

**PENGARUH PEMBERIAN ALKALINE WATER DAN SECRETOME
HIPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP KADAR
CASPASE-3 DAN INDEKS HOMA-IR
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar
Model Diabetes Mellitus Tipe 2)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

Melisa Septi Mawarini

MBK 2322010412

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2025

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN *ALKALINE WATER* DAN *SECRETOME HIPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP KADAR CASPASE-3 DAN *INDEKS HOMA-IR*

(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe 2)

Disusun oleh:

Melisa Septi Mawarini
MBK 2322010412

Yang dipertahankan didepan tim penguji pada 20 februari 2025 dan dinyatakan telah
memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui,

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

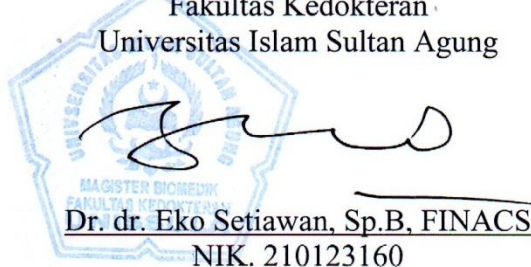


Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK. 210123160



Prof. Dr.dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK. 210123160

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 30 September 2024

Yang menyatakan,



Melisa Septi Mawarini

ABSTRAK

Latar Belakang: Diabetes Mellitus tipe 2 (DMT2) merupakan penyakit metabolik yang berkaitan dengan resistensi insulin dan apoptosis sel β pankreas. Caspase-3 berperan dalam jalur apoptosis, sementara indeks HOMA-IR digunakan untuk menilai resistensi insulin. Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) dan air alkali diketahui memiliki potensi terapeutik dalam memperbaiki resistensi insulin dan mengurangi stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan Meneliti pengaruh kombinasi SH-MSC dan air alkali terhadap kadar Caspase-3 dan indeks HOMA-IR pada tikus model DMT2.

Metode: Studi eksperimental in vivo ini menggunakan 25 ekor tikus Wistar yang dibagi dalam lima kelompok: kontrol sehat, kontrol DMT2, DMT2 + metformin, DMT2 + SH-MSC, dan DMT2 + SH-MSC + air alkali. Ekspresi Caspase-3 dan HOMA-IR dianalisis menggunakan RT-PCR dan ELISA setelah 30 hari perlakuan.

Hasil: Penelitian ini mengkaji pengaruh berbagai perlakuan terhadap ekspresi gen Caspase 3 dan nilai HOMA-IR pada kelompok uji. Hasil menunjukkan bahwa K2 memiliki ekspresi Caspase 3 tertinggi ($6,66 \pm 2,76$), diikuti oleh K3, K4, dan K5 ($2,93 \pm 0,52$). Analisis ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$), dengan K4 dan K5 berbeda signifikan dibandingkan K2. Analisis HOMA-IR menunjukkan nilai tertinggi pada K2 ($1,14 \pm 0,27$) dan terendah pada K5 ($0,68 \pm 0,14$). Uji post hoc Tamhane menunjukkan perbedaan signifikan antara K5 dengan K2/K3. Hasil ini menunjukkan tren penurunan HOMA-IR, yang mengindikasikan potensi efek terapeutik dari perlakuan yang diberikan.

Kesimpulan: Kombinasi SH-MSC dan air alkali memiliki potensi sebagai terapi tambahan dalam pengelolaan DMT2 dengan mekanisme penurunan apoptosis sel β pankreas dan peningkatan sensitivitas insulin.

Kata kunci: Air alkali, Caspase-3, Diabetes Mellitus tipe 2, HOMA-IR, Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells.

ABSTRACT

Background: Type 2 Diabetes Mellitus (DMT2) is a metabolic disease associated with insulin resistance and pancreatic β -cell apoptosis. Caspase-3 plays a role in the apoptosis pathway, while the HOMA-IR index is used to assess insulin resistance. Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) and alkaline water are known for their therapeutic potential in improving insulin resistance and reducing oxidative stress. This study aim to investigate the effects of SH-MSC and alkaline water combination on Caspase-3 levels and the HOMA-IR index in a DMT2 rat model.

Methods: This in vivo experimental study involved 25 Wistar rats divided into five groups: healthy control, DMT2 control, DMT2 + metformin, DMT2 + SH-MSC, and DMT2 + SH-MSC + alkaline water. Caspase-3 expression and HOMA-IR were analyzed using RT-PCR and ELISA after 30 days of treatment.

Results: This study investigates the effects of different treatments on Caspase 3 gene expression and HOMA-IR levels in experimental groups. Results showed that K2 had the highest Caspase 3 expression (6.66 ± 2.76), followed by K3, K4, and K5 (2.93 ± 0.52). ANOVA analysis revealed significant differences between groups ($p < 0.05$), with K4 and K5 significantly different from K2. HOMA-IR analysis showed the highest value in K2 (1.14 ± 0.27), while K5 had the lowest (0.68 ± 0.14). Tamhane's post hoc test indicated significant differences between K5 and K2/K3. These findings suggest a trend of decreasing HOMA-IR, highlighting potential therapeutic effects of the treatments.

Conclusion: The combination of SH-MSC and alkaline water has potential as an adjuvant therapy for DMT2 management by reducing pancreatic β -cell apoptosis and enhancing insulin sensitivity.

Keywords: Alkaline water, Caspase-3, HOMA-IR, Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells, Type 2 Diabetes Mellitus.

KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH PEMBERIAN ALKALINE WATER DAN SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP KADAR CASPASE-3 DAN INDEKS HOMA-IR (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe 2)**. Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada :

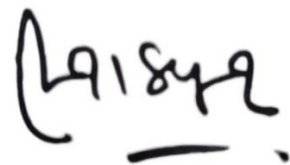
1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINANCS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINANCS selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
5. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan thesis.
6. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak. Aamiin yaa rabbal alamin.

Semarang, 30 September 2024

Penulis,



Melisa Septi Mawarini

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Originalitas Penelitian	5
1.5. Manfaat penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Caspase 3.....	7
2.2. Indeks Homa IR	10
2.3. Sekretom Mesenchymal Stem Cell	12
2.4. Air Alkali.....	16
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	20
3.1. Kerangka Teori.....	20
3.3. Hipotesis.....	22
BAB IV METODE PENELITIAN	23
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	23
4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional	24
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	27
4.4. Alat dan Bahan	29

4.5. Cara Penelitian	30
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	36
4.7. Analisa Data	36
4.8. Alur Penelitian.....	38
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
5.1. Hasil	39
5.2. Pembahasan.....	45
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	50
6.1. Simpulan	50
6.2. Saran.....	50
LAMPIRAN.....	59
Lampiran 1. Surat Keterangan Hasil Penelitian	59
Lampiran 2. Analisis Normalitas dan Homogenitas	62
Lampiran 3. Analisis Anova dan Post Hoc	63
Lampiran 4. Dokumentasi Kegiatan	64
Lampiran 5. Dokumentasi kegiatan Validasi GDP	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	21
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	22
Gambar 4. 1 Rancangan Penelitian ⁴⁵	23
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	38
Gambar 5. 1. Validasi Morfologi dan Diferensiasi MSC.....	40
Gambar 5. 2. Validasi Flowcytometer MSC.....	41
Gambar 5. 3. Ekspresi Gen Caspase 3.....	43
Gambar 5. 4. Indeks HOMA-IR.....	45



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5. 1. Hasil Validasi Tikus DMT2.....	39
Tabel 5. 2. Profil Sitokin SH-MSC	42
Tabel 5. 3. Hasil analisis ekspresi gen Caspase 3	42
Tabel 5. 4. Hubungan ekspresi gen Caspase 3 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD	43
Tabel 5. 5. Hasil analisis HOMA-IR.....	44
Tabel 5. 6. Hubungan Homa IR antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane.....	45



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
HE	: <i>Hematoksin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>

TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Facto</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Mellitus tipe 2 (DM tipe 2) berkaitan erat dengan inflamasi kronis yang berperan penting dalam patogenesis penyakit ini. Inflamasi kronis, dipicu oleh aktivitas sitokin pro-inflamasi seperti Tumor Necrosis Factor (TNF- α) dan Interleukin-6 (IL-6), menyebabkan resistensi insulin.^{1,2} Resistensi insulin, yang diukur melalui Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), akan menyebabkan pankreas meningkatkan produksi insulin guna mengimbangi kebutuhan. Hal ini menyebabkan, sel beta pankreas mengalami stres yang mengarah pada apoptosis dan penurunan jumlah sel beta yang berfungsi. Selain kinerja pancreas yang meningkat, inflamasi yang berkepanjangan juga akan memicu peningkatan Caspase 3 yang berujung pada kematian sel beta pancreas yang akan memperparah kondisi DMT2. Penurunan jumlah sel beta ini berkontribusi terhadap hiperglikemia kronis, yang selanjutnya memperburuk inflamasi dan resistensi insulin. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa Sekretom Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) meningkatkan regenerasi dan viabilitas sel dan di sisi lain air alkali juga dilaporkan menurunkan stres oksidatif dan inflamasi. Namun demikian, pengaruh kombinasi penggunaan kedua SH-MSC dan Air Alkali pada kasus DMT2 terhadap HOMA-IR dan ekspresi Caspase 3 belum dikaji.^{3,4}

Tahun 2017, sekitar 462 juta orang mengalami diabetes tipe 2, yang setara dengan 6,28% populasi global. Jumlah tersebut, 4,4% berada pada rentang usia 15–49 tahun, 15% berusia 50–69 tahun, dan 22% berusia 70 tahun ke atas. Lebih dari 1 juta kematian per tahun disebabkan oleh diabetes, menjadikannya penyebab kematian tertinggi kesembilan di dunia. Kasus diabetes mellitus meningkat secara global, dengan laju yang lebih cepat di wilayah maju seperti Eropa Barat. Distribusi gender pasien diabetes seimbang, dengan puncak insidensi pada usia sekitar 55 tahun. Prevalensi global diabetes tipe 2 diproyeksikan meningkat menjadi 7079 orang per 100.000 pada tahun 2030, mencerminkan peningkatan yang terus berlangsung di seluruh dunia.^{5,6}

Metformin merupakan terapi lini pertama untuk DM2 karena efektivitasnya dalam menurunkan glukosa darah melalui peningkatan sensitivitas insulin dan penurunan produksi glukosa hepatis. Namun, penggunaannya memiliki beberapa keterbatasan. Salah satu kendala utama adalah efek samping gastrointestinal, seperti mual, diare, dan kembung, yang dapat mengurangi kepatuhan pasien. Selain itu, metformin dikontraindikasikan pada pasien dengan gangguan fungsi ginjal ($\text{eGFR} < 30 \text{ mL/min/1,73m}^2$) karena risiko asidosis laktat, kondisi langka tetapi berpotensi fatal. Metformin juga memiliki keterbatasan dalam memperbaiki fungsi sel β pankreas, sehingga tidak dapat sepenuhnya mencegah progresivitas penyakit. Pada beberapa pasien, terutama yang mengalami resistensi insulin berat atau kegagalan terapi tunggal, metformin perlu

dikombinasikan dengan obat lain. Selain itu, pada pasien dengan penyakit hati, gagal jantung berat, atau kondisi hipoksia, penggunaan metformin harus dibatasi atau dihindari.^{7,8}

SH-MSCs adalah kumpulan molekul yang disekresikan oleh stem cell dengan potensi terapi diabetes tipe 2. Komponen utamanya meliputi sitokin Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) dan faktor pertumbuhan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1). IL-6 dan IL-10 meningkatkan proliferasi sel dan mengurangi peradangan, sementara TGF- β mendukung penyembuhan luka. VEGF mendorong angiogenesis, HGF membantu regenerasi jaringan, dan IGF-1 meningkatkan sensitivitas insulin. Eksosom dalam sekretom mengandung RNA dan protein terapeutik yang meningkatkan fungsi metabolik dan mengurangi resistensi insulin. Penelitian awal menunjukkan hasil menjanjikan, tetapi diperlukan studi klinis lebih lanjut.⁹⁻¹³

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa konsumsi Air alkali 2L/hari berperan dalam perbaikan kadar gula pada DM2 melalui pengurangan stres oksidatif dan peningkatan sensitivitas insulin. Air alkali diketahui bersifat anti oksidan yang dapat menetralkan radikal bebas, mengurangi peradangan, dan mencegah kerusakan sel pancreas sehingga membantu mengontrol kadar glukosa darah pada penderita diabetes.

Penelitian terdahulu melaporkan adanya peran SH-MSC dan air alkali dalam menurunkan kadar gula darah, namun demikian belum ada penelitian

yang mengkaji peran SH-MSC dan air alkali terhadap indeks HOMA-IR dan ekspresi Caspase 3 pada DMT2. Hal ini yang melatarbelakangi penelitian ini untuk dilakukan.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian SH-MSC yang dikombinasi dengan air alkali terhadap penurunan indeks Homa IR dan ekspresi Caspase 3 pada tikus jantan galur wistar model DMT2?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian SH-MSC yang dikombinasi dengan air alkali terhadap indeks Homa IR dan ekspresi Caspase 3 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh pemberian SH-MSC pada dosis 500 µl tanpa air alkali dan dosis 500 µl yang dikombinasi dengan air alkali terhadap ekspresi Caspase 3 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.
- b. Membuktikan pengaruh pemberian SH-MSC pada dosis 500 µl tanpa air alkali dan dosis 500 µl yang dikombinasi dengan air alkali terhadap Indeks Homa IR pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Ribot et al., 2017 ¹⁴	<i>Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition angiogenic Properties</i>	<i>In vivo</i>	Penurunan inflamasi dan perbaikan fungsi pankreas
2	Wicaksono et al., 2020 ³	<i>The Effects of Alkaline Reduced Water Administration to the Fasting Blood Glucose Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus</i>	<i>In vivo</i>	Pemberian air pH 9 1L/hari menurunkan kadar gula puasa pada orang DMT2
3	Dias et al., 2021 ¹⁵	<i>Secretome effect of adipose tissue- derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes</i>	<i>In vivo</i>	peningkatan kadar IL-6 dan IL-2, IL-4 menurun. induksi ekspresi PDX-1 pankreas dan mampu mengurangi glikemia
4	Dwi Agustanti & Purbianto, 2019 ⁴	<i>Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood Sugar Levels of Diabetes Mellitus Patients</i>	<i>In vivo</i>	Konsumsi air pH 8,5-9,5 2L/hari dapat menurunkan kadar gula darah puasa pasien DMT2
5	Sun et al., 2018 ¹⁶	<i>Human Mesenchymal Stem Cell Derived SEKRETOMs Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β-Cell Destruction</i>	<i>In vivo</i>	SEKRETOM MSC mampu merestorasi kerusakan sel beta pankreas dan meningkatkan sensitivitas insulin

Berdasarkan studi sebelumnya, Ribot et al. (2017) menunjukkan perubahan komposisi secretome MSC pada DMT2, namun tidak membahas kondisi hipoksia atau efek molekuler spesifik. Wicaksono et al. (2020) dan Dwi Agustanti & Purbianto (2019) mengkaji manfaat air alkali untuk menurunkan glukosa darah pada DMT2, tetapi tidak menyelidiki resistensi insulin (HOMA-IR) atau apoptosis (Caspase-3). Dias et al. (2021) menunjukkan efek secretome MSC dalam model diabetes tipe 1, namun belum mengeksplorasi diabetes tipe 2 dan efek hipoksia. Sun et al. (2018) menunjukkan bahwa secretome MSC memperbaiki resistensi insulin dan kerusakan sel β -pankreas pada DMT2, tetapi tidak mengintegrasikan air alkali. Novelitas penelitian ini karena menggabungkan air alkali dan SH-MSC dengan mengkaji mekanisme molekuler yaitu HOMA-IR dan Caspase-3.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pengaruh pemberian SH-MSC yang dikombinasi dengan air alkali terhadap indeks Homa IR dan ekspresi Caspase 3 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.5.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan pemberian SH-MSC yang dikombinasi dengan air alkali terhadap indeks Homa IR dan ekspresi Caspase 3 pada tikus jantan galur wistar model DMT2 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Caspase 3

2.1.1. Definisi

Caspase-3 adalah protein caspase yang berinteraksi dengan caspase-8 dan caspase-9. Protein ini dikodekan oleh gen CASP3. Ortolog CASP3 telah diidentifikasi pada berbagai mamalia yang memiliki data genom lengkap. Ortolog unik juga ditemukan pada burung, kadal, lissamphibia, dan teleostei. Protein CASP3 merupakan anggota keluarga cysteine-aspartic acid protease (caspase).

Aktivasi bertahap caspase memainkan peran sentral dalam fase eksekusi apoptosis sel. Caspase ada dalam bentuk proenzim yang tidak aktif, yang kemudian menjalani pemrosesan proteolitik pada residu aspartat yang terkonservasi untuk menghasilkan dua subunit, besar dan kecil, yang kemudian berpasangan membentuk enzim aktif. Protein ini memotong dan mengaktifkan caspase-6 dan caspase-7; sementara itu, protein itu sendiri diproses dan diaktifkan oleh caspase-8, caspase-9, dan caspase-10. Caspase-3 adalah caspase utama yang terlibat dalam pemotongan protein prekursor amyloid-beta 4A, yang dikaitkan dengan kematian neuron pada penyakit Alzheimer. Splicing alternatif dari gen ini menghasilkan dua varian transkrip yang mengkodekan protein yang sama.

2.1.2. Jalur Aktivasi Caspase-3

Caspase 3 adalah protease kunci dalam proses apoptosis yang berperan pada tahap eksekusi.¹⁷⁻²⁰ Sintesis Caspase-3 dimulai dari gen CASP3, yang menghasilkan proenzim inaktif berbentuk zimogen. Proenzim ini terdiri dari domain prodomain, domain besar, dan domain kecil yang dihubungkan oleh peptida linker. Aktivasi Caspase-3 terjadi melalui dua jalur utama, yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik.²¹ Pada jalur ekstrinsik, apoptosis dimulai dari pengikatan ligand pada reseptor kematian, seperti Fas atau TNF receptor, yang mengaktifkan protein adaptor seperti FADD. Protein ini merekrut dan mengaktifkan caspase-8 melalui pembentukan kompleks DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Caspase-8 yang aktif kemudian memotong peptida linker Caspase-3, menghasilkan subunit besar dan kecil yang berpasangan untuk membentuk enzim aktif.¹⁷⁻²⁰

Pada jalur intrinsik, apoptosis dipicu oleh stres seluler atau kerusakan DNA yang menyebabkan pelepasan cytochrome c dari mitokondria ke sitosol. Cytochrome c kemudian berinteraksi dengan Apaf-1 dan ATP untuk membentuk kompleks apoptosom yang merekrut dan mengaktifkan caspase-9.²¹ Caspase-9 yang aktif selanjutnya memotong dan mengaktifkan Caspase-3. Caspase-3 yang telah aktif memotong berbagai substrat, seperti PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase), protein struktural, dan protein pengatur, yang menyebabkan perubahan morfologi sel, seperti kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA. Selain itu,

Caspase-3 juga berperan dalam pemotongan protein prekursor amyloid-beta yang terkait dengan penyakit Alzheimer. Sintesis dan aktivasi Caspase-3 diatur secara ketat untuk menjaga keseimbangan apoptosis, yang penting dalam mencegah gangguan seperti kanker atau penyakit neurodegeneratif.^{17–20}

2.1.3. Peran Caspase 3 pada DMT2

Caspase-3 memiliki peran penting dalam patofisiologi DMT2, terutama dalam proses apoptosis sel beta pankreas dan resistensi insulin.^{22–24} Pada DMT2, hiperglikemia kronis, stres oksidatif, dan inflamasi sistemik menyebabkan aktivasi jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik yang melibatkan caspase-3. Dalam jalur intrinsik, stres oksidatif akibat akumulasi glukosa yang berlebihan memicu disfungsi mitokondria dan pelepasan cytochrome c, yang membentuk kompleks apoptosom dengan Apaf-1 dan mengaktifkan caspase-9. Caspase-9 kemudian memotong caspase-3, menghasilkan enzim aktif yang memicu fragmentasi DNA, degradasi protein struktural, dan kematian sel beta pankreas. Kehilangan sel beta ini mengurangi kemampuan pankreas untuk memproduksi insulin, memperburuk hiperglikemia.^{22–24}

Selain itu, caspase-3 juga berperan dalam jalur ekstrinsik yang dimediasi oleh reseptor kematian, seperti Fas dan TNF reseptor, yang sering diaktifkan oleh inflamasi sistemik pada DMT2. Aktivasi reseptor ini menginduksi caspase-8, yang selanjutnya mengaktifkan caspase-3, meningkatkan apoptosis sel beta. Tidak hanya pada sel beta, caspase-3

juga berkontribusi pada disfungsi adiposit dan miopati metabolik. Aktivasi caspase-3 dalam jaringan adiposa memicu apoptosis adiposit, menyebabkan pelepasan asam lemak bebas ke sirkulasi yang mengganggu sensitivitas insulin. Di otot rangka, caspase-3 terlibat dalam degradasi protein dan gangguan fungsi mitokondria, yang semakin mengurangi kemampuan jaringan untuk menggunakan glukosa secara efektif.²²⁻²⁴

2.2. Indeks Homa IR

2.2.1. Resistensi Insulin dan Inflamasi

Resistensi insulin dan inflamasi kronis memiliki hubungan yang erat dalam patogenesis DMT2. Inflamasi kronis yang dimediasi oleh sitokin dan growth factors menyebabkan resistensi insulin dengan mengganggu jalur sinyal insulin di sel target. Misalnya, TNF- α dan IL-6 dapat menghambat fosforilasi reseptor insulin dan substratnya, IRS-1, yang merupakan langkah kunci dalam sinyal insulin. Gangguan ini mengakibatkan penurunan efektivitas insulin dalam merangsang pengambilan glukosa oleh sel, yang berkontribusi terhadap hiperglikemia.^{25,26}

Di sisi lain, resistensi insulin juga dapat memperburuk inflamasi. Ketika insulin tidak dapat berfungsi secara optimal, sel-sel tubuh mengalami peningkatan lipolisis, yang menghasilkan asam lemak bebas dalam sirkulasi. Asam lemak bebas ini dapat memicu respons inflamasi melalui aktivasi jalur NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer

of activated B cells), yang merupakan salah satu regulator utama inflamasi. Hal ini menciptakan lingkaran setan di mana inflamasi menyebabkan resistensi insulin, dan resistensi insulin memperburuk inflamasi.^{25,26}

2.2.2. HOMA-IR dalam Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2)

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) adalah indeks yang digunakan untuk mengukur resistensi insulin, sebuah kondisi di mana sel-sel tubuh menjadi kurang sensitif terhadap insulin. Ini adalah salah satu penanda penting dalam penilaian risiko dan diagnosis awal DMT2, serta dalam pemantauan perkembangan penyakit ini.^{27,28}

2.2.3. Konsep Dasar HOMA-IR

HOMA-IR dihitung berdasarkan kadar glukosa puasa dan insulin puasa dalam darah. Rumus dasar untuk menghitung HOMA-IR adalah:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glukosa Puasa (mg/dL)} \times \text{Insulin Puasa (}\mu\text{U/mL)}}{405}$$

Rumus ini didasarkan pada model matematika yang mensimulasikan interaksi antara insulin dan glukosa dalam keadaan puasa. Nilai HOMA-IR yang tinggi menunjukkan adanya resistensi insulin, sementara nilai yang lebih rendah menunjukkan sensitivitas insulin yang lebih baik.

2.2.4. Peran HOMA-IR dalam DMT2

Pada DMT2, resistensi insulin adalah salah satu mekanisme patofisiologis utama. Resistensi insulin mengacu pada kondisi di mana sel-sel tubuh, terutama di jaringan otot, lemak, dan hati, tidak merespons

insulin dengan baik. Akibatnya, glukosa tidak dapat dengan mudah masuk ke dalam sel, menyebabkan hiperglikemia.^{27,28}

HOMA-IR menjadi indeks penting untuk menilai progresivitas resistensi insulin yang terjadi pada seseorang. Pasien dengan DMT2, nilai HOMA-IR sering kali meningkat, mengindikasikan penurunan kemampuan insulin untuk bekerja dengan efektif. Peningkatan HOMA-IR dapat terjadi jauh sebelum munculnya hiperglikemia klinis yang signifikan, sehingga menjadi indeks prediksi yang berguna dalam identifikasi dini DMT2 pada individu dengan risiko tinggi.^{27,28}

2.2.5. Interpretasi Nilai HOMA-IR

Nilai HOMA-IR bervariasi tergantung pada populasi dan kriteria diagnostik yang digunakan, tetapi umumnya nilai di bawah 1 dianggap normal, nilai antara 1 hingga 2,9 menunjukkan resistensi insulin ringan hingga sedang, dan nilai di atas 2,9 mengindikasikan resistensi insulin yang signifikan. Pada populasi tertentu, nilai HOMA-IR di atas 2,5 atau 3 juga dapat digunakan sebagai indikator resistensi insulin.^{27,28}

2.3. Sekretom Mesenchymal Stem Cell

2.3.1. Definisi Mesenchymal Stem Cell

Mesenchymal stem cells (MSC) adalah sel multipoten yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti osteosit, kondrosit, dan adiposit. Selain kemampuan diferensiasi ini, MSC juga dikenal karena sifat imunomodulasi dan kapasitasnya dalam mendukung

regenerasi jaringan melalui sekresi molekul bioaktif yang dikenal sebagai "sekretom MSC." Sekretom ini mengandung campuran kompleks sitokin, growth factors, dan material genetik seperti mikroRNA (miRNA), yang dilepaskan melalui vesikel ekstraseluler (EV), termasuk eksosom dan mikrovesikel. Sekretom MSC kini dianggap sebagai komponen penting dalam pendekatan terapeutik modern, terutama dalam konteks penyakit degeneratif seperti Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2).^{29,30}

2.3.2. Definisi dan Kandungan Sekretom MSC

Sekretom MSC adalah produk yang dihasilkan dan dilepaskan oleh MSC, yang terdiri dari berbagai komponen bioaktif. Komponen utama dari sekretom MSC meliputi³¹⁻³⁶:

- a) **TGF- β (Transforming Growth Factor-beta)** : Berperan dalam pengaturan imunitas dan mendukung proses penyembuhan dengan mengurangi inflamasi dan mempromosikan pembentukan jaringan baru.
- b) **Interleukin-10**: Sitokin antiinflamasi yang menghambat respon inflamasi berlebihan, yang sering kali merusak jaringan.
- c) **Interleukin-6**: Meskipun biasanya bersifat pro-inflamasi, IL-6 dalam konteks tertentu juga dapat mendukung regenerasi jaringan.
- d) **Tumor Necrosis Factor-alpha**: Sitokin pro-inflamasi yang dalam jumlah terkendali bisa mempromosikan penyembuhan jaringan dengan menginisiasi proses regeneratif.
- e) **Vascular Endothelial Growth Factor**: Penting untuk angiogenesis dan mendukung penyembuhan luka serta pemulihan jaringan yang rusak.

- f) **Hepatocyte Growth Factor:** Berperan dalam regenerasi sel dan memiliki efek anti-apoptosis, yang melindungi sel-sel dari kematian akibat stres.
- g) **Insulin-like Growth Factor-1:** Growth factor yang penting dalam proliferasi sel, diferensiasi, dan perbaikan jaringan, terutama dalam konteks regenerasi sel beta pankreas.
- h) **Fibroblast Growth Factor:** Growth factor yang mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel serta perbaikan jaringan.
- i) **Material Genetik:** Sekretom MSC juga mengandung material genetik, terutama dalam bentuk mikroRNA (miRNA) yang dibawa oleh vesikel ekstraseluler. MikroRNA yang terkandung dalam secretome antar lain miRNA-21, miRNA-126, dan miRNA-146a, yang berperan dalam regulasi jalur inflamasi dan regenerative.

2.3.3. Peran Sekretom MSC dalam Mengatasi Resistensi Insulin

Resistensi insulin adalah kondisi di mana sel-sel tubuh tidak merespons insulin dengan baik, yang menyebabkan kadar glukosa darah yang tinggi. Ini adalah karakteristik utama dari DM2 dan berkontribusi secara signifikan terhadap komplikasi penyakit. Sekretom MSC dapat membantu mengurangi resistensi insulin melalui berbagai mekanisme^{14,37,38}:

a) Modulasi Jalur Sinyal Insulin

MikroRNA dalam sekretom MSC, seperti miRNA-126, dapat memodulasi ekspresi protein yang terlibat dalam jalur sinyal insulin, meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin. Misalnya, miRNA-126

diketahui mempengaruhi jalur PI3K/Akt, yang merupakan jalur utama dalam sinyal insulin, sehingga membantu meningkatkan penyerapan glukosa oleh sel.³⁵

b) Mengurangi Stres Oksidatif

Salah satu faktor yang memperburuk resistensi insulin adalah stres oksidatif. Sekretom MSC, dengan kandungan antioksidannya, dapat membantu mengurangi stres oksidatif dalam tubuh, yang pada gilirannya dapat memperbaiki respons sel terhadap insulin. Misalnya, miRNA-146a dalam sekretom MSC dapat menghambat jalur inflamasi NF- κ B, yang terkait dengan resistensi insulin dan peradangan kronis.³⁶

c) Perbaikan Fungsi Metabolik

Growth factors dalam sekretom MSC, seperti IGF-1 dan HGF, juga berperan dalam meningkatkan metabolisme glukosa dan lipid. Ini membantu menurunkan resistensi insulin di jaringan target seperti otot dan hati.^{39,40} VEGF dalam sekretom MSC juga mendukung angiogenesis, yang dapat memperbaiki suplai darah dan nutrisi ke jaringan, sehingga meningkatkan metabolisme lokal dan sensitivitas insulin.⁴¹

d) Penghambatan Apoptosis sel Pankreas

Secretome Mesenchymal Stem Cells mengandung berbagai faktor bioaktif yang mampu menekan ekspresi Caspase 3, enzim eksekutor utama dalam apoptosis sel pankreas pada DMT2. Eksosom MSCs mengandung microRNA (miRNA-21 dan miRNA-29) yang secara

langsung menghambat aktivasi Caspase 3 dengan menekan jalur proapoptotik seperti Bax/Bak dan meningkatkan ekspresi Bcl-2, protein antiapoptosis.³⁶

Faktor pertumbuhan seperti IGF-1, HGF, dan EGF dalam secretome MSCs berperan dalam menghambat aktivasi Caspase 3 melalui jalur PI3K/AKT, yang meningkatkan kelangsungan hidup sel β pankreas. Sitokin antiinflamasi seperti TGF- β dan IL-10 juga berkontribusi dengan menekan stres oksidatif dan inflamasi, faktor utama yang memicu aktivasi Caspase 3. Dengan mekanisme ini, secretome MSCs berpotensi sebagai terapi protektif untuk menghambat apoptosis sel pankreas dan mempertahankan fungsi sekresi insulin pada DMT2.³⁶

2.4. Air Alkali

2.4.1. Definisi Antioksidan dan Stres Oksidatif

Antioksidan adalah molekul yang melindungi tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas, yaitu molekul tidak stabil yang dapat merusak sel-sel sehat. Stres oksidatif terjadi ketika jumlah radikal bebas melebihi kemampuan tubuh untuk menetralkannya, yang dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan, termasuk penuaan dini, peradangan, dan penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung.^{3,42–}

44

Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan elektron kepada radikal bebas, menetralkan mereka, dan mencegah mereka merusak sel-

sel tubuh. Beberapa sumber alami antioksidan termasuk buah-buahan, sayuran, dan teh hijau. Air alkali telah dipromosikan sebagai sumber antioksidan karena kemampuannya untuk memberikan ion hidrogen aktif, yang dapat berperan dalam mengurangi radikal bebas.^{3,42-44}

2.4.2. Air Alkali dan Peranannya sebagai Antioksidan

Air alkali adalah jenis air yang memiliki pH lebih tinggi dari 7, biasanya berkisar antara 8 hingga 9,5. Ini dicapai melalui proses ionisasi atau dengan menambahkan mineral alkali seperti kalsium, magnesium, dan kalium. Dalam beberapa tahun terakhir, air alkali telah mendapat perhatian karena potensinya sebagai antioksidan, yang diyakini dapat membantu melawan stres oksidatif dalam tubuh.^{3,42-44}

Air alkali diklaim memiliki potensi sebagai antioksidan karena mengandung ion hidrogen aktif yang dapat berfungsi sebagai penangkal radikal bebas. Ion-ion ini dapat memberikan elektron tambahan kepada radikal bebas, menstabilkannya, dan mencegah mereka dari merusak sel-sel tubuh. Proses ini mirip dengan cara antioksidan alami bekerja di dalam tubuh.^{3,42-44}

Salah satu alasan utama di balik klaim ini adalah kemampuan air alkali untuk menghasilkan Oxidation Reduction Potential (ORP) negatif. ORP adalah ukuran kemampuan suatu substansi untuk mengurangi oksidasi, dan nilai negatif menunjukkan bahwa substansi tersebut memiliki kemampuan antioksidan. Air alkali dengan ORP negatif diyakini dapat membantu mengurangi stres oksidatif dalam tubuh, yang

pada gilirannya dapat mendukung kesehatan secara keseluruhan.^{3,42–44}

Beberapa penelitian telah meneliti efek air alkali pada tubuh, terutama terkait dengan stres oksidatif dan kesehatan secara keseluruhan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa konsumsi air alkali dapat meningkatkan status antioksidan dalam tubuh, yang dapat membantu melawan stres oksidatif. Misalnya, studi pada hewan menunjukkan bahwa air alkali dapat mengurangi kerusakan oksidatif pada DNA dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan di dalam tubuh.^{3,42–44}

Selain itu, beberapa studi pada manusia menunjukkan bahwa air alkali dapat membantu meningkatkan hidrasi, mendukung fungsi kekebalan tubuh, dan mengurangi gejala kelelahan. Ini mungkin terkait dengan kemampuannya untuk menetralkan asam dalam tubuh dan memberikan antioksidan yang membantu melawan efek radikal bebas.^{3,42–44}

2.5. Hubungan HOMA-IR, Caspase 3, SH-MSC dan Air Alkali pada DMT2

Diabetes Mellitus Tipe 2 ditandai oleh resistensi insulin, yang sering diukur menggunakan HOMA-IR, serta peningkatan apoptosis seluler yang ditandai oleh ekspresi protein Caspase-3.^{24,45} Kombinasi intervensi dengan pemberian SH-MSC dan air alkali dianggap berpotensi memperbaiki patofisiologi DMT2.

SH-MSC merupakan produk biologis yang mengandung berbagai faktor bioaktif, seperti sitokin dan eksosom, yang memiliki efek protektif terhadap jaringan yang rusak. Kondisi hipoksia meningkatkan sifat terapeutik

secretome MSC, termasuk aktivitas antiinflamasi, antiapoptosis, dan perbaikan resistensi insulin. Beberapa studi menunjukkan bahwa SH-MSC mampu menurunkan resistensi insulin dengan meningkatkan sensitivitas insulin serta melindungi sel β -pankreas dari apoptosis.^{29,30}

Air alkali, di sisi lain, diketahui memiliki efek antioksidan yang kuat, yang mampu mengurangi stres oksidatif pada pasien DMT2. Stres oksidatif adalah salah satu penyebab utama kerusakan seluler dan resistensi insulin. Air alkali juga berperan dalam meningkatkan fungsi metabolik tubuh, yang dapat membantu menurunkan kadar glukosa darah serta mengurangi parameter HOMA-IR.^{3,42-44}

Kombinasi SH-MSC dan air alkali diyakini memiliki efek sinergis dalam menekan resistensi insulin dan apoptosis. SH-MSC bekerja pada tingkat molekuler untuk mengurangi inflamasi dan memperbaiki jaringan, sementara air alkali mendukung lingkungan sistemik dengan menurunkan stres oksidatif dan meningkatkan metabolisme. Efek ini dapat mengurangi HOMA-IR secara signifikan dan menekan ekspresi Caspase-3, sehingga memperbaiki fungsi metabolik dan melindungi sel β -pankreas dari kerusakan.

BAB III

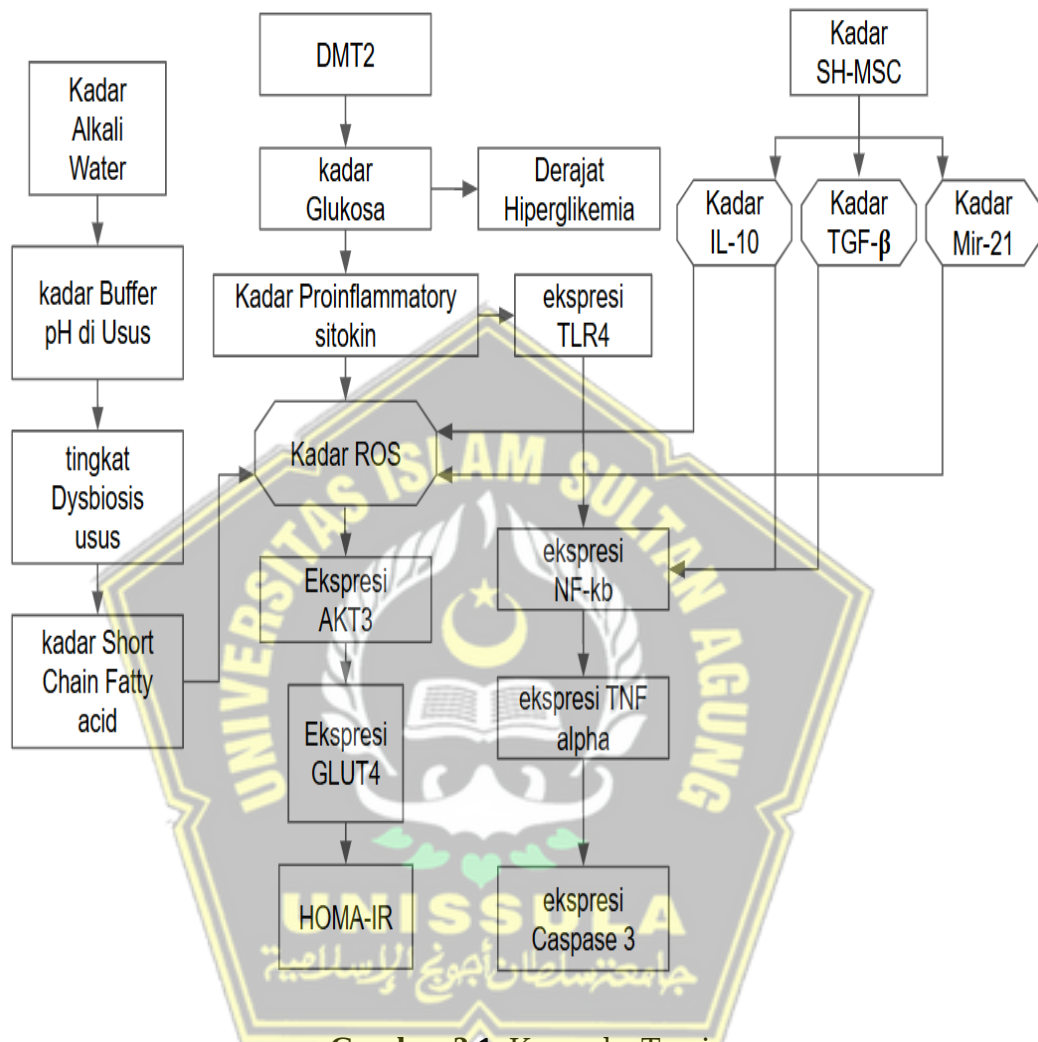
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Diabetes Melitus tipe 2 yang disebabkan oleh inflamasi berkepanjangan akan meningkatkan produksi ROS dan akan mengaktifasi pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α , dan IFN- γ . Produksi sitokin proinflamasi yang berkepanjangan akan mengaktifasi jalur apoptosis sel melalui protein Capase 3. Apoptosis akan merusak sel-sel pulau Langerhans, terutama sel beta pankreas sehingga menghambat sekresi insulin, yang berkontribusi pada resistensi insulin dan akhirnya menyebabkan hiperglikemia.

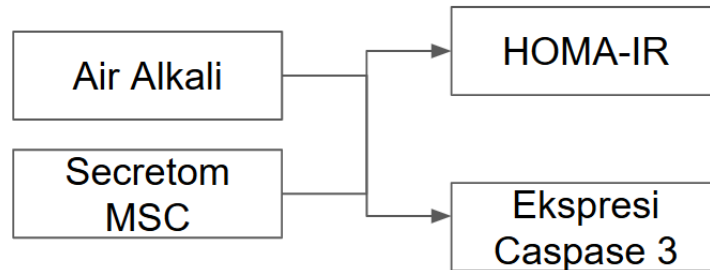
MSC yang dipreparasi dalam kondisi hipoksia menghasilkan lebih banyak sitokin, seperti IL-10, Mir-21 dan TGF- β yang bersifat sebagai anti inflamasi kuat yang mampu menekan Nf-kB sehingga menekan sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α . Ini melindungi sel beta pankreas, memungkinkan proliferasi dan peningkatan sekresi insulin, serta mengurangi kadar glukosa darah.

Air alkali, yang memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi, juga efektif dalam menurunkan ROS dan menghambat sitokin proinflamasi. Perlindungan sel beta dan peningkatan sekresi insulin yang dihasilkan membantu mengurangi resistensi insulin, yang tercermin dalam perbaikan nilai HOMA-IR, sehingga meningkatkan kontrol glikemik pada pasien diabetes.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian SH-MSC yang dikombinasi dengan air alkali terhadap indeks Homa IR dan ekspresi Caspase 3 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan rancangan penelitian *Post test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang mendapatkan intervensi placebo (kontrol negatif), 1 kelompok perlakuan yang mendapat terapi standar (kontrol positif) dan 1 kelompok tikus sehat sebagai base line data. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.⁴⁶

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut:



Gambar 4. 1 Rancangan Penelitian⁴⁷

Keterangan :

S = Sampel

R = Random

V = Validasi HOMA-IR dan Gula Darah

SDMT2 = Subyek Diabetes Melitus Tipe 2

- K1 : Kelompok 1: Tikus sehat tidak diberikan perlakuan, kontrol sehat
- K2 : Kelompok 2: DMT 2 dengan injeksi NaCL 0,9 % : kontrol negative
- K3 : Kelompok 3: DMT 2 perlakuan metformin 45 mg/kgBB per oral secara sonde
- K4 : Kelompok 3: DMT 2 perlakuan injeksi IP SH-MSC dosis 500 µL
- K5 : Kelompok 4: DMT 2 perlakuan injeksi IP SH-MSC dosis 500µL dan air alkali oral 5 ml per hari
- O1K1 : Observasi Ekspresi gen Caspase 3 dan Homa IR K1
- O2K2 : Observasi Ekspresi gen Caspase 3 dan Homa IR K2
- O3K3 : Observasi Ekspresi gen Caspase 3 dan Homa IR K3
- O4K4 : Observasi Ekspresi gen Caspase 3 dan Homa IR K4
- O5K4 : Observasi Ekspresi gen Caspase 3 dan Homa IR K5

4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional

4.2.1. Variabel penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah SH-MSC dan Air Alkali

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah indeks Homa-IR dan ekspresi Caspase 3

c. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah DMT2

d. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah strain tikus Wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi/pakan tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2. Definisi Operasional Variabel

a. SH-MSC

Secretome MSC adalah kumpulan molekul bioaktif dari MSC yang berpotensi terapeutik. Untuk memperoleh secretome, digunakan Tangential Flow Filtration (TFF) dengan filter 10-500 kDa, yang memisahkan dan mengonsentrasikan molekul penting secretome berdasarkan ukuran untuk digunakan dalam penelitian atau terapi. Sekretom MSC diberikan secara injeksi intraperitoneal sebanyak 500 μ L/tikus.

- Satuan : mL
- Skala : Rasio

b. Air Alkali

Air alkali adalah air dengan pH 8 didapatkan dari PT. SCCR Indonesia dengan teknologi nano partikel yang diberikan secara oral pada tikus DMT2 sebanyak 5 ml/hari yang dibagi menjadi 2 kali pemberian menggunakan sonde.

- Satuan : mL

- Skala : Rasio

c. Ekspresi Caspase 3

Ekspresi Caspase 3 merupakan ekspresi mRNA yang mengkode protein Caspase 3 pada jaringan pancreas. Ekspresi Caspase 3 diukur pada hari ke 21 setelah pemberian pertama perlakuan menggunakan metode RT-PCR. Primer yang digunakan adalah Forward primer Caspase 3: 5'-GGA GCA ATA AGT GCA GCA GCA-3', Reverse primer Caspase 3: 5'-GGT CGT AGT TCA GGT CAT CAG-3'.

- Satuan : *Fold Change*
- Skala : Rasio

d. Indeks Homa IR

Indeks HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance) dihitung dengan rumus:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glukosa puasa (mg/dL)} \times \text{Insulin puasa (}\mu\text{U/mL)}}{405}$$

Glukosa dan insulin puasa diukur dari sampel darah. HOMA-IR digunakan untuk menilai resistensi insulin, dengan nilai lebih tinggi menunjukkan tingkat resistensi yang lebih besar.

- Skala ratio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram. Subjek penelitian dipelihara di fasilitas Animal Model Research Center SCCR Indonesia, Semarang dalam kandang plastik yang berukuran 37 x 40 x 18cm dengan kondisi temperatur ruangan 23-25°C, kelembaban 40-70% dan siklus gelap terang setiap 12 : 12 jam. Subjek penelitian diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.³⁷

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Tikus sehat.
2. Tikus putih Jantan Galur Wistar
3. Umur 6-8 minggu
4. Berat Badan 200-250 gr

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur Wistar dengan kriteria:

1. Tidak berhasil diinduksi DMT2 (GDP<126 mg/dl, HOMA IR <2.9)

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K1 (tikus sehat), K2 (tikus model DMT2 dengan injeksi NaCL 0,9 %), K3 (tikus model DMT2 dengan pemberian metformin 45 mg/kgBB secara oral), K4 (tikus model DMT2 yang mendapatkan intervensi *secretome hypoxia* MSC dengan dosis 500 uL) dan K5 (tikus model DMT2 yang mendapatkan *secretome hypoxia* MSC dengan dosis 500 uL yang dikombinasikan dengan air alkali 15 ml).⁴⁸

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus sampel eksperimental dari Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

$$\text{Rumus Federer} : (t-1)(n-1) \geq 15$$

$$\text{Sampel tiap Kelompok} : (5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$n \geq 5$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor tikus perkelompok. Sebagai Cadangan sampel, masing-masing kelompok ditambah 1 ekor tikus.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Pelitian ini menggunakan beberapa peralatan yaitu:

- a. Alat untuk pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus yang terbuat dari plastik berukuran 50cm x 30cm x 20cm dengan tutup kawat dan alasnya diberi sekam. Kandang dilengkapi dengan tempat pakan dan botol air minum.
- b. Alat untuk perlakuan pada tikus seperti timbangan digital, *glove* dan masker
- c. Alat untuk preparasi dan penyimpanan sampel jaringan meliputi tabung hematokrit, spuit 1 cc, *vacutainer EDTA*, *ice pack*, *cool box*, pinset, *centrifuge*, *cryotube* 1,5cc, *vial tube* 1,5cc, dan *cryobox*.
- d. Alat untuk analisis parameter meliputi pinset, *scapel*, *pastel rotor*, *centrifuge*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *micropipet*, *vortex*, *water bath*, *western Bloth Machine*, elektroforesis, Gel doc, optilab, mikroskop, *deckglass*, *staining chamber*, *humidity chamber*, *cover glass*, *BD Accuri C6 Plus flow cytometer*, *Fluorometer Quantus*, *ELISA reader*, *Hypoxia chamber*, *dissolved oxygen meter*, *Tangential flow filtration pulse*, *filter chip 5-300 kDA*, *Liquid Nitrogen* sebagai tempat penyimpanan sel dengan temperature -196 C (dilaboratorium).

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain asam asetat, Streptozotocin, ELISA Kit MDA dan primer p65, *umbilical cord* tikus, *medium alfa* MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), DMEM (Gibco BRL, Grand island, NY, USA), Trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA), fungizone 1%, *Triptan blue* (Sigma, St Louis, MO, USA), stopper, NaCl 0,9%, PBS (*Phospat Buffer Saline*), *Ficoll Hypaque*, Alkohol 70%, 80%, 95%, dan 100%, streptomycin- penicillin 1% dan xylol. Sedangkan untuk validasi adalah Anti-Rat CD90 PerCP, Anti-Rat CD29 Alexa Fluor 647, Anti-Rat CD31 PE, dan Anti-Rat CD45 FITC, Media Basal Diferensiasi Adipogenik MesenCult, *Oil Red O*, *Alizarin Red*, ELISA Kit Insulin (Elabscience, E-EL-R3034), Forward primer Caspase 3: 5'-GGA GCA ATA AGT GCA GCA GCA-3', Reverse primer Caspase 3: 5'-GGT CGT AGT TCA GGT CAT CAG-3'.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearence penelitian diperoleh dari Komisi Bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar umur 6 sampai 8 minggu, berat 150-200 gram didapatkan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Semarang. Tikus dipelihara dalam kandang

plastik yang berukuran 37 x 40 x 18cm dengan kondisi temperatur ruangan 23-25°C, kelembaban 40-70% dan siklus gelap terang setiap 12 : 12 jam. Tikus diadaptasi selama 5 hari dengan diberi pakan standar BR A591K dan air minum secara *ad libitum*

4.5.3. Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2

Induksi DMT2 dilakukan dengan injeksi Nicotinamide dengan dosis 15 mg/kg secara intra peritoneal setelah 15 menit dilanjutkan dengan injeksi STZ dengan dosis 50 mg/kg berat badan yang telah dilarutkan dalam sodium citrate 0,1 M secara intra peritoneal dengan spuit 1 cc, serta diberi minum larutan sukrosa 30 % sebanyak 50 cc secara *ad libitum* selama 2 hari. Pengukuran glukosa darah puasa 4-6 jam diambil dari pembuluh darah ekor/vena lateralis dilakukan 7 hari setelah suntikan STZ terakhir, masing-masing menggunakan glukometer glucoDR Bio-sensor dan timbangan digital (total 7 hari induksi diabetes). Tikus dinyatakan diabetes apabila glukosa darah puasa > 126 mg/dL.³⁷

4.5.4. Perhitungan Resistensi Insulin (HOMA-IR)

Serum darah diambil dari vena sub orbita tikus yang telah dipuasakan dari 03.00-09.00 WIB pada hari ke-7 setelah injeksi STZ, kadar insulin dievaluasi dengan ELISA. Glukosa darah puasa dihitung menggunakan alat pengukur gula darah. Penghitungan HOMA-IR

menggunakan rumus, tikus dinyakanan mengalami DMT2 jika HOMA IR >2,9.

$$\frac{\text{Insulin darah puasa } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glukosa darah puasa}}{(\text{mmol/ml})22,5}$$

4.5.5. Perlakuan Hewan Coba

Secretome Hipoksia MSC diperoleh dari Laboratorium SCCR Indonesia setelah melalui proses validasi MSC. Setelah terbentuk tikus model DMT2, tikus diinjeksi sekretom dengan dosis 500 uL secara intraperitoneal pada hari ke-8, 15 dan 22, untuk K4 dan K5, serta setiap hari mendapatkan asupan minum berupa air alkali 5 mL secara oral dengan dosis 5 mL/hari untuk K5 hingga hari ke-29. Sebagai perbandingan, tikus kontrol negatif (K2) disuntik dengan NaCl 0,9% pada hari ke 8, 15, dan 22 dan tikus kontrol positif (K3) diberikan metformin dosis 45 mg/kgBB secara oral. Terminasi dan koleksi sampel dilakukan pada hari ke-30.

4.5.6. Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah tikus melalui vena orbita menggunakan tabung hematokrit. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum. Pengambilan serum dilakukan pada hari ke 7 setelah induksi STZ untuk analisis kadar STZ.

4.5.7. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan pancreas dilakukan pada hari ke 30 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Sampel jaringan dimasukkan didalam RNA later. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.5.8. Analisis kadar Insulin Pancreas dengan ELISA

Perhitungan kadar Insulin dilakukan menggunakan metode ELISA dengan cara sebagai berikut:

1. Menyampurkan standard dan dilusi standard menjadi konsentrasi 300, 150, 75, 37,5, 18,7, dan 0 pg/ml.
2. Menyiapkan sumuran kosong, sumuran standard, dan sumuran sampel.
3. Menambahkan cairan conjugasi 50 µl ke sumuran standard.
4. Menambahkan dilusi spesial sebanyak 40 µl dan sampel 10 µl.
5. Menambahkan 50 µl *horseradish peroxidase* (HRP) pada tiap lubang, lalu inkubasi 60 menit pada suhu 37° C.
6. Buang cairan dan keringkan tiap sumuran.
7. Beri cairan pencuci, aduk, dan kocok selama 30 menit ulangi sebanyak 5 kali lalu keringkan.
8. Beri 50 µl *chromogen solution A* dan *chromogen solution B*

pada tiap sumuran. Aduk rata dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C.

9. Beri larutan *stopper* 50 µl pada tiap sumuran
10. Baca menggunakan ELISA panjang gelombang 450 nm

4.5.9. Cara Pemeriksaan Tikus Galur Wistar Jantan Menggunakan RT-PCR

1. Ambil 100 mg sampel lemak, potong kecil, dan masukkan ke dalam tabung yang sudah berisi 50 mL RNA Iso Plus.
2. Hancurkan potongan lemak dengan micropastle, tambahkan 50 mL RNA Iso Plus, dan biarkan selama 5 menit pada suhu ruang.
3. Tambahkan 20 mL chloroform dan aduk hingga larutan menjadi berwarna putih susu.
4. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, lalu sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C. Hasilnya adalah tiga lapisan dalam tabung: lapisan atas berisi RNA (fase cair), lapisan kedua berisi DNA (fase setengah padat), dan lapisan bawah berisi debris sel.
5. Alihkan lapisan paling atas (RNA) ke tabung *sentrifuge* baru, ukur volumenya, dan tambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan atas.
6. Lakukan gerakan menggoyang tabung campuran hingga muncul benang-benang putih, lalu sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10

menit pada suhu 40°C. Buang supernatan hingga pelet berwarna putih terlihat di dasar tabung.

7. Setelah pengeringan, tambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*) dan lakukan pengadukan ulang, lalu sentrifugasi lagi pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40°C.
8. Buang supernatan dan tambahkan DEPC sebanyak 30-50 µm. Campuran diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Hasilnya adalah total RNA solution yang disimpan pada suhu -80°C. Kuantifikasi RNA dilakukan menggunakan Nanodrop, dengan target 3000 ng.
9. Sintesis cDNA dimulai dengan mencampur sampel RNA yang sudah dikuantifikasi, 1 µL Oligo(dT), dan PCR water hingga mencapai volume 10 µL, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 70°C.
10. Campuran A dicampur dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer (4 µL), DEPC-Treated H₂O (5 µL), dan ReverTraAce (1 µL). Campuran ini diinkubasi pada suhu tertentu (25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit, dan 85°C selama 5 menit) untuk menghasilkan cDNA.

4.5.10. Pembacaan ekspresi gen Caspase 3 dengan RT-PCR

1. Ekspresi gen Caspase 3 dievaluasi melalui metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2. Dalam reaksi PCR, digunakan campuran yang terdiri dari 3 μL cDNA sampel, 12,5 μL Taq master mix yang mencakup dNTPs, Taq DNA *polymerase*, *reaction buffer*, dan MgCl_2 , 0,6 μL primer spesifik untuk masing-masing gen target (*primer forward* dan *reverse*), dan 8,3 μL *Nuclease Free Water*.
3. Primer yang digunakan untuk primer Caspase 3: 5'-GGA GCA ATA AGT GCA GCA GCA-3', Reverse primer Caspase 3: 5'-GGT CGT AGT TCA GGT CAT CAG-3'.
4. Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan metode qRT-PCR Illumina.
5. Peningkatan ekspresi gen dievaluasi dengan menghitung rasio peningkatan terhadap gen *housekeeping*, dan data ini dianalisis menggunakan perangkat lunak EcoStudy

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia. Penelitian dilakukan pada Desember 2024 – Januari 2025

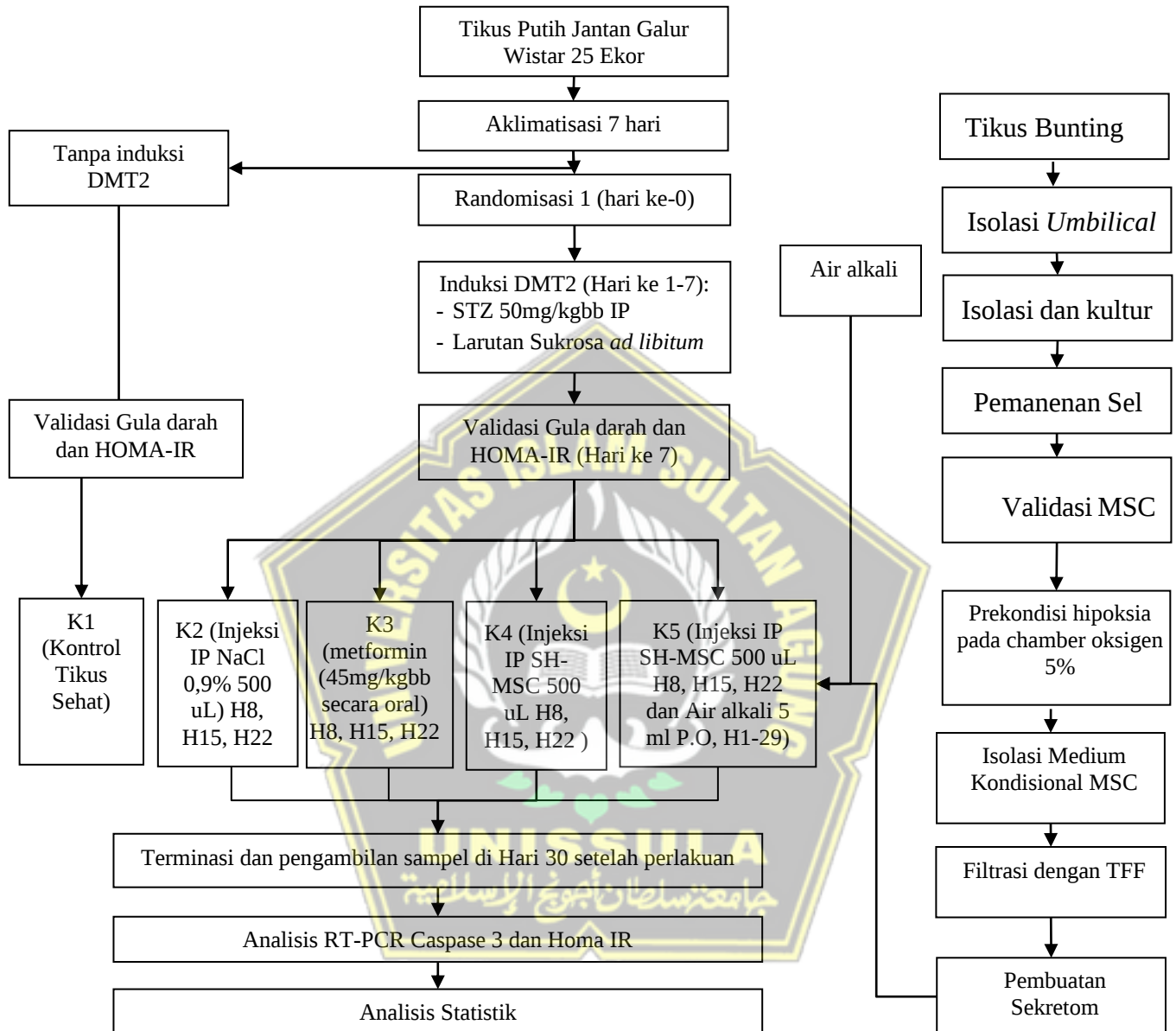
4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test* dan dilanjutkan dengan uji beda *One Way Anova* dan post hoc dengan uji

Post Hoc LSD untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil

5.1.1. Validasi Tikus Diabetes Type 2

Penelitian ini merupakan studi eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Indonesia, Semarang, dari Desember 2024 hingga Januari 2025. Subjek penelitian adalah tikus jantan dengan DMT2 yang diinduksi STZ 50 mg/kgBB dan larutan sukrosa. Tikus dibagi menjadi empat kelompok: K1, K2 (NaCl 0,9%), K3 (metformin 45 mg/kgBB secara oral), K4 (SH-MSCs 500 μ L intraperitoneal), dan K5 (SH-MSCs 500 μ L intraperitoneal + air alkali 5 mL peroral pada hari ke-8, 15, dan 22). Validasi DMT2 dilakukan melalui analisis GDP dan HOMA-IR. Kadar glukosa darah K2 meningkat signifikan hingga 481 mg/dL dan bertahan di atas 400 mg/dL. Sedangkan indeks HOMA-IR memiliki nilai sebesar 20,91. Berdasarkan kedua data tersebut, didapatkan hasil bahwa tikus telah mengalami DMT2 setelah injeksi STZ.

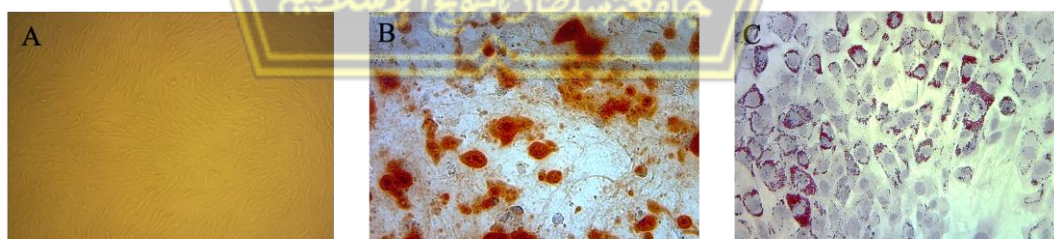
Tabel 5. 1. Hasil Validasi Tikus DMT2

Parameter	Tikus Sehat	Tikus Induksi STZ
Gula Darah Puasa	105 mg/dL	481 mg/dL
HOMA-IR	0,77	20,91

5.1.2. Validasi Mesenchymal Stem Cell dan SH-MSC

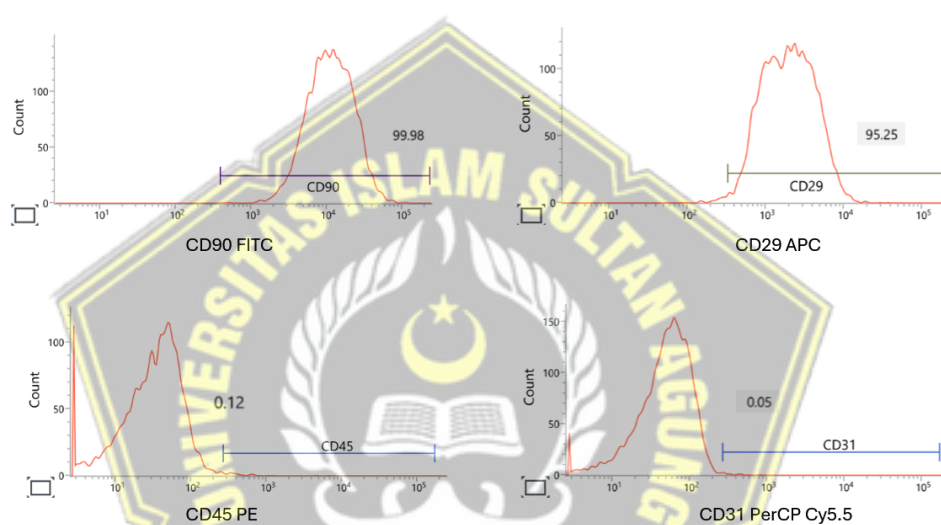
Sel hasil isolasi dikultur dalam flask kultur dengan medium khusus. Setelah mencapai pasase ke-4 dan mengalami kondisi hipoksia selama 24 jam, sel MSCs menunjukkan morfologi spindle shape, melekat pada dasar flask (Gambar 5.1 A).

Sel hipoksia mesenchymal stem cells (H-MSCs) kemudian dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 14 hari untuk menguji potensinya berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit sebagai salah satu metode validasi MSCs. Diferensiasi osteogenik ditandai dengan adanya deposit kalsium, yang diidentifikasi melalui pewarnaan Alizarin Red (Gambar 5.1 B), sedangkan diferensiasi adipogenik terlihat dari akumulasi droplet lipid, yang divisualisasikan dengan pewarnaan Oil Red O (Gambar 5.1 C). Pewarnaan merah pada masing-masing kultur menunjukkan keberhasilan diferensiasi osteosit dan adiposit.



Gambar 5. 1. Validasi Morfologi dan Diferensiasi MSC

Validasi lebih lanjut dilakukan melalui flow cytometry untuk mengonfirmasi ekspresi surface marker spesifik. Secara kuantitatif, H-MSCs menunjukkan ekspresi positif untuk CD90 (99,98%) dan CD29 (95,25%), serta ekspresi negatif untuk CD45 (0,12%) dan CD31 (0,05%) (Gambar 5.2).



Gambar 5. 2. Validasi Flowcytometer MSC

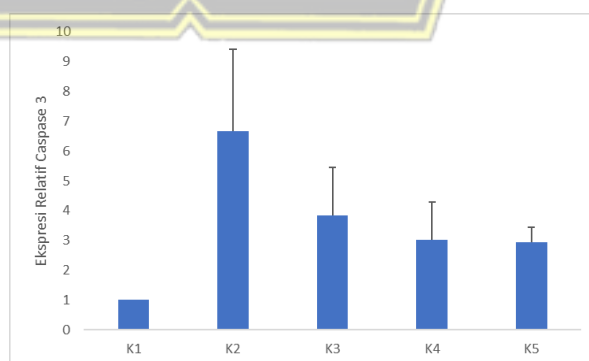
Sampel sekretom MSCs dalam penelitian ini diperoleh melalui isolasi MSC yang dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia, Semarang, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting berusia 19 hari. Medium kultur H-MSCs kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan TFF untuk memperoleh SH-MSC yang mengandung molekul terlarut serta growth factors yang berperan dalam terapi DMT2. Hasil analisis profil protein SH-MSC ditampilkan pada tabel 5.2.

Berdasarkan uji beda ANOVA yang bersifat signifikan, analisis post hoc LSD digunakan untuk menguji hubungan antar kelompok penelitian. Sebagaimana ditampilkan pada Tabel 5.4, didapatkan bahwa K4 dan K5 berbeda signifikan dibandingkan dengan K2 ($P < 0,05$), namun tidak berbeda dibandingkan dengan K3 ($P > 0,05$). Selain itu K4 tidak berbeda jika dibandingkan dengan K5 ($P > 0,05$).

Tabel 5. 4. Hubungan ekspresi gen Caspase 3 antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K2	K3	0,02
	K4	0,00
	K5	0,00
K3	K4	0,38
	K5	0,43
K4	K5	0,93

Berdasarkan hubungan antar kelompok, terdapat tren penurunan ekspresi gen Caspase 3 pada pemberian perlakuan sebagaimana ditampilkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5. 3. Ekspresi Gen Caspase 3

5.1.3. Ekspresi Homa IR

Hasil analisis HOMA-IR (Tabel menunjukkan bahwa kelompok K2 memiliki nilai rata-rata tertinggi ($1,14 \pm 0,27$), diikuti oleh K3 ($1,07 \pm 0,14$), K4 ($0,85 \pm 0,05$), dan K5 dengan nilai terendah ($0,68 \pm 0,14$). Uji normalitas Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P > 0,05$), namun uji homogenitas Levene mengindikasikan bahwa data bersifat tidak homogen ($P < 0,05$). Selanjutnya, hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok ($P < 0,05$), yang menandakan bahwa perlakuan yang diberikan memiliki dampak nyata terhadap perubahan nilai HOMA-IR.

Tabel 5. 5. Hasil analisis HOMA-IR

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	K4 N=6	K5 N=6	
HOMA-IR						
Mean	$0,77 \pm 0,04$	$18,9 \pm 2,63$	$10,8 \pm 1,39$	$7,70 \pm 0,52$	$6,76 \pm 0,96$	
Shapiro Wilk	-	0,52*	0,09*	0,40*	0,09*	
Levene test						0,00**
One way ANOVA						0,00***
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$						

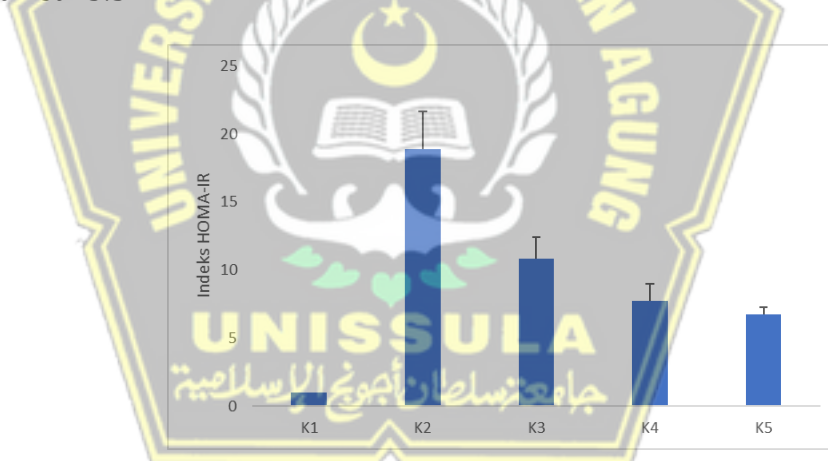
Berdasarkan uji beda ANOVA yang bersifat signifikan dan data yang bersifat normal namun tidak homogen, analisis post hoc Tamhane digunakan untuk menguji hubungan antar kelompok penelitian. Sebagaimana ditampilkan pada Tabel 5.4, didapatkan bahwa K4 tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan K2, K3 dan K5 ($P > 0,05$),

sedangkan K5 berbeda signifikan apabila dibandingkan dengan K2 dan K3 ($P < 0,05$), namun tidak berbeda dibandingkan dengan K4 ($P > 0,05$).

Tabel 5. 6. Hubungan Homa IR antar dua kelompok dengan Uji Post Hoc Tamhane

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K2	K3	0,99
	K4	0,25
	K5	0,04
K3	K4	0,07
	K5	0,00
K4	K5	0,15

Berdasarkan hubungan antar kelompok, terdapat tren penurunan HOMA-IR pada pemberian perlakuan sebagaimana ditampilkan pada Gambar 5.3



Gambar 5. 4. Indeks HOMA-IR

5.2. Pembahasan

Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) dikaitkan dengan peradangan kronis dan resistensi insulin yang dipicu oleh aktivasi jalur inflamasi, seperti NF- κ B, serta peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α dan IL-6. Kedua faktor ini berkontribusi terhadap apoptosis sel β -pankreas, yang menyebabkan penurunan produksi insulin dan gangguan homeostasis

glukosa. Pada penelitian ini, pemberian Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) dan air alkali menunjukkan efek protektif terhadap inflamasi dan apoptosis, sebagaimana dianalisis melalui ekspresi Caspase-3 dan HOMA-IR. Caspase-3 merupakan enzim utama dalam jalur apoptosis yang berperan dalam kematian sel terprogram, terutama pada pankreas penderita DMT2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa K4 ($3,03 \pm 1,26$) dan K5 ($2,93 \pm 0,52$) memiliki ekspresi Caspase-3 yang lebih rendah dibandingkan K2 ($6,66 \pm 2,76$) secara signifikan ($P < 0,05$), namun tidak berbeda dengan K3 ($3,83 \pm 1,61$) ($P > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa SH-MSC, baik dengan maupun tanpa air alkali, mampu menurunkan apoptosis sel β -pankreas yang diinduksi oleh inflamasi. Mekanisme ini dapat dikaitkan dengan komponen sekretom SH-MSC, seperti faktor pertumbuhan (VEGF, IGF-1, dan HGF) yang mendukung regenerasi sel β -pankreas serta menurunkan stres oksidatif yang mengaktifkan NF- κ B.⁴⁹⁻⁵⁴ Selain itu, air alkali berperan sebagai antioksidan yang menurunkan produksi ROS (Reactive Oxygen Species), sehingga mengurangi aktivasi NF- κ B dan ekspresi TNF- α yang menjadi pemicu utama apoptosis sel pankreas.^{3,42,44,55-57}

Indeks HOMA-IR digunakan untuk menilai resistensi insulin, yang merupakan salah satu karakteristik utama DMT2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa K5 ($0,68 \pm 0,14$) memiliki nilai HOMA-IR yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan K2 ($1,14 \pm 0,27$) dan K3 ($1,07 \pm 0,14$) ($P < 0,05$), namun tidak berbeda dengan K4 ($0,85 \pm 0,05$) ($P > 0,05$). Sementara itu, K4 tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok lainnya

($P > 0,05$). Penurunan HOMA-IR pada K5 menunjukkan bahwa kombinasi SH-MSC dan air alkali memberikan efek sinergis dalam meningkatkan sensitivitas insulin. Faktor-faktor pada sekretom SH-MSC, seperti TGF- β dan IL-10, berperan dalam menghambat jalur inflamasi NF- κ B serta menurunkan kadar TNF- α dan IL-6, yang diketahui dapat mengganggu sinyal insulin.⁴⁹⁻⁵⁴ Selain itu, air alkali dapat menurunkan stres oksidatif dan menghambat lipopolisakarida (LPS)-induced inflammation, yang berkontribusi terhadap peningkatan sensitivitas insulin.^{3,42,44,55-57}

Peradangan kronis pada DMT2 menyebabkan peningkatan ekspresi TNF- α dan IL-6, yang mengganggu sinyal insulin melalui fosforilasi serin pada IRS-1, sehingga meningkatkan resistensi insulin. Aktivasi jalur NF- κ B juga meningkatkan ekspresi Caspase-3, yang mempercepat apoptosis sel β -pankreas.^{58,59} Sekretom dari SH-MSC mengandung berbagai faktor antiinflamasi dan regeneratif yang menekan aktivitas NF- κ B serta mendukung proliferasi sel β -pankreas, sehingga mengurangi apoptosis dan meningkatkan sekresi insulin.⁶⁰⁻⁶² Sementara itu, air alkali berperan sebagai antioksidan yang menurunkan produksi ROS, menghambat peradangan, dan meningkatkan efektivitas kerja insulin.^{3,42,44,55-57}

Pemberian SH-MSC dan kombinasi SH-MSC + air alkali menunjukkan efek protektif terhadap apoptosis sel pankreas dan resistensi insulin melalui penurunan ekspresi Caspase-3 dan HOMA-IR. Efek ini diduga berkaitan dengan penghambatan jalur NF- κ B, penurunan ekspresi TNF- α dan IL-6, serta peningkatan faktor pertumbuhan yang mendukung

regenerasi sel β -pankreas.^{49-54,60-62} Kombinasi SH-MSC dan air alkali memberikan efek yang lebih optimal dibandingkan SH-MSC saja dalam menurunkan resistensi insulin, menandakan potensi terapi regeneratif yang lebih efektif dalam menangani DMT2. Mekanisme kerja SH-MSC dalam memperbaiki resistensi insulin dan apoptosis pankreas dapat dijelaskan melalui interaksi berbagai faktor bioaktif yang terkandung dalam sekretom. Faktor-faktor ini mencakup protein antiinflamasi, molekul imunomodulator, serta faktor pertumbuhan yang merangsang regenerasi jaringan pankreas. Salah satu mekanisme utama dari SH-MSC adalah kemampuannya dalam menurunkan ekspresi NF- κ B, yang merupakan regulator utama dalam jalur inflamasi. NF- κ B mengontrol ekspresi berbagai sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α dan IL-6, yang berkontribusi terhadap resistensi insulin dan apoptosis sel β -pankreas. Dengan menekan aktivasi NF- κ B, SH-MSC dapat mengurangi dampak inflamasi kronis yang menjadi dasar patofisiologi DMT2.

Selain itu, air alkali juga berkontribusi terhadap peningkatan sensitivitas insulin melalui mekanisme reduksi stres oksidatif dan inflamasi. Stres oksidatif yang berlebihan pada DMT2 disebabkan oleh peningkatan produksi ROS, yang dapat mengaktifkan jalur inflamasi NF- κ B dan menyebabkan kerusakan sel β -pankreas.^{49-54,60-62} Air alkali diketahui memiliki efek antioksidan yang mampu menurunkan ROS dan menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga berkontribusi terhadap peningkatan sensitivitas insulin. Kombinasi SH-MSC dan air alkali memberikan efek sinergis dalam

menekan peradangan dan meningkatkan regenerasi pankreas, yang tercermin dari penurunan ekspresi Caspase-3 dan HOMA-IR pada kelompok perlakuan. Penurunan ekspresi Caspase-3 menunjukkan bahwa kombinasi terapi ini mampu menghambat apoptosis sel β -pankreas, sementara penurunan HOMA-IR menandakan perbaikan sensitivitas insulin. Efek ini menunjukkan bahwa kombinasi SH-MSC dan air alkali dapat menjadi strategi terapeutik yang menjanjikan dalam penanganan DMT2, dengan pendekatan yang menargetkan mekanisme inflamasi dan regenerasi jaringan pankreas secara simultan.

Keterbatasan penelitian ini adalah penelitian baru sebatas dilakukan pada hewan uji, sehingga perlu adanya eksplorasi lebih lanjut pada manusia. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi peran SH-MSC ketika dikombinasikan dengan terapi standar pada pasien DMT2.



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi Caspase 3 dan Indeks HOMA-IR pada tikus jantan galur Wistar model DMT2 menunjukkan hal-hal berikut:

1. Terdapat pengaruh pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi Caspase 3 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Terdapat pengaruh pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap indeks HOMA-IR dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

1. Kajian ini baru sebatas dilakukan pada hewan uji, sehingga perlu adanya eksplorasi lebih lanjut pada manusia.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi peran SH-MSC ketika dikombinasikan dengan terapi standar pada pasien DMT2.
3. Studi yang akan datang diharapkan untuk mengkaji ekspresi dari protein inflamasi seperti TNF alpha, IL-6 dan Nf-kb yang merupakan factor kunci dalam inflamasi

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Zolfaghari N, Soheili ZS, Samiei S, Latifi-Navid H, Hafezi-Moghadam A, Ahmadi H *et al.* microRNA-96 targets the INS/AKT/GLUT4 signaling axis: Association with and effect on diabetic retinopathy. *Heliyon* 2023; **9**. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e15539.
- 2 Wainstein E, Maik-Rachline G, Blenis J, Seger R. AKTs do not translocate to the nucleus upon stimulation but AKT3 can constitutively signal from the nuclear envelope. *Cell Rep* 2022; **41**. doi:10.1016/j.celrep.2022.111733.
- 3 Wicaksono SA. NDH. & USB (2018). The effects of alkaline reduced water administration to the fasting blood glucose levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *M* 14, 1260-1266. The Effects of Alkaline Reduced Water Administration to the Fasting Blood Glucose Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *P J M H S* 2020; **14**: 1–6.
- 4 2019_jurnal_Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood sugar Levels of Diabetes Mellitus Patients. *Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood Sugar Levels of Diabetes Mellitus Patients*. 2019.
- 5 Kementerian kesehatan republik indonesia. Tetap Produktif, Cegah Dan Atasi Diabetes Mellitus. Pus. data dan Inf. kementerian Kesehat. RI. 2020.
- 6 Federation ID. IDF Diabetes Atlas Tenth edition 2021. Int. Diabetes Fed. 2021; : 176.
- 7 Baker C, Retzik-Stahr C, Singh V, Plomondon R, Anderson V, Rasouli N. Should metformin remain the first-line therapy for treatment of type 2 diabetes? *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2021; **12**. doi:10.1177/2042018820980225.
- 8 Defronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism*. 2016; **65**: 20–29.
- 9 Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. doi:10.3390/ijms21176275.

- 10 Teratani T, Kasahara N, Fujimoto Y, Sakuma Y, Miki A, Goto M *et al.* Mesenchymal Stem Cells Secretions Enhanced ATP Generation on Isolated Islets during Transplantation. *Islets* 2022; **14**: 69–81.
- 11 Abdolmohammadi K, Mahmoudi T, Nojehdehi S, Tayebi L, Hashemi SM, Noorbakhsh F *et al.* Effect of hypoxia preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Adv Pharm Bull* 2020; **10**: 297–306.
- 12 Cooper TT, Sherman SE, Bell GI, Dayarathna T, McRae DM, Ma J *et al.* Ultrafiltration and injection of islet regenerative stimuli secreted by pancreatic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* 2021; **30**: 247–264.
- 13 Cooper TT, Sherman SE, Bell GI, Ma J, Kuljanin M, Jose SE *et al.* Characterization of a Vimentin^{high}/Nestin^{high} proteome and tissue regenerative secretome generated by human pancreas-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2020; **38**: 666–682.
- 14 Ribot J, Caliperoumal G, Paquet J, Boisson-vidal C, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J Cell Mol Med* 2017. doi:10.1111/jcmm.12969.
- 15 Dias I *et al.* "Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. . CR in P and DD 2 (2021): 100069. Secretome effect of adipose tissue- derived stem cells cultured two- dimensionally and three- dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. *Curr Res Pharmacol Drug Discov* 2021; **2**: 1–10.
- 16 Yaoxiang Sun. Human Mesenchymal Stem Cell Derived SEKRETOMs Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β -Cell Destruction. *Jiangsu Key Lab Med Sci Lab Med* 2018; **12**: 1–13.
- 17 Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017; **24**: 1380–1389.
- 18 Green DR. Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2022; **14**. doi:10.1101/cshperspect.a041012.

- 19 Connolly P, Garcia-Carpio I, Villunger A. Cell-cycle cross talk with caspases and their substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020; **12**: 1–19.
- 20 Brown-Suedel AN, Bouchier-Hayes L. Caspase-2 Substrates: To Apoptosis, Cell Cycle Control, and Beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; **8**. doi:10.3389/fcell.2020.610022.
- 21 Hussar P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia* 2022; **2**: 1624–1636.
- 22 Jörns A, Wedekind D, Jähne J, Lenzen S. Pancreas pathology of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) in patients and in a LADA rat model compared with type 1 diabetes. *Diabetes* 2020; **69**: 624–633.
- 23 Aslan A, Can MI, Beyaz S, Gok O, Parlak G, Gundogdu R *et al.* A new approach on the regulation of NF- κ B and Bax protein signaling pathway activation by royal jelly in fluoride-induced pancreas damage in rats. *Tissue Cell* 2022; **79**. doi:10.1016/j.tice.2022.101913.
- 24 Shawky LM, Morsi AA, Bana E El, Hanafy SM. The biological impacts of sitagliptin on the pancreas of a rat model of type 2 diabetes mellitus: Drug interactions with metformin. *Biology (Basel)* 2020; **9**. doi:10.3390/biology9010006.
- 25 He W, Yuan T, Maedler K. Macrophage-associated pro-inflammatory state in human islets from obese individuals. *Nutr Diabetes* 2019. doi:10.1038/s41387-019-0103-z.
- 26 Alnek K, Kisand K, Heilman K, Peet A, Varik K, Uiho R. Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *PLoS One* 2015; **10**: 1–16.
- 27 Nababan P. *Hubungan Kadar TNF α dengan HOMA-IR pada Pasien DM Tipe 2 di Rumah Sakit Umum Pusat Haji Adam Malik Medan.* 2019.
- 28 Cabus U, Kabukcu C, Fenkci S, Caner V, Oztekin O, Fenkci V *et al.* Serum Caspase-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2020; **59**: 207–210.

- 29 Ozkan S, Isildar B, Ercin M, Gezginci-Oktayoglu S, Konukoglu D, Ne\cseto\uglu N *et al.* Therapeutic potential of conditioned medium obtained from deferoxamine preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells on diabetic nephropathy model. *Stem Cell Res \& Ther* 2022; **13**: 438.
- 30 Isildar B, Ozkan S, Sahin H, Ercin M, Gezginci-Oktayoglu S, Koyuturk M. Preconditioning of human umbilical cord mesenchymal stem cells with deferoxamine potentiates the capacity of the secretome released from the cells and promotes immunomodulation and beta cell regeneration in a rat model of type 1 diabetes. *Int Immunopharmacol* 2024; **129**. doi:10.1016/j.intimp.2024.111662.
- 31 Prayitno GD, Lestari K, Sartika CR, Djuwantono T, Widjaya A, Muharam R *et al.* Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment: A Systematic Review. *Medicines* 2022; **10**: 3.
- 32 Bartaula-brevik S, Bolstad AI, Mustafa K, Pedersen TO. Stem Cell Research & Therapy Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro ClinMed International Library. 2017. doi:10.23937/2469-570X/1410045.
- 33 Al-Azzawi B, McGuigan DH, Koivula FNM, Elttayef A, Dale TP, Yang Y *et al.* The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. *Open Stem Cell J* 2020; **6**: 1–12.
- 34 Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 4597 2019; **20**: 4597.
- 35 Zeinali F, Zarch SMA, Jahan-Mihan A, Kalantar SM, Mehrjardi MYV, Fallahzadeh H *et al.* Circulating microRNA-122, microRNA-126-3p and microRNA-146a are associated with inflammation in patients with pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus: A case control study. *PLoS One* 2021; **16**. doi:10.1371/journal.pone.0251697.

- 36 Gilyazova I, Asadullina D, Kagirowa E, Sikka R, Mustafin A, Ivanova E *et al.* MiRNA-146a—A Key Player in Immunity and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; **24**. doi:10.3390/ijms241612767.
- 37 Widyaningsih, W. ., Putra, A. ., Priyantini, S. ., Muhar, A. M. ., Sumarawati, T. ., Trisnadi, S. ., Amalina, N. D. ., Alif, I. ., Prasetyo, A. ., & Satria Irawan RC. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Trends Sci* , 7278 2024; **21**: 72–78.
- 38 Pouriran R, Piryaee A, Mostafavinia A, Zandpazandi S, Hendudari F, Amini A *et al.* The Effect of Combined Pulsed Wave Low-Level Laser Therapy and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium on Open Skin Wound Healing in Diabetic Rats. *Photomed Laser Surg* 2016; **34**: 345–354.
- 39 Oliveira AG, Araújo TG, Carvalho B de M, Rocha GZ, Santos A, Saad MJA. The role of Hepatocyte Growth Factor (HGF) in insulin resistance and diabetes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2018; **9**. doi:10.3389/fendo.2018.00503.
- 40 Martín-Estal I, Castorena-Torres F. Gestational Diabetes Mellitus and Energy-Dense Diet: What Is the Role of the Insulin/IGF Axis? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2022; **13**. doi:10.3389/fendo.2022.916042.
- 41 Walker AMN, Warmke N, Mercer B, Watt NT, Mughal R, Smith J *et al.* Endothelial insulin receptors promote vegf-a signaling via erk1/2 and sprouting angiogenesis. *Endocrinol (United States)* 2021; **162**. doi:10.1210/endocr/bqab104.
- 42 Lee M, Fadriqela A, Antonio JM, Kim CS, Cho IY, Kim KE *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults. *Processes* 2022; **10**. doi:10.3390/pr10081543.
- 43 Bajgai J, Kim CS, Rahman MH, Jeong ES, Jang HY, Kim KE *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Gastrointestinal Diseases. *Processes*. 2022; **10**. doi:10.3390/pr10010087.

- 44 Rias YA, Kurniawan AL, Chang CW, Gordon CJ, Tsai HT. Synergistic effects of regular walking and alkaline electrolyzed water on decreasing inflammation and oxidative stress, and increasing quality of life in individuals with type 2 diabetes: A community based randomized controlled trial. *Antioxidants* 2020; **9**: 1–17.
- 45 Liu L, Du X, Zhang Z, Zhou J. Trigonelline inhibits caspase 3 to protect β cells apoptosis in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2018; **836**: 115–121.
- 46 Marczyk, G. R., DeMatteo, D., & Festinger D. *Essentials of research design and methodology*. 2010.
- 47 Widayati RE. *PENGARUH EKSTRAK ALOE VERA TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI MMP-1 DAN RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III Studi Eksperimental pada Kulit Mencit Balb/c yang dipapar radiasi UVB*. 2017.
- 48 Irawan RCS, Putra A, Setyo T, Ghaisani SS, Hidayah N. Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells decrease tumor necrosis factor- α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes mellitus model rats. *Universa Med* 2023; **42**: 320–328.
- 49 Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10.
- 50 Fiori A, Hammes HP, Bieback K. Adipose-derived mesenchymal stromal cells reverse high glucose-induced reduction of angiogenesis in human retinal microvascular endothelial cells. *Cytotherapy* 2020; **22**: 261–275.
- 51 Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal stem cell secretome for dermatology application: A review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol*. 2021. doi:10.2147/CCID.S331044.
- 52 Chen YX, Deng ZH, Xue-Gao, Qiang-Du, Juan-Yin, Chen GH *et al*. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells exert a therapeutic effect on hypoxia-induced pulmonary hypertension by modulating the YAP1/SPP1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2023; **168**.

doi:10.1016/j.biopha.2023.115816.

- 53 Vishnubhatla I, Corteling R, Stevanato L, Hicks C, Sinden J. The Development of Stem Cell-Derived Exosomes as a Cell-Free Regenerative Medicine. *J Circ Biomarkers* 2014; **3**. doi:10.33393/JCB.2014.2043.
- 54 Ma H-C, Wang X, Wu M-N, Zhao X, Yuan X-W, Shi X-L. Interleukin-10 Contributes to Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells for Acute Liver Failure via Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway. *Chin Med J (Engl)* 2016; **129**: 967–975.
- 55 Fenton TR, Huang T. Systematic review of the association between dietary acid load, alkaline water and cancer. *BMJ Open* 2016; **6**. doi:10.1136/bmjopen-2015-010438.
- 56 Ramadhan A, Wicaksono SA, Nugroho TE, Utami SB. The Effects of Alkaline Ionized Water Administration to the Total Cholesterol Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Accompanied by Dyslipidemia. *Pakistan J Med Heal Sci* 2021; **15**: 1449–1455.
- 57 Ajeti V, Brsakoska S, Rendjova V, Angelovski M, Gjorgoski I. The Effect of Alkaline Water and Sodium Ascorbate on Glucose and Cortisol Levels during Acute Hyperthermic Stress in White Laboratory Rats. *Maced Vet Rev* 2021; **44**: 179–185.
- 58 Sun J, Singh P, Österlund J, Orho-Melander M, Melander O, Engström G *et al*. Hyperglycaemia-associated Caspase-3 predicts diabetes and coronary artery disease events. *J Intern Med* 2021; **290**: 855–865.
- 59 Fathi FEZM, Sadek KM, Khafaga AF, Al senosy AW, Ghoniem HA, Fayez S *et al*. Vitamin D regulates insulin and ameliorates apoptosis and oxidative stress in pancreatic tissues of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Environ Sci Pollut Res* 2022; **29**: 90219–90229.
- 60 Kawamoto K, Ohashi T, Konno M, Nishida N, Koseki J, Matsui H *et al*. Cell-free culture conditioned medium elicits pancreatic β cell lineage-specific epigenetic reprogramming in mice. *Oncol Lett* 2018; **16**: 3255–3259.
- 61 Nugroho WS, Kusindarta DL, Susetya H, Fitriana I, Mulyani GT, Fibrianto

- YH *et al.* The structural and functional recovery of pancreatic β -cells in type 1 diabetes mellitus induced mesenchymal stem cell-conditioned medium. *Vet World* 2016; **9**: 535–539.
- 62 Li L, Ngo HTT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J *et al.* Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. doi:10.3390/ijms21010049.

