jumena Asmara Lintang
30101900084

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


Susunan Tim Penguji

Pembimbing I


dr. Arini Dewi Antari,

M. Biomed

Penguji I


dr. Azidah Retno Kustiyah, Sp.A.,

M. Biomed

Pembimbing II


Assoc Prof. Dr. dr. Agung

Putra, M, Si. Med

Penguji II


Dr. Rizkie Woro Hastuti,

M. Biomed

Semarang, Januari 2023

Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
Dekan,


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

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Finanda Jumena Asmara Lintang

NIM : 30101900084

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM *HYPOXIA MESENCHYMAL*
STEM CELS TERHADAP KADAR VEGF**

(Studi Eksperimental pada Tikus Model Diabetes 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 sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 30 November 2022

Yang menyatakan,



Finanda Jumena Asmara Lintang

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT berkat segala rahmat dan karunia-Nya penulis sudah diberikan ketabahan, kesehatan, kekuatan, kesabaran, alhasil mampu menuntaskan secara baik skripsi dengan judul, “Pengaruh Pemberian Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* Terhadap Kadar VEGF (Studi Eksperimental Pada Tikus Model Diabetes Tipe 1)” sebagai suatu persyaratan untuk menuntaskan studi dan memperoleh 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. dr.Arini Dewi Antari,M.Biomed dan Assoc Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M. Si, Med, selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. dr. Azizah Retno Kustiyah,Sp.A.,M.Biomed dan dr. Rizkie Woro Hastuti,M.Biomed, selaku dosen penguji yang telah dengan sabar

membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.

4. Staf Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang telah membantu dalam berjalannya penelitian ini.
5. Kedua Kedua orang tua saya tercinta Ibunda Purmini dan Ayahanda Bambang Jumena.
6. Ferian Andriansyah, Intan Permatasari, dan Tasya Lintang selaku sahabat saya dan orang yang selalu memberi dukungan semangat dan doa selama penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT, memberi balasan seluruh kebaikan maupun bantuan yang sudah diberi. Penulis berharap semoga penelitian ini mampu memberi manfaat kepada kita semuanya.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Semarang, 30 November 2022

Finanda Jumena A.L

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
INTISARI.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1. Tujuan Umum.....	6
1.3.2. Tujuan Khusus.....	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.4.2. Manfaat Praktis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Kadar VEGF.....	7
2.1.1. Pengertian.....	7
2.1.2. Isoform VEGF.....	8
2.1.3. Fungsi VEGF.....	9
2.2. Sekretom Hipoxia Mesenchymal Stem Cells (MSCs).....	10
2.2.1. Pengertian.....	10
2.2.2. Sumber.....	14
2.3. Diabetes Mellitus Tipe 1.....	15
2.3.1. Definisi.....	15

2.3.2. Patofisiologi	16
2.4. Hubungan Sekretom <i>Mesenchymal Stem Cells</i> terhadap Kadar VEGF..	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.....	22
3.2.2. Definisi Operasional.....	22
3.3. Populasi dan Sampel.....	23
3.3.1. Populasi	23
3.3.2. Sampel.....	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 <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> Tikus.....	25
3.5.2. Tahap Persiapan Passage.....	26
3.5.3. Proses <i>Passage</i> Sel.....	27
3.5.4. Proses Validasi Sel.....	27
3.5.5. Proses Pemanenan Sel.....	28
3.5.6. Proses Penghitungan Sel	28
3.5.7. Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom	29
3.5.8. Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1	29
3.5.9. Perlakuan pada Hewan Coba	31
3.5.10. Analisis Kadar VEGF Menggunakan ELISA	32
3.6. Alur Penelitian	35

3.7. Tempat dan Waktu.....	36
3.7.1. Tempat.....	36
3.7.2. Waktu	36
3.8. Analisis Hasil	36
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	37
4.1. Hasil Penelitian	37
4.1.1. Analisis Deskriptif	38
4.1.2. Deskriptif data.....	38
4.1.3. Distribusi Data	39
4.1.4. Analisis Bivariat.....	40
4.2. Pembahasan.....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
5.1. Kesimpulan	45
5.2. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN.....	50



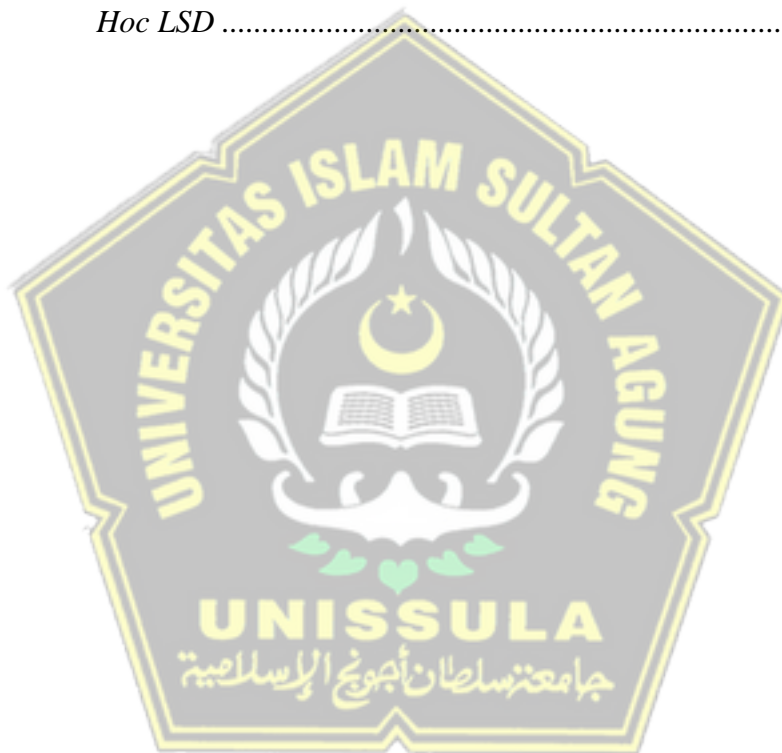
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Data Konfirmasi Tikus Penelitian	38
Tabel 4.2. Hasil Rerata Jumlah VEGF	38
Tabel 4.3. Hasil Uji Normalitas Jumlah Kadar VEGF	39
Tabel 4.4. Hasil uji Homogenitas Jumlah Kadar VEGF	40
Tabel 4.5. Hasil Uji One Way Anova	40
Tabel 4.6. Hasil Uji Post Hoc LSD	41



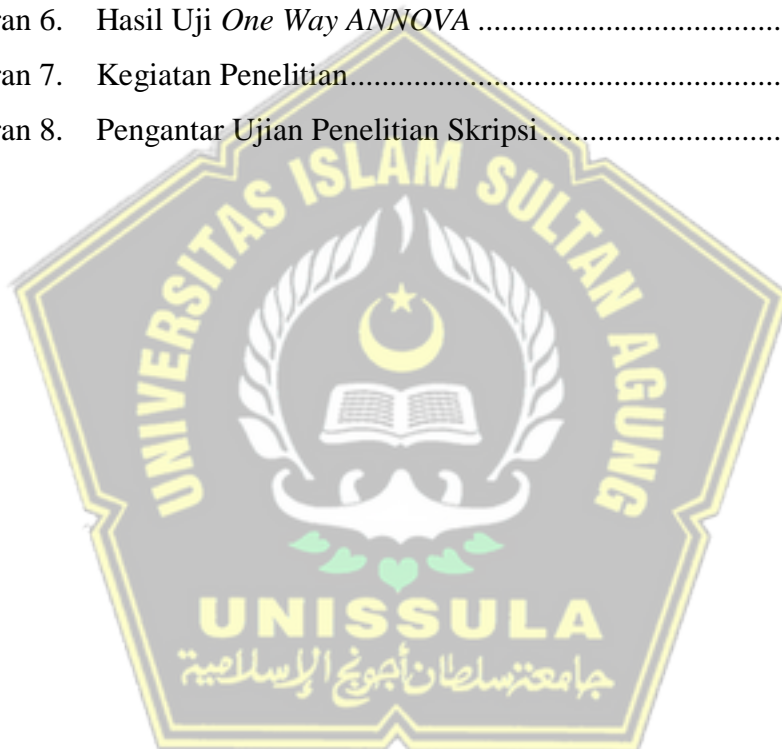
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Kerangka Teori.....	19
Gambar 2.2.	Kerangka Konsep	20
Gambar 3.1.	Skema rancangan penelitian post-test only group	21
Gambar 3.2.	Alur Penelitian.....	35
Gambar 4.1.	Grafik rerata Jumlah Kadar VEGF.....	39
Gambar 4.2.	Grafik Perbedaan Signifikan Kadar VEGF Berdasarkan Uji <i>Post Hoc LSD</i>	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian	50
Lampiran 2.	Surat keterangan Selesai Penelitian.....	51
Lampiran 3.	<i>Ethical Clearance</i>	52
Lampiran 4.	Data Penelitian.....	53
Lampiran 5.	Hasil Uji Deskriptif,Normalitas,dan Homogenitas Data Kadar VEGF.....	54
Lampiran 6.	Hasil Uji <i>One Way ANNOVA</i>	56
Lampiran 7.	Kegiatan Penelitian.....	57
Lampiran 8.	Pengantar Ujian Penelitian Skripsi	58



DAFTAR SINGKATAN

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

INTISARI

Diabetes Mellitus (DM) tipe 1 adalah kondisi ketika tubuh berhenti memproduksi insulin dikarenakan rusaknya sel β pankreas penghasil insulin. Dalam proses menyembuhkan luka, VEGF mempunyai peranan untuk angiogenesis dengan menstimulasikan proliferasi, migrasi serta organisasi sel endotel guna menciptakan tubulus pembuluh.

Mesenchymal Stem Cell (MSCs) dipercaya meningkatkan jumlah sel islet beta dengan menekan sitokin proinflamasi. Penggunaan sekretom *MSCs* pada DM diharapkan meningkatkan kadar VEGF.

Penelitian ini dilakukan di *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Universitas Islam Sultan Agung. Penelitian eksperimental menggunakan perancangan “*Post Test Only Control Group Design*” dengan memanfaatkan hewan coba tikus. Kelompok riset dibagi 3 kelompok yaitu, kelompok perlakuan yang mendapat injeksi sekretom *Hypoxia MSCs* 0,5 cc, 1 cc, serta kelompok kontrol. Induksi diabetes menggunakan STZ dilakukan 1 kali pada hari ke-6 pemeliharaan tikus setelah itu dilakukan randomisasi. Sedangkan pemberian terapi sekretom *Hypoxia-MSCs* dilakukan 1 kali pada minggu ke-3, pengambilan sampel pada minggu ke-4, untuk pengukuran kadar VEGF menggunakan ELISA. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan kadar VEGF pada kelompok perlakuan 1 maupun 2 terhadap kelompok kontrol ($P < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terapi sekretom *Hypoxia-MSCs* dapat meningkatkan kadar VEGF pada tikus model diabetes tipe 1.

Kata Kunci: *MSCs*, Sekretom *Hypoxia-MSCs*, VEGF.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Mellitus (DM) tipe 1 adalah kondisi ketika tubuh berhenti memproduksi insulin karena kerusakan sel β pankreas yang memproduksi insulin sehingga terjadi kenaikan glukosa di darah yang melampaui batasan normal. Bersumber pada faktornya, DMT1 terjalin sebab autoimun dan idiopatik, sebaliknya DMT2 lebih bermacam-macam ialah diakibatkan sebab pertahanan kepada insulin dan diiringi dengan defisiensi insulin relatif dan didominasi oleh defek sekresi insulin yang diiringi penahanan insulin. Sehingga perbedaan dari DMT1 dan DMT2 adalah pada DMT1, badan tidak menghasilkan insulin sebab proses autoimun yang menimbulkan sistem imunitas badan melanda sebagian sel yang terdapat di badan termasuk pankreas yang berperan menghasilkan insulin. Sebaliknya dalam DMT2, badan masih menghasilkan insulin tetapi berjumlah yang lebih dikit (Kahanovitz et al., 2017) (Perkumpulan Endokrinolog Indonesia, 2021). Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe-2 (DMT2) terjadi sebagai akibat kombinasi beberapa aspek yang berlangsung lama, dapat bertahun-tahun secara subklinis (Gill et al., 2010). Aspek-aspek tersebut adalah penurunan sekresi insulin, resistensi insulin, dan ominous octet. Patofisiologi DM tipe 2 mencakup kombinasi delapan kelainan patofisiologis yang dikenal pula dengan istilah ominous octet, yang meliputi, berkurangnya sekresi insulin dari sel β pankreas, peningkatan sekresi glukagon dari sel α pankreas,

peningkatan produksi glukosa di hepar, disfungsi neurotransmitter dan resistensi insulin di otak, peningkatan lipolisis, peningkatan reabsorpsi glukosa oleh ginjal, berkurangnya efek incretin di usus kecil dan gangguan atau penurunan uptake glukosa oleh jaringan seperti otot rangka, hati dan jaringan adiposa (Ojo et al., 2018). Organ pankreas yang tidak lagi memproduksi insulin, mengakibatkan penderita wajib mendapatkan suplai insulin dari luar tubuh dengan cara rutin. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) diakui berkontribusi terhadap terjadinya hipoksia pada jaringan serta memiliki peran sebagai zat proangiogenesis yang potensial pada DM. *Mesenchymal Stem Cell (MSCs)* dapat dipercaya dapat meningkatkan jumlah sel islet beta pancreas melalui penekanan kerusakan inflamasi dan penolakan antigen yang dimediasi kekebalan. Penggunaan sekretom *MSCs* pada DM agar mengamati apakah ada kenaikan ataupun pengurangan dalam kadar VEGF.

Gejala DMT1 umumnya timbul saat berusia anak-anak ataupun remaja, tetapi dapat pula dirasakan saat berusia dewasa. (Yahaya & Salisu, 2020). Berdasarkan data World Health Organization (WHO) (2021) didapatkan hasil bahwa terdapat 9.000.000 orang dengan penderita DM tipe 1 yang hidup di negara dengan tingkat pendapatan yang tinggi. Data ini meningkat jauh dari data tahun 2020 dimana pada periode tersebut hanya terdapat 2.900.000 orang yang mengalami DM tipe 1 (American Diabetes Association, 2020). Kegawatan DM tipe 1 dapat menyebabkan hiperglikemia, risiko dalam penyakit jantung koroner, serangan jantung,

hipertensi, kolesterol tinggi, trigliserida tinggi, stroke,serta gagal jantung, hipoglikemia, kerusakan saraf (neuropati), kerusakan ginjal (nefropati), ulkus diabetikum, kerusakan mata, infeksi kulit dan mulut, disfungsi seksual serta komplikasi kehamilan baik bagi ibu hamil maupun janin dikandungnya (DiMeglio et al., 2018).Holman et al. (2022) menyatakan bahwa pasien penderita DM tipe 1 dengan usia 20 hingga 39 tahun memiliki risiko yang lebih tinggi dalam tingkat kematian akibat DM tipe 1 dengan penyakit kardiovaskular sebagai penyebab utamanya. Dengan besarnya angka kejadian DM tipe 1 dan berujung pada kematian membuat perlunya berbagai macam terapi untuk dapat mengontrol diabetes dan menunda komplikasi dari pasien. seperti dengan menggunakan rekayasa analog insulin, walaupun demikian, keterbatasan dari terapi ini adalah efek samping yang dapat dialami oleh pasiennya seperti efek penurunan glukosa yang tidak stabil yang menyebabkan hipoglikemia berkepanjangan (Aghazadeh & Nostro, 2017). DM tipe 1 dapat diupayakan dengan transplantasi pankreas dari donor kepada penderita DM tipe 1. Namun permasalahan dengan transplantasi adalah sering terjadi ketidak cocokan antara organ donor dengan penerima (resipen) yang berakibat pada kegagalan terapi.(Rahmasari & Wahyuni, 2019). Dimana akan terjadi immune rejection yang terjadi ketika jaringan yang ditransplantasikan ditolak oleh sistem immune penerima,yang menghancurkan jaringan yang ditransplantasikan.Hal ini membuat pentingnya adanya terapi yang aman yang dapat digunakan untuk mengatasi komplikasi akibat DM tipe 1 salah satunya dengan sekretom

MSCs. Pada DM tipe 1, *MSCs* dapat menawarkan penyembuhan lengkap pada lokasi luka cedera, termasuk peningkatan populasi sel, pembentukan matriks ekstraseluler, pelepasan sitokin, dan induksi pembentukan pembuluh darah baru (Chehelcheraghi et al., 2019).

Angiogenesis adalah proses biologis krusial yang ikut serta pada komplikasi mikrovaskuler penderita DM (Zhang et al., 2018). VEGF ialah faktor proangiogenesis yang tingkatan permeabilitas vaskuler dan mengaktifkan sel endotel yang mana efek biologis dimediasikan oleh jalinan VEGF dengan reseptor ialah reseptor 1 dan 2 (VEGFR-1 and VEGFR-2) (Chehelcheraghi et al., 2019). Sehingga, VEGF berperan penting dalam kejadian disfungsi endotel pasien DM yang dapat mengakibatkan komplikasi mikrovaskuler (Zhang et al., 2018). *MSCs* dapat digunakan sebagai salah satu terapi yang aman dalam mengatasi komplikasi akibat DM tipe 1 (Volarevic et al., 2011). *MSCs* terdapat di banyak jaringan, termasuk sumsum tulang dan jaringan lemak. Terapi *MSCs* sebagai kandidat terapi sel yang mungkin karena karakteristik vaskulogeniknya. Penelitian Ibrahim et al. (2020) telah melaporkan bahwa *MSCs* yang diturunkan dari adiposa meningkatkan pembentukan darah baru pada model tikus RSF diabetes dengan ekspresi faktor-1 melalui VEGF yang diinduksi hipoksia (HIF-1) α . Terapi *MSCs* secara histologis dapat meningkatkan regenerasi sel β pankreas lebih signifikan dibandingkan *MSCs* normoksik (tanpa pengondisian awal) setelah ditransplantasikan ke tikus model diabetes (Waseem et al., 2016). *MSCs* dapat dianggap sebagai "generator biologis"

untuk pelepasan banyak sitokin sehingga dapat meningkatkan kadar VEGF. VEGF diasumsikan memiliki peran dalam patogenesis diabetik polineuropati melalui mekanisme hipoksia terinduksi, dan berperan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. (Zhang et al., 2018). *MSCs* yang dikondisikan hipoksia akan mensekresikan sekretom dengan tingkat yang lebih tinggi, (Ferreira et al., 2018). Diharapkan *MSCs* yang bersifat imunodulator dapat menghentikan produksi autoantibodi terhadap sel beta pankreas, sehingga menghalangi degenerasinya.

Sekretom merupakan sekret *MSCs* berupa faktor trofik, sitokin imunomodulator, kemokin, faktor pertumbuhan, protein, dan vesikel ekstraseluler yang diharapkan memiliki kemampuan yang sama dengan *MSCs* itu sendiri (Ahangar & Mills, 2020; Eleuteri & Fierabracci, 2019). Kemampuan regeneratif *MSCs* melalui aksi parakrinnya, telah membuka strategi baru terapi bebas sel untuk pengobatan yang bersifat regeneratif (González-González et al., 2020). Sehingga penelitian ini ingin mengetahui pengaruh sekretom *MSCs* terhadap kadar VEGF pada tikus model diabetes tipe 1.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian sekretom *Mesenchymal Stem Cells* berpengaruh terhadap kadar VEGF pada tikus model DM tipe 1?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh dari sekretom Hypoxia MSCs terhadap kadar VEGF pada tikus model DM tipe 1.

1.3.2. Tujuan Khusus

Membuktikan peningkatan kadar VEGF tikus model DM pada kelompok perlakuan dengan sekretom Hypoxia-MSCs dosis 0,5 cc dan 1 cc yang dibandingkan dengan control.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan sekretom MSCs terhadap kadar VEGF 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 MSCs terhadap kadar VEGF tikus model DM tipe 1.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kadar VEGF

2.1.1. Pengertian

Pembuatan pembuluh darah mencakup atas vaskulogenesis serta angiogenesis. Vaskulogenesis ialah pembedaan prekursor sel endotel, angioblas yang berawal melalui hemangioblas. Angiogenesis ialah pembuluh darah baru yang berawal melalui pembuluh darah yang telah tersedia. Angiogenesis diaturkan dari penyeimbang sistem pengawasan yang rumit diantara beragam faktor proangiogenik maupun faktor antiangiogenik. Saat situasi normal, pembuatan pembuluh darah yang baru terjalin dalam pengobatan cedera, re-generasi organ, sistem reproduksi perempuan sepanjang ovulasi, haid dan pembuatan plasenta (Ferrara, 2004).

Peran VEGF dalam regulasi angiogenesis sudah banyak diawasi. Saat 1983, Senger et al melabeli anasir ini sebagai tumor vascular permeability factor (VPF). Ada banyak pembuktian bila perkembangan dan maturasi pembuluh darah yang baru ialah proses yang rumit dan terkoordinasikan mengaitkan bermacam reseptor maupun VEGF berfungsi krusial (Shibuya, 2011; Ferrara, 2004).

VEGF adalah protein yang berperan selaku faktor perkembangan dalam angiogenesis. VEGF mempunyai homologi dengan PDGF mempunyai 8 struktur sistein. Gen VEGF manusia

mencakup atas 8 ekson dan 7 intron berada pada kromosom 6p21.3 (Ferrara, 2004). Terdapat 5 jenis VEGF pada manusia, yakni VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan PlGF. VEGF homolog pula ditemui dalam genom parapoxvirus, Orf virus. VEGF-C dan VEGF-D menata angiogenesis sistem limfe. Isoform ini berlainan pada masa anasir serta fungsi biologis (Hoeben et al, 2004). VEGF diperoleh berbagai sel badan dengan ekspresi gen yang tidak sama, Tinggi: glomerulus, plexus koroid, pankreas, batin; lagi: otot skelet, otot jantung; dan rendah: retina- blood barrier, testis- blood barrier, brain blood- barrier (Maharaj & D'amore, 2007).

2.1.2. Isoform VEGF

Prototipe VEGF ialah VEGF-A. VEGF-A ialah faktor kunci pada induksi angiogenesis serta vaskulogenesis dengan mempunyai ikatan ke VEGFR-2. VEGF A ialah glikoprotein berupa dimer dengan jalinan disulfida mempunyai berat 32- kDa sampai 42- kDa. VEGF- A mempunyai 7 isoform homodimer ialah monomer yang terdiri dari 121, 145, 148, 165, 183, 189 dan 206 asam amino. Diantara monomer itu VEGF- A165 mempunyai jumlah paling banyak dengan efek yang sangat besar bagi manusia (Shibuya, 2011). Dalam jaringan secara normal, VEGF- A mRNA ditemui dengan kandungan yang tinggi di ginjal, alat pernapasan, jantung dan kelenjar adrenal. Sebaliknya VEGF- A ditemui adanya kandungan yang lebih rendah di hati, spleen serta mukosa gaster.

VEGF-A dieskpresikannya dari beragam sel maupun jaringan semacam otot jantung, otot skelet, hepatosit, osteoblas, makrofag, neutrofil, keratinosit, CD34 stem sel, jaringan adipose, broblast, sel endotel otot polos pembuluh darah (Hoeben et al, 2004). VEGF- A berfungsi untuk meningkatkan permeabilitas dan vasodilatasi lewat nitric oxide(Nomor)- dependent pathway melalui aktivasi endothelial No sintase untuk menciptakan Nomor. VEGF- A meningkatkan survival sel endotelial dengan menginduksikan ekspresi protein antiapoptosis lewat aktivasi phosphatidylinositol-3-kinase pathways (Hoeben et al, 2004).

2.1.3. Fungsi VEGF

Fungsi VEGF ialah yakni:

a. Angiogenesis, survival endotel dan mitogenesis

Secara *in vitro*, VEGF bisa memotivasi perkembangan sel endotel dari jaringan nadi, vena maupun pembuluh limfe. VEGF pula berfungsi sebagai faktor survival sel endotel. VEGF mencegah apoptosis sel endotel. Kegiatan ini dimediasikan dari PI3- kinase(PI3 kinase) atau Akt pathway. VEGF pula menginduksi ekspresi protein anti apoptosis Bcl- 2, A1, XIAP dan survivin pada sel endotel. Inhibisi gen VEGF menimbulkan apoptosis yang ensiklopedis pada vaskular neonatal tikus. Walaupun sel endotel adalah sasaran utama VEGF, sebagian riset memberi tahu efek mitogenik VEGF dalam sel epitel

pigmen retina, sel duktus pankreas dan sel Schwan (Ferrara, 2004).

b. Efek VEGF dalam sel sumsum tulang dan hematopoiesis

VEGF bisa menginduksikan kemotaksis monosit, maturasi granulocytemacrophage progenitor cell dan tingkatan produksi sel B.

c. Memberi peningkatan permeabilitas vaskular dan efek hemodinamik

Aktivitas menaikkan permeabilitas vaskular mempunyai peranan dalam efek VEGF ketika keadaan inflamasi. Efek ini diperantarainya dari NO.

2.2. Sekretom Hipoxia Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2.2.1. Pengertian

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) adalah sel punca dewasa prototipik dengan kapasitas untuk memperbarui diri dan berdiferensiasi dengan distribusi jaringan yang luas. *MSCs* memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jaringan turunan mesodermal dan non-mesodermal. Peran *MSCs* di endogen adalah pemeliharaan dari sel induk, dan karena itu *MSCs* berpartisipasi dalam homeostasis organ, penyembuhan luka, dan successful aging. Dari perspektif terapeutik, *MSCs* muncul sebagai agen yang sangat menjanjikan untuk regenerasi jaringan (Williams & Hare, 2011). Sekretom memiliki kandungan berbagai faktor regenerative yaitu

sitokin dan faktor pertumbuhan yang mampu mempromosikan dan memodulasi pembentukan jaringan baru (Benavides-Castellanos et al., 2020).

MSCs adalah sel yang mampu untuk berdiferensiasi menjadi jenis tipe sel tertentu. *MSCs* 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 *MSCs*, yaitu : *MSCs* pluripotent, yang dapat menjadi sel apa pun dalam tubuh orang dewasa, dan multipoten yang memiliki kemampuan terbatas dalam berubah menjadi populasi sel jenis tertentu (Biehl & Russell, 2009).

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

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

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)

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

mekanisme pensinyalan saluran kalium Kv2.1. (Moreira et al., 2017).

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

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

Dalam hipoksia, bagaimanapun, subunit HIF- α lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerisasi dengan HIF-1 β dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi

peralihan dari metabolisme bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik (Fabian, 2019). HIF-1 α diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 α dan HIF-3 α diekspresikan pada jaringan yang lebih terbatas dan pada tahap perkembangan, seperti paru-paru janin atau endotel vaskular yang berkembang. Dalam merefleksikan pola ekspresi jaringan spesifik mereka, HIF-1 α memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respons terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 α dan HIF-3 α memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen (Chen et al., 2020).

2.2.2. Sumber

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

Sumber MSCs yang sudah diteliti hingga kini yaitu (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018): Sumsum tulang/ Bone Marrow (BM), Pulpa gigi, Jaringan lemak/ Adipocyte Tissue (AT), Jaringan yang berasal dari kelahiran (*Birth-derived tissues* : *Umbilical cord* (UCB), *Warthon jelly*, Kondrosit), Otot, Cairan amnion dan plasenta, Cairan synovium dan synovial, Darah tepi, Kulit, dan Endometrium

2.3. Diabetes Mellitus Tipe 1

2.3.1. Definisi

Diabetes Mellitus tipe 1 (DMT1) merupakan kondisi ketika glukosa dalam darah naik melebihi batas normal sebagai akibat dari tubuh tidak menghasilkan cukup insulin. Hormon insulin yang dihasilkan oleh pancreas berfungsi untuk mengontrol kadar glukosa dalam darah. Kala makanan yang memasuki tubuh dicerna dan memasuki peredaran darah, insulin membuat gula(glukosa) di darah memasuki kesel agar diganti jadi tenaga(DiMeglio et al., 2018). Dulu diketahui sebagai insulin dependent diabetes (IDDM), ataupun diabet kanak- kanak, dengan identitas lenyapnya sel beta penghasil insulin pada pulau langerhans alhasil terjalin kekurangan insulin pada badan. Diabet jenis ini bisa dialami oleh kanak- kanak ataupun orang dewasa. Hingga saat ini DMT1 tidak bisa dilindungi. Diet dan olah badan tidak bisa memulihkan ataupun mencegah DMT1. Umumnya pengidap DMT1 mempunyai kesehatan dan bobot tubuh yang baik ketika penyakit ini mulai dialaminya. Tidak hanya itu, kepekaan ataupun jawaban badan kepada insulin biasanya normal pada pengidap diabet jenis ini, paling utama dalam langkah awal (Chehelcheraghi et al., 2019). DMT1 terjalin kala badan kurang ataupun sama sekali tidak menghasilkan insulin. Akhirnya, pengidap DMT1 membutuhkan tambahan insulin dari luar. Situasi ini berlainan dari diabet jenis 2 yang terjalin sebab resistensi insulin,

ialah kala sel badan jadi kebal ataupun tidak responsif kepada insulin. Pertanda DMT1 umumnya timbul di usia kanak-kanak ataupun remaja, namun dapat pula saat berusia dewasa. Pengidap biasanya merasakan sering campakkan air kecil, sering merasakan haus atau dahaga, dan mudah letih (Yahaya & Salisu, 2020)

2.3.2. Patofisiologi

Dalam DMT1, terjalin kehancuran sel beta pankreas yang dimediasikan oleh seluler maupun autoimun. DMT1 mempunyai kecondongan genetik yang kokoh. Major histocompatibility complex (MHC), pula diketahui merupakan antigen leukosit manusia (HLA), dikabarkan menggapai kisaran 40% sampai 50% dari akumulasi DMT1 dalam keluarga. Determinan yang penting adalah polimorfisme gen HLA kelas II yang mengkode DQ dan DR4-DQ8, dengan DR3-DQ2, ditemui pada 90% penderita DMT1. Melalui kehancuran liberal sel beta, terdapat sedikit ataupun tidak terdapat sekresi insulin. Beberapa penderita ini biasanya tidak hadapi kegemukan. Pengidap lebih ada kerentanan kepada gangguan autoimun yang lain semacam penyakit Addison, penyakit Graves, tiroiditis Hashimoto, penyakit celiac, dan lainnya. Bagian DMT1 yang tidak terpaut terhadap autoimunitas insulin dan tidak terpaut terhadap HLA di atas dikatakan DMT1 idiopatik (Kangin et al., 2020).

Penghancuran sel β pankreas pada DMT1 terjadi melalui proses apoptosis yaitu mekanisme kematian sel terprogram yang mencakup sistem kaskade aktivasi sistein-asparaginase. Reaksi kaspase ini terjadi akibat dari produksi sitokin proinflamasi yaitu IL-1, TNF- α dan INF- γ yang tinggi diinduksi oleh limfosit T autoreaktif pada sel islet pancreas (Paschou et al., 2018).

2.4. Hubungan Sekretom *Mesenchymal Stem Cells* terhadap Kadar VEGF

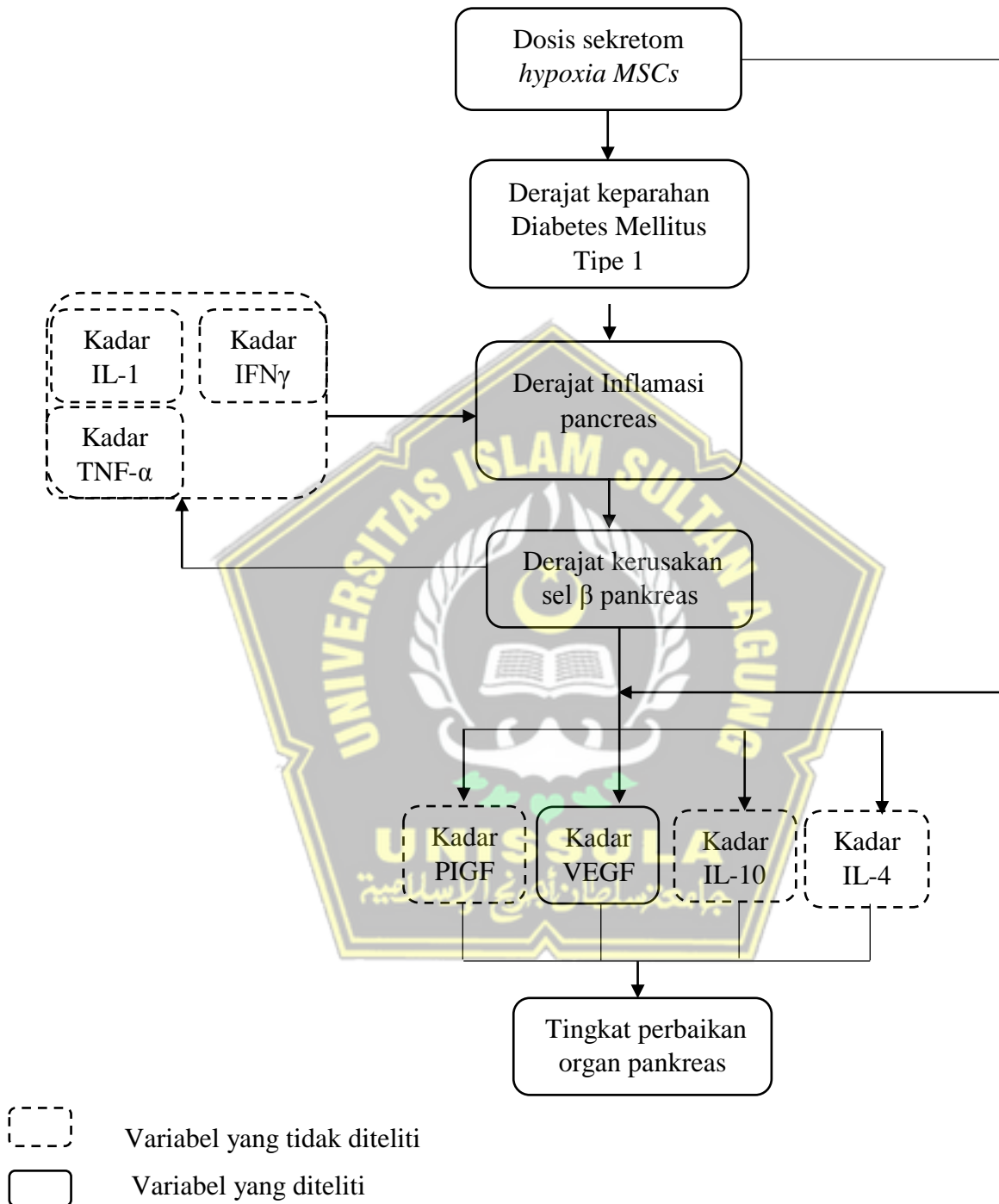
Sekretom berbasis *MSCs* mengandung beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih baik untuk terapi stem cell (Joseph et al., 2020). Tindakan imunomodulator dari *MSCs*, dan khususnya kemampuannya untuk mengurangi aktivasi sistem kekebalan, dapat menghentikan produksi antibodi sendiri terhadap sel β pankreas, sehingga menghalangi degenerasinya. Perlakuan pengondisian hipoksia *MSCs* dapat meningkatkan konsentrasi dari produksi IL-10 yang berperan dalam meningkatkan viabilitas sel (Lotfinia et al., 2017).

Pada pathogenesis DMT1, terjadi *over-expression* dari sitokin proinflamasi seperti IFN γ dan TNF- α yang berperan dalam kerusakan sel islet pancreas (Bazzaz, J.T., et al., 2014.). Sitokin-sitokin tersebut merupakan penyebab dari stress pada sel β sehingga terjadi proses destruksi sel β pada hewan pengerat dan manusia pada model eksperimental pada DM Tipe 1 (Vincenz et al., 2011). Sekretom *MSCs* memiliki pola ekspresi yang merubah sitokin dari pro-inflamasi (seperti TNF- α dan IL-2) menjadi anti-inflamasi pada sel T yang berasal dari tikus diabetes yang ditransplantasikan

dengan MSCs (Ezquer et al., 2022). Selain itu, faktor trofik yang dilepaskan oleh MSCs, termasuk IL-10, IGF-1, dan VEGF, dan mikrovesikel, telah dibuktikan dapat melindungi sel β pankreas secara endogen dan merangsang regenerasinya. (Scuteri, A. & Monfrini, M., 2018). Pada DM, *MSCs* dapat menawarkan penyembuhan lengkap pada lokasi luka cedera, termasuk peningkatan populasi sel, pembentukan matriks ekstraseluler, pelepasan sitokin, dan induksi pembentukan pembuluh darah baru, sehingga pada DMT1 ini VEGF dibutuhkan (Chehelcheraghi et al., 2019).

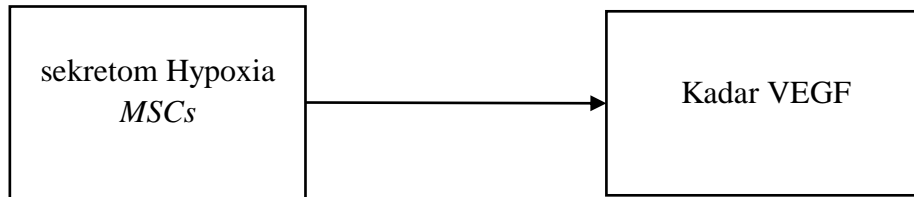


2.5. Kerangka Teori



Gambar 2.1. Kerangka Teori

2.6. Kerangka Konsep



Gambar 2.2. Kerangka Konsep

2.7. Hipotesis

Pemberian sekretom *hypoxia MSCs* meningkatkan kadar VEGF.

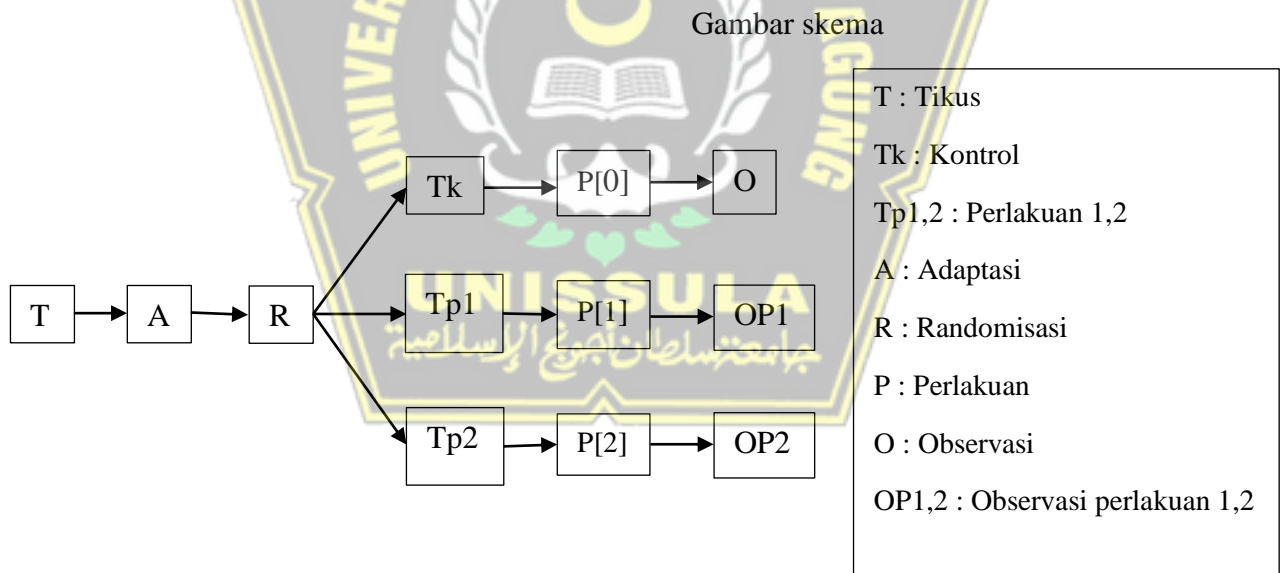


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis riset yang dipergunakan ialah riset eksperimental menggunakan perancangan “*Post Test Only Control Group Design*” dengan mempergunakan hewan coba tikus. Riset ini sebagai riset eksperimental laboratorik in vivo dan in vitro menggunakan design post test dengan kelompok kontrol (gambar 3.1). Rancangan ini digunakan, karena pada penelitian ini menilai pengaruh sekretom dalam kelompok riset dengan cara memperbandingkan diantara kelompok perlakuan terhadap kontrol.



Gambar 3.1. Skema rancangan penelitian post-test only group

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel bebas

Sekretom *Hypoxia MSCs*

3.2.1.2. Variabel tergantung

Kadar VEGF

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Sekretom *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*

Sekretom Hipoxia *MSCs* adalah sekret yang diambil dari medium *Mesenchymal Stem Cell* yang diinkubasi dalam keadaan O_2 5% selama 24 jam, kemudian sekret diekstrak dengan cara sentrifugasi dan diambil supernatannya, dengan jumlah masing-masing dosis 0,5 cc dan 1 cc.

Skala data: rasio

3.2.2.2. Kadar VEGF

VEGF adalah kadar yang diperoleh dari vena orbita tikus galur wistar yang diukur dengan menggunakan metode ELISA.

Skala data : rasio

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

3.3.1.1. Populasi Target

Populasi yang ditentukan dalam riset berikut ialah tikus putih jantan galur Wistar.

3.3.1.2. Populasi Terjangkau

Subjek dalam riset berikut ialah tikus jantan galur Wistar berumur 10 minggu berbobot tubuh 282 gram yang dikatakan ada kelayakan dipakai bagi riset oleh dokter hewan dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang dan timbul terjadai DMT1 setelah paparan STZ dosis 4mg/minggu dan dikonfirmasi terjadi peningkatan kadar gula darah > 200 mg/dL pada hari ke-7 setelah induksi.

3.3.2. Sampel

Populasi target yang terpenuhi kriteria inklusi beserta eksklusi

3.3.2.1. Kriteria Inklusi :

- 1) Tikus putih galur Wistar berkondisi sehat.
- 2) Tikus putih galur Wistar jantan
- 3) Tikus putih galur Wistar berusia 8-10 minggu
- 4) Tikus putih galur Wistar mempunyai bobot badan 282 gram

3.3.2.2. Kriteria Eksklusi :

- 1) Tikus putih galur Wistar yang sakit sepanjang riset

3.3.3. Teknik Pengambilan Sampel

Dalam mengambil sampel dilaksanakan menggunakan teknik *Random sampling* ialah teknik sampel diambil yang mana seluruh seseorang pada populasi baik dengan cara mandiri ataupun bersamaan ada peluang serupa agar ditentukan sebagai anggota sampel.

3.3.4. Besar Sampel

Penetapan besaran sampel dilakukan perhitungan melalui penggunaan kriteria menurut World Health Organization (WHO) untuk penelitian yaitu sejumlah 5 ekor sampel per kelompok. Dalam riset berikut setiap kelompok terdapat 5 ekor sampel dibagi menjadi 3 kelompok sampel.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen

Sarung tangan steril, *Micropipette with tip (blue tip, yellow tip, pink tip)*, *Pipette filler*, *Conical tube (15 ml, 50 ml)*, *Cryotube 1 ml*, *Pinset*, *CO₂ cylinder*, *Scissor*, *scalpel* dan bisturi, *Thermostirrer*, *Beaker glass*, *Aluminium foil*, *Dish*, *Flask*, *Sentrifugator*, *Chamber*, *Oxygen meter*, *CO₂ Incubator*, *Tabung CO₂*, *Imunocytochemistry*, *Biosafety cabinet class 2*, *Hotplate stirrer*, *Disposable pipet*,

Heparin tube, Inverted microscope, Cell counter, Rat VEGF 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 mM natrium sitrat (enzyme grade; Fisher) pH 4,5, dan Streptozotocin (STZ; Sigma), 10% (b / v) sukrosa (Sigma), 50 mM.

3.5. Cara Penelitian

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

Seluruh proses dilaksanakan di dalam biosafety cabinet class 2, menggunakan alat dan prinsip kerja teknik yang steril; *Umbilical cord* diambil dari tempat penyimpanan maupun langsung dari tikus, kemudian dicuci menggunakan PBS. Kemudian *Wharton jelly* dipisahkan dari pembuluh darah *umbilical cord*. *Wharton jelly* diambil dan dicacah menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. Setelah itu cacahan *Wharton jelly* diletakan secara merata dalam *flask* T25. Sekitar 2-3 menit *Wharton jelly* akan melekat pada dasar *flask*. Selanjutnya, dilaksanakan perendaman dengan 1cc medium.

Inkubasi dilaksanakan pada suhu 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5%,. Medium pada flask dibuang dan diganti sejumlah medium yang dibuang selama tiga hari sekali dalam kurun waktu 10-15 hari. Pertumbuhan sel diamati menggunakan Inverted microscope. Dilaksanakan kembali inkubasi ulang pada suhu 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5%. Selama tiga hari sekali, medium pada flask dibuang, lalu diganti sejumlah medium yang dibuang. Prosedur yang sama, terus dilakukna hingga mencapai stem cells konfluens 80%.

3.5.2. Tahap Persiapan Passage

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

3.5.3. Proses *Passage* Sel

Memasukkan medium komplit dengan ukuran 1 cc medium komplit / 1.500.000sel ke dalam tube sesuai jumlah hitungan sel sebelumnya. 1 cc sel dan medium dimasukan dalam *flask* T25. Kemudian dikultur dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama 1 hari. Mambahkan medium komplit ke dalam flask sebanyak 9 cc. Inkubasi dilaksanakan dengan kondisi 37°C, pH 7, O₂ 20% dan CO₂ 5% selama tiga hari. Seluruh medium dibuang untuk kemudian dimasukkan medium komplit baru sebanyak jumlah medium yang dibuang, setelah itu diinkubasi kembali dengan kondisi yang sama. Proses serupa diulang selama tiga hari sekali hingga sel konfluen 80% dalam *flask*. Setiap 80% sel konfluen, dipindah ke *flask* yang baru dan dihitung tiap fase perpindahan sebagai *passage* I, II, dan seterusnya. Proses kultur dilaksanakan hingga *passage* ke IV-VI

3.5.4. Proses Validasi Sel

Melaksanakan prosedur flowsitometri untuk pembacaan marker dari stem cells CD90.1, CD29, CD45, CD31 dengan populasi yang bernilai positif pada CD90.1 dan CD29, dan negatif pada CD45 dan CD31. Melaksanakan tes kemampuan deferensiasi stem cells menjadi kondrosit, adiposit, dan osteosit dengan menggunakan medium spesifik tertentu secara *in vitro*.

3.5.5. Proses Pemanenan Sel

Pemanenan sel dilaksanakan pada *passage* ke-IV. Ketika sel sudah konfluens 80% dalam *flask*, seluruh medium dibuang, lalu dicuci menggunakan PBS ke dalam flask sejumlah medium yang dibuang, setelah itu PBS dibuang. 2 cc tripsin sintetik (triple) ditambahkan dan diamkan selama 5 menit, kemudian dilaksanakan teknik tapping pada *flask* untuk melepaskan sel yang menempel di dasar flask. 4 cc medium inhibitor tripsin sintetik ditambahkan. Seluruh sel dan medium pada flask dipindah ke dalam *tube* 15 cc, lalu dilaksanakan sentrifugasi selama 10 menit dengan perputaran 1900 rpm. *Supernatant* dibuang kemudian ditambahkan 2 cc PBS, dilanjutkan dengan proses resuspensi, dan sentrifugasi selama 8 menit dengan perputaran 1900 rpm. *Supernatant* dibuang kemudian ditambahkan 1 cc medium komplit pada pellet yang tersisa di dasar tabung. Hitung sel kembali dilaksanakan.

3.5.6. Proses Penghitungan Sel

3.5.6.1. 10 μ l sel dimasukkan ke dalam cryotube. Ditambahkan 90 μ l triptofan blue ke dalam cryotube. 10 μ l dari campuran dari cryotube dipipet ke bilik hitung yang ditutup deck glass. Pengamatan dilaksanakan menggunakan inverted microscope, dan dihitung pada 4 bilik hitung. Perhitungan menggunakan rumus perhitungan jumlah sel:

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

3.5.7. Prosedur Hipoksia dan Pengambilan Sekretom

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

3.5.8. Pembuatan Tikus Model Diabetes Tipe 1

Sekitar 5 hari sebelum percobaan dimulai, kandang dua sampai lima tikus jantan pada suhu 24 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). Tikus diberi akses menuju makanan dan air secara bebas. Semua tikus ditimbang secara akurat sampai 1 g. Tikus secara acak disebar menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (jumlah tikus harus sama untuk setiap kelompok). Pada percobaan hari 1, semua tikus dipuasakan selama 6 sampai 8 jam sebelum perlakuan STZ. Minum diberikan seperti biasa. Buffer

natrium sitrat 50 mM (pH 4,5) disiapkan, lalu 1 ml buffer ditempatkan ke dalam masing-masing tabung microcentrifuge 1,5 ml dan ditutup tabung dengan aluminium foil. Segera sebelum injeksi, STZ dilarutkan dalam 50 mM buffer natrium sitrat (pH 4,5) hingga konsentrasi akhir 10 mg / ml. Larutan STZ harus disiapkan secara baru untuk setiap injeksi dan diinjeksikan dalam 5 menit setelah larut.

Menggunakan spuit 3-ml dan jarum 23-G, larutan STZ diinjeksi secara intraperitoneal pada 65 mg / kg untuk kelompok perlakuan. Buffer sitrat dengan volume yang sama (pH 4,5) dimasukan secara intraperitoneal untuk kelompok kontrol. Tikus dikembalikan ke kandangnya. Makanan diberikan seperti biasa. Pada hari percobaan ke-2, air sukrosa 10% diganti menjadi air biasa. Untuk penelitian yang melibatkan DM Tipe 1 tahap awal: Pada hari percobaan ke-10, semua tikus dipuaskan selama 6 sampai 8 jam. Kadar glukosa darah diuji dari sampel vena di ekor menggunakan alat cek kadar gula digital. Jika hewan diabetes digunakan untuk menilai mekanisme tahap awal DMT1 atau untuk skrining senyawa untuk pengobatan diabetes tahap awal, model divalidasi untuk studi lebih lanjut ketika hiperglikemia ditemukan pada tikus yang diinjeksi STZ (yaitu, kadar glukosa darah >150 mg / dl dan / atau secara statistik lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kontrol).

Biasanya penentuan kadar glukosa darah cukup untuk mendiagnosis diabetes, sehingga tidak perlu dilaksanakan pengukuran kadar insulin. Kadar glukosa puasa untuk hiperglikemia ringan harus >150 mg / dl dan / atau menunjukkan peningkatan yang signifikan secara statistik pada tikus yang disuntik STZ dibandingkan dengan tikus kontrol. Biasanya pada minggu ke-3, sebagian besar tikus yang diinjeksi STZ mengalami diabetes berat dengan tingkat glukosa darah biasanya > 250 sampai 600 mg / dl. Jika $>60\%$ tikus yang diinjeksi STZ namun masih tidak menunjukkan hiperglikemia ringan, diperiksa kembali apakah ada masalah dalam percobaan. Jika suatu zat uji atau senyawa sedang dinilai kemampuannya untuk mengoreksi hiperglikemia, protokol diperpanjang lebih lama, tergantung pada kebutuhan eksperimental. Kelompok hewan dirawat seperti yang dijelaskan pada langkah 3 sampai 9 untuk membentuk status diabetes dan kemudian hewan diobati dengan terapi restoratif potensial. Kelompok yang menerima suntikan *vehicle* yang sesuai disertakan sebagai kontrol.

3.5.9. Perlakuan pada Hewan Coba

Perlakuan pada hewan uji coba terbagi menjadi empat kelompok yaitu:

1. Kelompok kontrol : tikus model diabetes yang diinjeksi NaCl secara ip
2. Kelompok P1 : tikus model diabetes dengan injeksi sekretom MSCs hypoxia secara ip dosis 0,5 cc
3. Kelompok P2 : tikus model diabetes dengan injeksi sekretom MSCs hypoxia secara ip dosis 1 cc

3.5.10. Analisis Kadar VEGF Menggunakan ELISA

Pengenceran sampel dan reagen harus tercampur dengan sempurna. Sebelum memasukkan TMB ke dalam sumuran, substrat TMB diseimbangkan selama 30 menit pada suhu 37 ° C. Direkomendasikan untuk memplot kurva standar untuk setiap pengujian. Selanjutnya langkah yang dilaksanakan adalah :Menetapkan standar, sampel uji (diencerkan setidaknya 1/2 dengan *Sample Dilution Buffer*), sumuran kontrol (*blank*) yang masing-masing pada *plate* nya telah dilapisi antibodi dan kemudian, dicatat posisinya. Mencuci *plate* 2 kali sebelum memasukkan sumuran standar, sampel dan kontrol (*blank*).

Menyiapkan Standar: Aliquot 100ul dari *zero tube*, tube ke-1, tube ke-2, tube ke-3, tube ke-4, tube ke-5, tube ke-6 dan *Sample Dilution Buffer (blank)* ke dalam sumuran standar. Memasukkan Sampel: memasukan 100µl sampel yang diencerkan dengan benar ke dalam sumuran sampel uji. Inkubasi: menutup *plate* dengan penutup dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 90 menit. Mencuci: Melepas

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

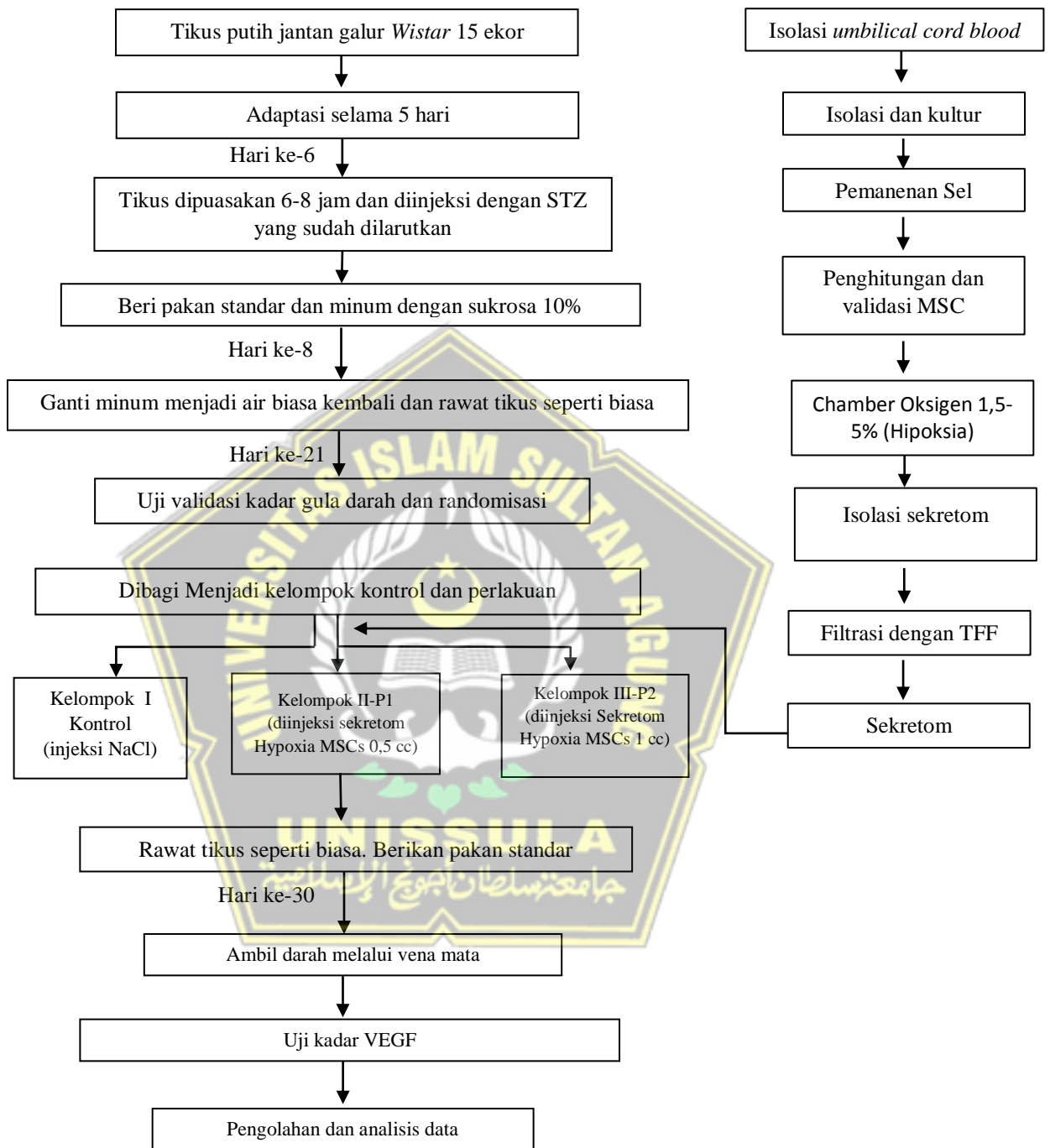
Memasukkan larutan di bagian bawah setiap sumuran tanpa menyentuh dinding samping, menutup *plate* dan menginkubasi pada suhu 37 ° C selama 60 menit. Mencuci: melepas penutup, dan *plate* dicuci 3 kali dengan *Wash Buffer*, dan *Wash Buffer* dibiarkan tetap berada di dalam sumuran selama 1-2 menit. *HRP-Streptavidin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

Substrat TMB: Memasukkan 90 µl substrat TMB kepada setiap sumuran, tutupnya *plate* serta diinkubasikan dalam temperatur 37 ° C saat gelap sepanjang 10-20 menit. (Waktu reaksi bisa dipersingkat atau dipanjangkan sejalan terhadap perubahan warna sesungguhnya, tetapi tidak lebih dari 30 menit. Menghentikan reaksi ketika gradien yang tampak muncul di sumur standar). Penghentian: Memasukkan 50µl *Stop Solution* ke setiap sumur. Warnanya akan langsung menguning. Urutan penambahan *Stop*

Solution harus sama dengan larutan substrat TMB. Pengukuran OD:
Membaca O.D. absorbansi pada 450nm di *Microplate Reader* segera
setelah memasukkan *Stop Solution*



3.6. Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur Penelitian

3.7. Tempat dan Waktu

3.7.1. Tempat

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

3.7.2. Waktu

September - Oktober 2022

3.8. Analisis Hasil

Data yang dihasilkan dari penelitian dilakukan uji deskriptif mengukur mean, median, dan modus. Kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas menggunakan uji Shapiro Wilk dan Leuvene Statistic. Data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen. Untuk itu, dilanjutkan dengan pengujian parametrik uji *one-way analysis of variance* (ANOVA). Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc LSD untuk menentukan perbedaan spesifik rerata masing-masing kelompok.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Riset berikut tujuannya agar mengenali pengaruhnya dari sekretom *Hypoxia MSCs* terhadap kadar VEGF pada tikus model DM tipe 1. Percobaan dilakukan pada tikus putih galur Wistar dengan usia 10 minggu dan berat badan 282 gram. Berdasarkan jumlah kelompok perlakuan, maka sampel yang dipergunakan ialah sejumlah 15 ekor tikus putih jantan galur Wistar menggunakan jumlah 5 ekor per kelompok sampel. Sekretom *Hypoxia MSCs* diambil dari medium *Mesenchymal Stem Cells* yang diinkubasi dalam keadaan hipoksik (O_2 5%) selama 24 jam, kemudian sekret diekstrak dengan cara sentrifugasi dan diambil supernatannya, dengan jumlah masing-masing dosis 0,5 cc dan 1 cc. Dalam 15 ekor tikus jantan galur Wistar dilaksanakan pengklasifikasian jadi 3 kelompok riset ialah kelompok Kontrol positif yaitu diinjeksi NaCl, kelompok perlakuan 1 (P1/ perlakuan injeksi Sekretom *Hypoxia MSCs* dosis 0,5 cc) dan perlakuan 2 (P2/ perlakuan injeksi Sekretom *Hypoxia MSCs* dosis 1 cc).

Penelitian diawali dengan pembuatan tikus model DM tipe 1 dengan diinduksi satu kali streptozotocin secara intraperitoneal selama 21 hari dan pengambilan darah melalui vena mata serta dilanjutkan dengan pengujian serum kadar VEGF pada hari ke 30.

4.1.1. Analisis Deskriptif

1. Konfirmasi Tikus Penelitian

Tabel 4.1. Data Konfirmasi Tikus Penelitian

Parameter	Hasil
Berat badan (gr)	282
Gula darah puasa (mng/dl)	329

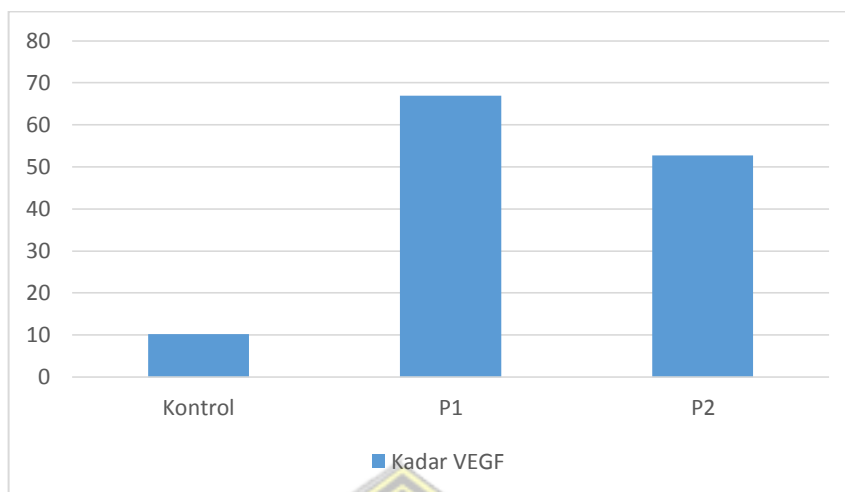
Berdasarkan dari tabel 4.1, dapat terlihat bahwa kadar gula darah puasa pada tikus penelitian terpantau sebesar 329 mg/dl yang berarti bahwa tikus penelitian terkonfirmasi DM, sesuai dengan ketentuan tikus terkonfirmasi DM apabila kadar gula darah >150 mg/dl. Berat badan tikus jantan galur Wistar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 282 gram.

4.1.2. Deskriptif data

Dilakukan pengelolaan data rerata jumlah kadar VEGF pada masing-masing kelompok didapat hasil seperti pada tabel dan grafik dibawah ini

Tabel 4.2. Hasil Rerata Jumlah VEGF

	Rerata \pm SD	Median
Kontrol	10 \pm 15,23	10,23
P1	68,86 \pm 74,78	66,88
P2	53,83 \pm 10,86	52,7



Gambar 4.1. Grafik rerata Jumlah Kadar VEGF

Dari grafik diatas ditunjukkan kalau terjalin kenaikan kandungan VEGF dalam kelompok perlakuan 1 serta perlakuan 2, dibanding kelompok pengawasan. Namun kandungan VEGF paling tinggi ada dalam kelompok perlakuan 1.

4.1.3. Distribusi Data

Data jumlah kadar VEGF yang didapatkan diuji normalitasnya dengan *Shapiro-Wilk*. Hasilnya bisa terlihat dalam tabel berikut:

Tabel 4.3. Hasil Uji Normalitas Jumlah Kadar VEGF

	Kelompok	Uji Normalitas
		Nilai <i>P</i>
Kadar VEGF	Kontrol	0,602*
	P1	0,500*
	P2	0,931*

Tabel diatas menunjukkan bahwa jumlah kadar VEGF pada semua kelompok memiliki signifikasi nilai $P > 0,05$. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa data jumlah kadar VEGF berdistribusi

normal. Kemudian hasil uji homogenitas jumlah kadar VEGF ditampilkan dalam tabel ini.

Tabel 4.4. Hasil uji Homogenitas Jumlah Kadar VEGF

	Kelompok	Uji Homogenitas
		Nilai <i>P</i>
Kadar VEGF	Kontrol	0,220*
	P1	
	P2	

Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat bahwa data jumlah kadar VEGF mencapai homogenitas dikarenakan signifikansi nilai $P > 0,05$. Dari analisis itu menandakan data jumlah kadar VEGF terpenuhi persyaratan pengujian parametrik One Way Anova

4.1.4. Analisis Bivariat

Data menguji One Way Anova dan diteruskan menggunakan post hoc LSD menunjukkan hasil sebagai berikut:

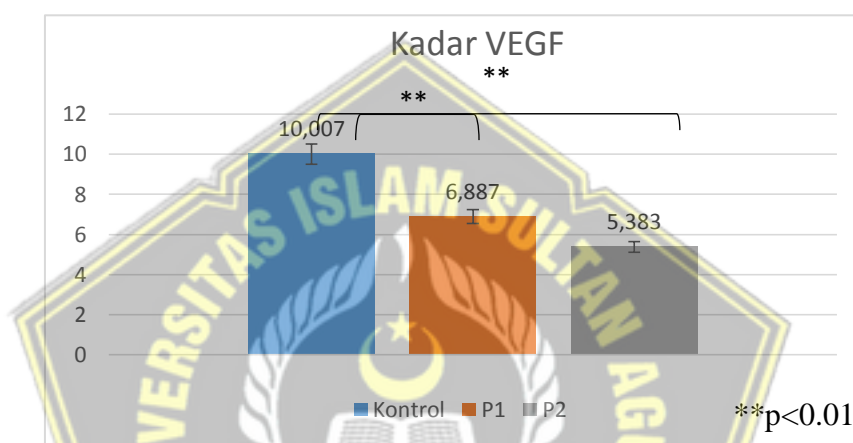
Tabel 4.5. Hasil Uji One Way Anova

Kelompok	Nilai <i>P</i>
Kontrol	0,000*
P1	
P2	

Berdasarkan melalui pengujian One Way Anova diperoleh hasilnya yaitu ada perbedaannya kadar VEGF yang bersignifikan antarkelompok sampel yang diamati melalui angka $p (0,000) < 0,05$, berarti diteruskan pengujian Post Hoc agar menentukan beda antarkelompok.

Tabel 4.6. Hasil Uji Post Hoc LSD

kelompok	Kelompok pembanding	P
Kelompok kontrol	Kelompok perlakuan 1	0.001*
	Kelompok perlakuan 2	0.000*
Kelompok perlakuan 1	Kelompok kontrol	0.001*
	Kelompok perlakuan 2	0.064
Kelompok perlakuan 2	Kelompok kontrol	0.000*
	Kelompok perlakuan 1	0.064



Gambar 4.2. Grafik Perbedaan Signifikan Kadar VEGF Berdasarkan Uji *Post Hoc LSD*

Berdasarkan data hasil pengujian Post Hoc LSD, terdapat perbedaan kadar VEGF yang signifikan diantara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 ($p < 0,05$) dimana rata-rata kadar VEGF dari kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 lebih rendah bila dibandingkan kadar VEGF kelompok kontrol.

4.2. Pembahasan

Riset berikut sebagai riset eksperimental menggunakan *post-test only control group design* yakni memperbandingkan efek pemberian sekretom

Hypoxia MSCs terhadap kadar VEGF pada tikus model DMT1. Penelitian dilakukan selama 42 hari dimulai dari induksi diabetes menggunakan STZ selama 21 hari, dilanjutkan perlakuan selama 21 hari di tiap awal minggu dan pengambilan sampel darah di akhir minggu. Kelompok penelitian ini meliputi 3 kelompok penelitian, yang terdiri dari dua kelompok perlakuan, kelompok satu mendapat injeksi dengan kadar 0,5 cc, sedangkan kelompok dua mendapat injeksi dengan kadar 1 cc sekretom *Hypoxia MSCs*, serta kelompok kontrol yang hanya dibiarkan diabetes tanpa perlakuan. Pemilihan dosis ini sesuai dengan standar pemberian pada penelitian.

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

Terjadi peningkatan kadar VEGF pada kelompok P1 dan P2, dibandingkan terhadap kelompok kontrol. Perihal ini dikarenakan *MSCs* memiliki kemampuan untuk menekan sitokin proinflamasi. Pada DMT1, terjadi *over-expression* dari sitokin proinflamasi misalnya TNF- α dan IFN γ yang mempunyai peranan untuk kerusakan sel islet pancreas (Bazzaz, J.T., et al., 2014.). Sitokin-sitokin tersebut merupakan penyebab dari stress pada sel β (Vincenz et al., 2011). Proses inflamasi yang berkurang lalu beralih

keproses proliferasi yang salah satunya ditandai dengan adanya peran VEGF.

VEGF ialah faktor proangiogenesis yang bisa meningkatkan permeabilitas vaskuler serta mengaktifasikan sel endotel yang mana efek biologisnya dimediasikan dari jalinan VEGF dengan reseptor ialah reseptor 1 dan 2 (VEGFR-1 and VEGFR-2) (Chehelcheraghi et al., 2019). Pada proses pengobatan cedera, VEGF berfungsi krusial untuk angiogenesis dengan memotivasi proliferasi, evakuasi maupun organisasi sel endotel dalam membuat tubulus pembuluh (Ferrara, 2009).

Sekretom *MSCs* memiliki pola ekspresi yang merubah sitokin dari pro-inflamasi (seperti $\text{TNF-}\alpha$ dan IL-2) menjadi anti-inflamasi pada sel T yang berasal dari tikus diabetes yang ditransplantasikan dengan *MSCs* (Ezquer et al., 2022). Berdasarkan dari hasil pengujian ini dapat diketahui bahwa pemberian sekretom *Hypoxia MSCs* dapat meningkatkan kadar VEGF. Hasil penelitian yang menandakan terdapat perbedaannya bersignifikan diantara kelompok kontrol serta adanya kelompok P1 serta kelompok P2 yang mana kadar VEGF dalam kelompok P1 lebih besar jika diperbandingkan terhadap kelompok P2 dan kelompok kontrol. Penurunan dari kadar VEGF disebabkan karena pemeriksaan dilakukan pada hari ke 30 sehingga kadar dari VEGF sudah mengalami penurunan.

Tahapan penyembuhan luka (proliferasi) melakukan reparasi terhadap jaringan rusak melalui angiogenesis, epitelisasi dan granulasi secara terintegrasi. Adanya pergeseran arah penyembuhan luka menjadi bentuk

regenerasi dari fase akut inflamasi di hari ke 3. Pada hari ke 3 ini terjadi kesempurnaan proses hemostasis serta pengontrolan dari inflamasi selama 2 minggu. Pembentukan jaringan granulasi yang berlebihan serta migrasi fibroblas sebagai dampak dari deposisi ECM baru hasil sintesis fibroblas aktif merupakan tanda dari tahapan proliferasi yang dilihat secara mikroskopis. Matriks scaffold (fibronektin dan fibrin secara kompleks) tergantung oleh deposisi ECM. Peran sentral *MSCs* dalam tiga tahapan proliferasi dari fase inisiasi angiogenesis, kemudian mengaktifkan sel fibroblas hingga membuat terjadinya signifikansi deposisi kolagen. Peran *MSCs* selanjutnya adalah pembentukan sel epitel yang baru atau dapat disebut dengan re-epitelisasi. Peran spesifik dari *MSCs* pada ketiga tahapan itu adalah dengan melakukan pelepasan *soluble molecule* secara parakrin, diferensiasi menjadi sel spesifik di sekitar area luka, berfusi dan transdiferensiasi serta melakukan eksosom. Dominannya peran dari *soluble molecule* pada proliferasi ini adalah karena *soluble molecule* mampu untuk mengaktifasi sel sekitarnya, menginduksi *endogenous stem cell* sehingga aktif terlibat pada proses proliferasi (Putra, 2019).

Kadar VEGF pada kelompok P2 lebih rendah dibanding kelompok P1, diduga karena banyaknya dosis *Hypoxia MSCs* yang diberikan sehingga proses proliferasi lebih cepat terjadi, sehingga kadar VEGF menurun pada kelompok P2. Keterbatasan dari penelitian ini tidak dilakukan pengecekan untuk sitokin proinflamasi yang lain sehingga tidak diketahui apakah terdapat pengaruh pada proses inflamasi yang terjadi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

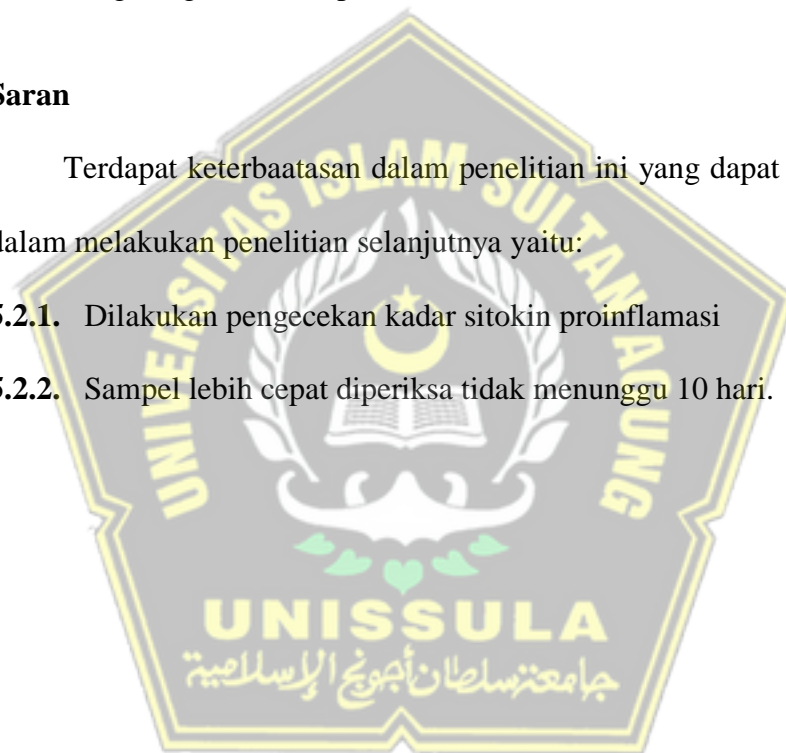
Pemakaian *MSCs* dosis 0,5 dan 1 cc meningkatkan kadar VEGF disbanding dengan kontrol pada model tikus DMT1.

5.2. Saran

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

5.2.1. Dilakukan pengecekan kadar sitokin proinflamasi

5.2.2. Sampel lebih cepat diperiksa tidak menunggu 10 hari.



DAFTAR PUSTAKA

- Aghazadeh, Y., & Nostro, M. C. (2017). Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Current Diabetes Reports*, 17(6). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0863-6>
- Ahangar, P., & Mills, S. J. (2020). *Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair*.
- American Diabetes Association. (2020). National Diabetes Statistics Report. *National Diabetes Statistics Report*, 4, 2009–2012.
- 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>
- Chehelcheraghi, F., Chien, S., & Bayat, M. (2019). Mesenchymal stem cells improve survival in ischemic diabetic random skin flap via increased angiogenesis and VEGF expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 17491–17499. <https://doi.org/10.1002/jcb.29013>
- Chen, P. S., Chiu, W. T., Hsu, P. L., Lin, S. C., Peng, I. C., Wang, C. Y., & Tsai, S. J. (2020). Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00658-7>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- 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>
- Ezquer, F., Huang, Y. L., & Ezquer, M. (2022). New Perspectives to Improve Mesenchymal Stem Cell Therapies for Drug-Induced Liver Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052669>
- 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>

- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(6), 789–791. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179663>
- 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>
- Gill, R. S., Birch, D. W., Shi, X., Sharma, A. M., & Karmali, S. (2010). Sleeve gastrectomy and type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 6(6), 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2010.07.011>
- 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>
- 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>
- Holman, N., Wild, S. H., Gregg, E. W., Valabhji, J., Sattar, N., Khunti, K., Holman, N., Wild, S. H., Gregg, E. W., Knighton, P., O’Keefe, J., Patel, K., Hanif, W., Patel, V., Valabhji, J., Young, B., Sattar, N., & Khunti, K. (2022). Comparison of mortality in people with type 1 and type 2 diabetes by age of diagnosis: an incident population-based study in England and Wales. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 10(2), 95–97. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(21\)00293-x](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(21)00293-x)
- Ibrahim, A. A. S., Morsy, M. M., Abouhashem, S. E., Aly, O., Sabbah, N. A., & Raafat, N. (2020). Role of mesenchymal stem cells and their culture medium in alleviating kidney injury in rats diabetic nephropathy. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s43042-020-00064-6>
- Kahanovitz, L., Sluss, P. M., & Russell, S. J. (2017). Type 1 diabetes-a clinical perspective. *Point of Care*, 16(1), 37–40. <https://doi.org/10.1097/POC.000000000000125>
- Kangin, M., Talay, N., Yilmaz, S. T., Unal, E., Demiral, M., Asena, M., & Ozbek, N. (2020). A Retrospective Analysis of Children and Adolescents With Diabetic Ketoacidosis in the Intensive Care Unit: Is It Significant that the

Blood Ketone Level Becomes Negative in Diabetic Ketoacidosis? *Cureus*, 12(10). <https://doi.org/10.7759/cureus.10844>

- 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>
- Ojo, O., Ojo, O. O., Adebawale, F., & Wang, X. H. (2018). The effect of dietary glycaemic index on glycaemia in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu10030373>
- Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine Connections*, 7(1). <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
- 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>
- Perkumpulan Endokrinolog Indonesia. (2021). *Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021*. www.ginasthma.org.
- Putra, A. (2019). Basic Molecular Stem Cell. In *Unissula Press* (Vol. 1, Issue 4). Unissula Press.
- Rahmasari, I., & Wahyuni, E. S. (2019). Efektivitas Memordoca Carantia (Pare) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah. *Infokes*, 9(1), 57–64.
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., OBrien, T., & Samali, A. (2011). Cytokine-Induced -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. In *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. InTech. <https://doi.org/10.5772/22765>
- Volarevic, V., Arsenijevic, N., Lukic, M. L., & Stojkovic, M. (2011). Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus. *Stem Cells Regenerative Medicine*, 29(5). <https://doi.org/10.3727/096368914X682792>
- Waseem, M., Khan, I., Iqbal, H., Eijaz, 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>

World Health Organization (WHO). (2021). *Diabetes*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Yahaya, T., & Salisu, T. (2020). Genes predisposing to type 1 diabetes mellitus and pathophysiology: A narrative review. *Medical Journal of Indonesia*, 29(1), 100–109. <https://doi.org/10.13181/mji.rev.203732>

Zhang, Q., Fang, W., Ma, L., Wang, Z.-D., Yang, Y.-M., & Lu, Y.-Q. (2018). *VEGF levels in plasma in relation to metabolic control, inflammation, and microvascular complications in type-2 diabetes A cohort study*. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010415>

