

**PENGARUH SEKRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS
DAN AIR ALKALI TERHADAP EKSPRESI INSULIN RECEPTOR
SUBTRATE-1 (IRS-1) DAN EKSPRESI PROTEIN KINASE B (AKT)
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model
Diabetes Melitus Tipe 2)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh :

Myrna

MBK2322010413

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2025**

HALAMAN PENGESAHAN
TESIS

**PENGARUH SEKRETOM HIPOKSIA *MESENCHYMAL STEM CELLS* DAN AIR
ALKALI TERHADAP EKSPRESI *INSULIN RECEPTOR 1* (IRS-1) DAN EKSPRESI
PROTEIN KINASE B (AKT)
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Diabetes Melitus
Tipe 2)**

Disusun oleh :

Myrna

MBK2322010413

Yang dipertahankan di depan tim penguji pada 21 Februari 2025 dan dinyatakan telah
memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,



Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subhan,
Sp.DVE. Subsp.DKE.FINSDV.FAADV
NIK. 130530279

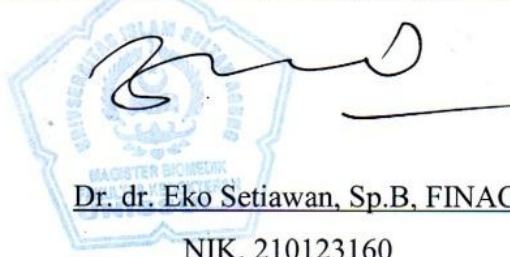
Pembimbing II,



Prof. Dr. dr. H. 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 di dalamnya 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, 13 Februari 2025



(Myrna)

ABSTRAK

Latar Belakang: Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) merupakan penyakit metabolik kompleks yang ditandai dengan resistensi insulin dan disfungsi sel β pankreas. *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS-1) dan AKT berperan penting dalam jalur sinyal insulin, yang terganggu pada kondisi DMT2. Sekretom Hipoksia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) dan air alkali memiliki potensi sebagai terapi alternatif dengan sifat antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan AKT pada tikus jantan galur Wistar model DMT2.

Metode: Studi eksperimental ini menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design* dengan 25 tikus yang dibagi dalam lima kelompok: Tikus kelompok kontrol sehat (K1), Tikus kontrol DMT2 yang diberikan injeksi intraperitoneal NaCl 0.9% (K2), Tikus kontrol DMT2 dengan pemberian metformin per oral sonde 45 mg/kgbb (K3), Tikus DMT2 dengan injeksi intraperitoneal SH-MSC dosis 500 μ L (K4), dan Tikus DMT2 dengan injeksi intraperitoneal SH-MSC 500 μ L dan air alkali per oral sonde 5 mL/hari (K5). Ekspresi IRS-1 dan AKT dianalisis menggunakan RT-PCR setelah 29 hari perlakuan.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian SH-MSC dan air alkali meningkatkan ekspresi IRS-1 dan AKT pada tikus model DM2. Kelompok K5, yang menerima kombinasi SH-MSC dan air alkali, mencatat ekspresi IRS-1 tertinggi ($7,57 \pm 1,23$), lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya. Uji ANOVA ($P < 0,05$) menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok, dengan uji Post Hoc LSD mengonfirmasi bahwa K5 berbeda signifikan dibanding seluruh kelompok lainnya ($P < 0,05$). Ekspresi AKT juga meningkat signifikan, dengan K5 mencapai nilai tertinggi ($12,66 \pm 3,87$). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan SH-MSC dan air alkali memiliki efek nyata terhadap ekspresi IRS-1 dan AKT, mendukung perannya dalam meningkatkan sensitivitas insulin..

Kesimpulan: Pemberian SH-MSC dan air alkali mampu meningkatkan ekspresi IRS-1 dan AKT, menunjukkan potensinya sebagai terapi tambahan dalam pengelolaan DMT2.

Kata kunci: Air alkali, AKT, Diabetes melitus tipe 2, IRS-1, Sekretom Hipoksia-Mesenchymal Stem Cells.

ABSTRACT

Background: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex metabolic disease characterized by insulin resistance and β -cell dysfunction. Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) and AKT play crucial roles in the insulin signaling pathway, which is impaired in T2DM. Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) and alkaline water have potential as alternative therapies due to their anti-inflammatory and antioxidant properties. This study aims to evaluate the effect of SH-MSCs and alkaline water on the expression of IRS-1 and AKT in male Wistar rats with T2DM.

Methods: This experimental study used a Randomised Post-Test Only Control Group Design, involving 25 rats divided into five groups: K1 (healthy rats control), K2 (T2DM control rats given NaCl 0.9% intraperitoneal injection), K3 (T2DM control rats given per oral sonde metformin 45 gr/bw), K4 (T2DM rats given SH-MSCs intraperitoneal injection 500 μ L), and K5 (T2DM rats given SH-MSCs intraperitoneal injections 500 μ L with alkaline water per oral sonde 5 mL/day). IRS-1 and AKT expression was analyzed using RT-PCR after 29 days of treatment.

Results: The study results demonstrated that the administration of SH-MSCs and alkaline water significantly increased the expression of IRS-1 and AKT in a T2DM rat model. The K5 group, which received a combination of SH-MSCs and alkaline water, exhibited the highest IRS-1 expression (7.57 ± 1.23) compared to other groups. ANOVA analysis ($P < 0.05$) confirmed significant differences among the groups, and Post Hoc LSD analysis showed that K5 was significantly different from all other groups ($P < 0.05$). Similarly, AKT expression significantly increased, with K5 reaching the highest value (12.66 ± 3.87). Statistical analyses confirmed that SH-MSC and alkaline water administration had a significant effect on IRS-1 and AKT expression, highlighting their potential role in enhancing insulin sensitivity.

Conclusion: The administration of SH-MSCs and alkaline water can enhance IRS-1 and AKT expression, indicating their potential as adjunct therapies for T2DM management.

Keywords: Alkaline water, AKT, IRS-1, 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 SEKRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS DAN AIR ALKALI TERHADAP EKSPRESI IRS-1 DAN EKSPRESI AKT (Studi Eksperimental in Vivo Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Diabetes Melitus Tipe 2).**

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 FK UNNISULA Semarang.
3. Dr. Dr. Eko Setiawan Sp.B., FINACS., selaku Kepala Prodi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung Semarang sekaligus Penguji I.
4. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subhan Sp.DVE. Subsp.DKE.FINSDV.FAADV, selaku dosen pembimbing I dalam penelitian, yang bersedia meluangkan

waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

5. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes dan Dr. dr. Chodijah, M.kes selaku penguji II dan III yang banyak memberikan masukan selama proses pembuatan tesis.
7. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
8. Orang tua tercinta, Bapak Ahmad Hadi Prawira yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa, sehingga saya dapat menyelesaikan proposal tesis ini.
9. 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, 13 Februari 2024

(Myrna)

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
PERNYATAAN.....	ii
ABSTRAK.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.5. Originalitas Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. <i>Insulin Reseptor Substrate-1</i>	8
2.2. AKT	13
2.3. Hubungan Antara IRS-1 dan AKT	18
2.4. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSC).....	19
2.5. Sekretom Hipoksia - <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (SH-MSC)	25
2.6. Air Alkali	31
2.7. Hubungan antara SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan AKT	31
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	35
3.1. Kerangka Teori.....	35
3.2. Kerangka konsep.....	38
3.3. Hipotesis.....	38
BAB IV METODE PENELITIAN	39
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	39
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	40

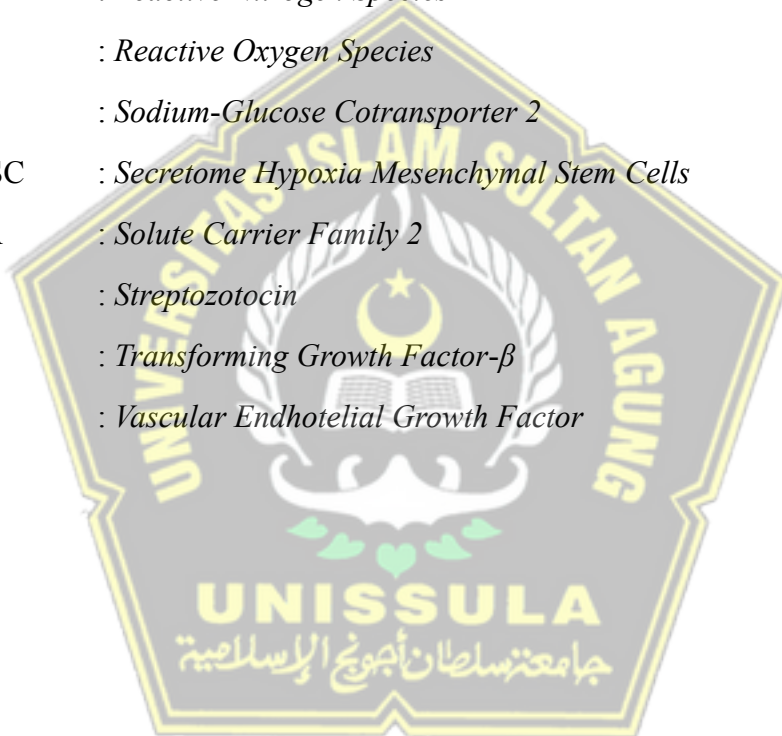
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	43
4.4.	Besar Sampel.....	45
4.5.	Alat dan Bahan.....	45
4.6.	Cara Penelitian	47
4.7.	Tempat dan Waktu Penelitian	58
4.8.	Analisa Data	58
4.9	Alur Penelitian	60
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		61
5.1.	Hasil Penelitian	61
5.2.	Pembahasan.....	69
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....		74
6.1.	Kesimpulan.....	74
6.2.	Saran.....	74
DAFTAR PUSTAKA.....		76
LAMPIRAN.....		87



DAFTAR SINGKATAN

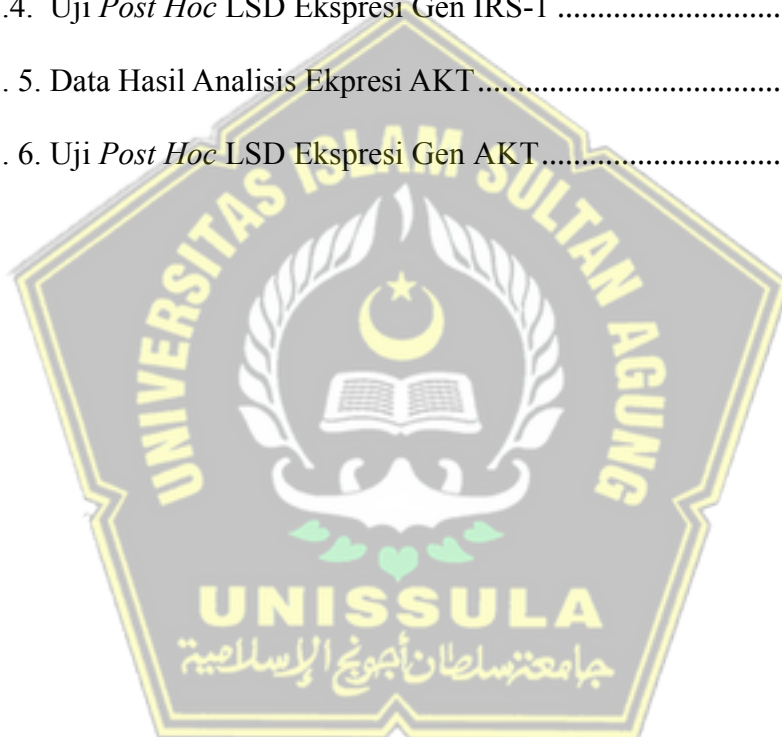
AKT	: <i>Protein Kinase B</i>
AS160	: <i>Akt Substrate of 160 kDa</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	: <i>Diabetes Mellitus Type 1</i>
DMT2	: <i>Diabetes Mellitus Type 2</i>
FOXO1	: <i>Forkhead Box O1 Transcription Factors</i>
FOXO1 α	: <i>Forkhead Box O1 Transcription Factor 1-α</i>
G6Pase	: <i>Glucose-6-Phosphatase</i>
GAP	: <i>GTPase-Activating Protein</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GLUT4	: <i>Glucose Transporter 4</i>
GPx	: <i>Gluthathione Peroxide</i>
GSK3	: <i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IDF	: <i>International Diabetes Federation</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IRS-1	: <i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MnSOD	: <i>Manganese Superoxide Dismutase</i>
mTOR	: <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC2	: <i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 2</i>
NF- $\kappa\beta$	: <i>Nuclear Factor-Kappa β</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>

OS	: <i>Oxidative Stress</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDSH	: <i>Phosphoinositide-Dependent Kinase-1</i>
PEPCK	: <i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>
PI3K/AKT	: <i>Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B</i>
PIK5	: <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP3	: <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SGLT2	: <i>Sodium-Glucose Cotransporter 2</i>
SH-MSC	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
SLC2A	: <i>Solute Carrier Family 2</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-β</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 4. 1. Reagen yang digunakan dalam flow cytometry	52
Tabel 5. 1. Profil Sitokin SH-MSC	64
Tabel 5. 2. Hasil Validasi Tikus DMT2	64
Tabel 5. 3. Data Hasil Analisis Ekspresi IRS-1	66
Tabel 5.4. Uji <i>Post Hoc</i> LSD Ekspresi Gen IRS-1	66
Tabel 5. 5. Data Hasil Analisis Ekspresi AKT	68
Tabel 5. 6. Uji <i>Post Hoc</i> LSD Ekspresi Gen AKT	68



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Peran IRS-1 pada transport glukosa ²⁹	9
Gambar 2. 2. Peran Protein Keluarga AKT dalam transport glukosa ¹	14
Gambar 2. 3. Jalur Regulasi Glukosa oleh IRS-1 dan AKT ⁴¹	19
Gambar 2. 4. Sumber dan Kemampuan Diferensiasi <i>Mesenchymal Stem Cells</i> ⁴⁹	25
Gambar 2. 5. <i>Secretome Mesenchymal Stem Cells</i> ⁵⁹	28
Gambar 2. 6. Metode Purifikasi Sekretom MSC Menggunakan TFF ¹	25
Gambar 2. 7. Peran SH-MSC pada DMT2 ⁶⁹	30
Gambar 3. 1 Kerangka Teori.....	37
Gambar 3. 2. Kerangka Konsep	38
Gambar 4. 1 Rancangan Penelitian	39
Gambar 4. 2 Alur Penelitian.....	58
Gambar 5. 1. Validasi Karakteristik MSC	62
Gambar 5. 2. Kemampuan MSC berdiferensiasi	63
Gambar 5. 3 Pola Peningkatan Ekspresi Gen IRS-1	67
Gambar 5. 4 Pola Peningkatan Ekspresi Gen AKT.....	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearence</i>	87
Lampiran 2.	Surat Keterangan Penelitian SCCR	88
Lampiran 3.	Analisis Normalitas dan Homogenitas ekspresi IRS dan AKT	91
Lampiran 4.	Analisis <i>Descriptives</i> ekspresi IRS dan AKT	92
Lampiran 5.	Analisis ANOVA ekspresi IRS dan AKT	93
Lampiran 6.	Analisis <i>post hoc</i> LSD ekspresi IRS dan AKT	94
Lampiran 7.	Dokumentasi Kegiatan Penelitian	95
Lampiran 8.	Dokumentasi kegiatan Validasi GDP dan HOMA-IR	97



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) adalah kondisi kadar gula darah tinggi disebabkan oleh gangguan produksi atau hilangnya sensitivitas insulin akibat dari kondisi inflamasi yang berlangsung secara kronis. Penelitian terkini melaporkan bahwa terdapat kerusakan jalur pensinyalan *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS-1) dan AKT pada DMT2.^{2,3} Protein IRS-1 dan AKT adalah komponen penting dalam jalur sinyal insulin. Pada DMT2, gangguan fosforilasi IRS-1 menghambat aktivasi AKT yang menyebabkan terhambatnya kadar *Glucose Transporter 4* (GLUT4) yang berujung pada resistensi insulin serta hiperglikemia. Mengembalikan fungsi IRS-1 dan AKT adalah kunci dalam terapi DMT2.^{4,5} Penelitian sebelumnya menemukan bahwa sekretom *mesenchymal stem cell* yang dikultur pada kondisi hipoksia (SH-MSC) memiliki peran regeneratif terhadap DMT2, dan penelitian terdahulu juga menemukan bahwa air alkali juga dapat menurunkan kadar gula pada DMT2.^{6,7} Namun, belum ada penelitian yang mengkaji peran SH-MSC dan air alkali terhadap Ekspresi IRS-1 dan AKT, sehingga perlu dilakukan penelitian tambahan.^{7,8}

Prevalensi dan insidensi penyakit yang terus meningkat menjadikan DMT2 menjadi masalah kesehatan dunia, baik di negara maju maupun negara berkembang termasuk Indonesia. Berbagai penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa angka insidensi dan prevalensi diabetes melitus (DM) sedang meningkat di seluruh dunia. Menurut data *International Diabetes*

Federation (IDF) tahun 2021, prevalensi penderita DM di seluruh dunia sebanyak 536,6 juta, atau 10,5% dari populasi, dan diperkirakan akan meningkat sebesar 783,2 juta, atau 12,2% dari jumlah penduduk dunia pada tahun 2045.^{9,10}

Terapi untuk DMT2 mencakup berbagai kelas obat dengan mekanisme kerja dan kekurangannya masing-masing. Metformin salah satu obat yang umum digunakan untuk DMT2 dengan cara mengurangi produksi glukosa di hati dan meningkatkan sensitivitas insulin.¹¹ Namun demikian, penggunaan metformin bisa menyebabkan efek samping gastrointestinal seperti diare dan mual serta tidak cocok untuk pasien dengan gangguan ginjal. Sulfonilurea merangsang pankreas untuk memproduksi lebih banyak insulin, namun berisiko menyebabkan hipoglikemia dan penambahan berat badan.¹² Inhibitor SGLT2 meningkatkan ekskresi glukosa melalui urin, namun dapat menimbulkan efek samping seperti infeksi saluran kemih dan genital serta dehidrasi.¹³ Meskipun obat-obatan ini penting untuk mengelola DMT2, mereka memiliki keterbatasan dan risiko yang memerlukan pemantauan dan penyesuaian individu.¹⁴

Sekretom dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) mengandung sitokin anti inflamasi seperti IL-10 dan *growth factor* seperti TGF- β , HGF, dan VEGF, mendukung perbaikan jaringan dan regenerasi sel beta pankreas.¹⁵⁻¹⁸ Sekretom MSC khususnya yang dibuat dalam kondisi hipoksia memodulasi jalur sinyal seperti insulin/IGF, PI3K/AKT, dan NF- κ B, yang terlibat dalam regulasi glukosa, kelangsungan hidup sel, dan respon inflamasi, sehingga

berpotensi mengurangi resistensi insulin, memperbaiki fungsi sel beta, dan menurunkan peradangan dalam terapi DMT2.^{19,20}

Peningkatan pH cairan interstisial melalui konsumsi air alkali dapat memperbaiki resistensi insulin.^{6,7} Selain itu, air alkali juga terbukti memiliki kandungan antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas.^{6,7}

IRS-1 dan AKT menjadi faktor yang sangat penting dalam progresivitas DMT2 dan menjadi target dalam terapi DMT. Namun demikian, belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan AKT pada DMT2.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian SH-MSC dan Air Alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DMT2 ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian SH-MSC dan Air Alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DMT2.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan Ekspresi IRS-1 pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DMT2 yang diberikan SH-MSC 500 μ L dan Air Alkali 5 mL/hari dibandingkan dengan kontrol.

- b. Penelitian ini bertujuan membuktikan perbedaan Ekspresi AKT pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DMT2 yang diberikan SH-MSC 500 μ L dan Air Alkali 5 mL/hari dibandingkan dengan kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat didapat dari penelitian ini adalah adanya hasil ilmiah peran SH-MSC dan Air Alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT pada Tikus Jantan Galur Wistar yang mengalami DMT2.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan bermanfaat bagi masyarakat mengenai kegunaan SH-MSC dan Air Alkali pada kasus DMT2. Bagi praktisi kesehatan, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan SH-MSC dan Air Alkali sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan bagi individu yang mengalami DMT2.

1.5. Originalitas Penelitian

Berdasarkan *review* literatur mengenai penggunaan SH-MSC dan Air Alkali sebagai agen antiinflamasi maupun regenerasi, beberapa studi terkait telah diidentifikasi dan akan ditampilkan dalam Tabel 1:

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Ribot et al., 2017 ²¹	<i>Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition angiogenic Properties</i>	<i>In vivo</i>	Penurunan inflamasi dan perbaikan fungsi pankreas
2	Deng et al., 2018 ²²	<i>Infusion of adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits skeletal muscle Mitsugumin 53 elevation and thereby alleviates insulin resistance in type 2 diabetic rats</i>	<i>In vivo</i>	Pemberian <i>Mesenchymal stem cell</i> meningkatkan IRS-1 dengan menekan <i>Mitsugumin 53</i>
3	Sun et al., 2018 ²³	<i>Human Mesenchymal Stem Cell Derived Secretomes 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
4	Widyaningsih et al., 2024	<i>Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus Rats</i>		<i>Secretome Hypoxia</i> MSC menurunkan IL-6 dan HOMA IR pada tikus DMT2
5	Dwi Agustanti & Purbianto, 2019 ⁷	<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
6	Wicaksono et al., 2020 ⁸	<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
7	Dias et al.,	<i>Secretome effect of adipose</i>	<i>In vivo</i>	Penurunan kadar

2021 ²⁴	<i>tissue- derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes</i>	IL-6 dan IL-2, IL-4 menurun. induksi Kadar PDX-1 pankreas dan mampu mengurangi hiperglikemia
--------------------	--	--

Diabetes melitus tipe 2 merupakan penyakit metabolik kompleks yang melibatkan resistensi insulin dan disfungsi sel β pankreas. Pendekatan berbasis MSC telah menunjukkan potensi melalui efek parakrin sekretom yang mengandung faktor bioaktif. Penelitian sebelumnya telah mengeksplorasi sekretom MSC maupun air alkali secara terpisah, tetapi kombinasi keduanya belum banyak diteliti.

Studi seperti *Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties* menunjukkan perubahan komposisi sekretom MSC akibat diabetes, sementara *Human Mesenchymal Stem Cell Derived Secretomes Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus* menyoroti potensinya dalam mengatasi resistensi insulin dan melindungi sel β . Namun, penelitian-penelitian ini belum mengeksplorasi kombinasi sekretom MSC dengan intervensi lain seperti air alkali.

Air alkali sendiri, sebagaimana ditunjukkan dalam penelitian *Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood Sugar Levels*, memiliki efek positif dalam menurunkan kadar gula darah pada pasien DMT2. Kombinasi ini memiliki potensi sinergis, dengan sekretom MSC yang memperbaiki kerusakan seluler dan air alkali yang mendukung pengaturan homeostasis glukosa.

Penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya karena mengevaluasi efek kombinasi sekretom MSC dosis 500 μ L dan air alkali 5mL/hari pada tikus jantan galur Wistar model DMT2. Pendekatan ini mengisi celah penelitian, memadukan teknologi biologi molekuler dan nutrisi, serta berpotensi memberikan terapi yang lebih efektif untuk mengatasi DMT2 yang dikaji dari ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Insulin Reseptor Substrate-1*

2.1.1 Definisi

Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) adalah salah satu protein yang berperan penting dalam jalur sinyal insulin, yang menghubungkan reseptor insulin dengan berbagai jalur *downstream* yang mempengaruhi metabolisme glukosa, sintesis lipid, dan pertumbuhan sel. Protein ini berfungsi sebagai adaptor dalam transduksi sinyal, di mana ia berinteraksi dengan domain *phosphotyrosine* dari reseptor insulin setelah aktivasi oleh insulin. IRS-1 juga merupakan target utama dari fosforilasi oleh *Insulin Receptor Tyrosine Kinase*.^{25,26}

2.1.2 Struktur

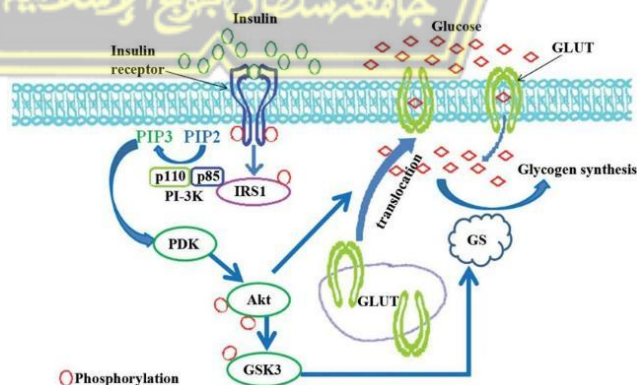
IRS-1 termasuk dalam keluarga protein IRS yang terdiri dari beberapa anggota, seperti IRS-1, IRS-2, IRS-3, dan IRS-4. Keluarga protein ini memainkan peran yang serupa dalam sinyal insulin, tetapi memiliki distribusi jaringan dan spesifisitas fungsional yang berbeda-beda. Sebagai contoh, IRS-2 lebih banyak berperan dalam sinyal insulin di otak dan hati, sementara IRS-1 banyak ditemukan di otot rangka dan jaringan adiposa.²⁷⁻²⁹

Ukuran molekul IRS-1 berkisar antara 160-185 kDa tergantung pada modifikasi pascatranslasi seperti fosforilasi. Gen IRS-1, yang

mengkode IRS-1, terletak di kromosom 2 (2q36), dan ekspresinya diatur oleh berbagai faktor seperti insulin, hormon pertumbuhan, serta faktor nutrisi. IRS-1 menjadi penting dalam konteks resistensi insulin, di mana perubahan dalam fosforilasi IRS-1 dapat mempengaruhi respons insulin dan berkontribusi terhadap diabetes tipe 2.²⁷⁻²⁹

2.1.3 Jalur Aktivasi dan Peran IRS-1 pada DMT2

Pada diabetes melitus tipe 2 (DMT2), jalur aktivasi dan peran IRS-1 sangat penting dalam memahami gangguan metabolisme glukosa. IRS-1 adalah protein yang memicu translokasi pengangkut glukosa yang terutama ditemukan dalam jaringan otot rangka dan adiposa, yang pergerakannya ke membran plasma diatur oleh insulin (gambar 2.1). Ketika insulin dilepaskan oleh pankreas setelah makan, ia berikatan dengan reseptor insulin (IR) pada membran sel otot dan adiposa, menyebabkan autofosforilasi tirosin pada reseptor insulin dan mengaktifkan aktivitas tirosin kinase dari reseptor tersebut.^{25,30}



Gambar 2. 1. Peran IRS-1 pada transport glukosa

Reseptor insulin yang terfosforilasi kemudian memfosforilasi protein IRS (terutama IRS-1 dan IRS-2), yang bertindak sebagai adaptor untuk memulai sinyal *downstream*.³¹ IRS yang terfosforilasi merekrut dan mengaktifkan PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*), yang mengubah PIP2 menjadi PIP3.³¹ PIP3 kemudian merekrut PDK (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) dan AKT (juga dikenal sebagai protein kinase B) ke membran plasma, di mana PDK mengaktifkan AKT melalui fosforilasi.³¹

AKT terfosforilasi kemudian mengaktifkan mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) dan memfosforilasi AS160 (AKT *substrate of 160 kDa*). Fosforilasi AS160 menyebabkan inaktivasi GAP (*GTPase-activating protein*) yang menghambat translokasi GLUT4.²⁰ Dengan inaktivasi GAP oleh AS160, vesikel yang mengandung GLUT4 dapat bergerak dan menyatu dengan membran plasma, memungkinkan pengambilan glukosa dari darah ke dalam sel.²⁰

Pada DMT2, terdapat resistensi insulin yang menyebabkan gangguan pada jalur sinyal insulin yang dijelaskan di atas. Akibatnya, translokasi IRS-1 ke membran plasma berkurang, mengakibatkan penurunan pengambilan glukosa oleh sel otot dan adiposa.^{32,33} Beberapa faktor yang berkontribusi terhadap resistensi insulin meliputi penurunan atau gangguan fosforilasi IRS, yang mengurangi aktivasi PI3K dan *downstream signaling*; penurunan aktivitas PI3K

dan AKT, yang menghambat fosforilasi AS160 dan translokasi GLUT4; serta peradangan kronis dan stres oksidatif, di mana sitokin pro-inflamasi dan stres oksidatif dapat mengganggu sinyal insulin.^{32,33} Disfungsi jalur sinyal insulin dan translokasi IRS-1 pada DMT2 menyebabkan hiperglikemia, yang merupakan karakteristik utama dari penyakit tersebut.^{32,33}

2.1.4. Ekspresi IRS-1 pada Pankreas

Protein IRS-1 adalah adaptor utama dalam transduksi sinyal insulin, yang menghubungkan reseptor insulin dengan jalur *downstream*, seperti fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) dan protein kinase B (AKT).³⁴ Kondisi normal, insulin yang terikat pada reseptornya menginduksi fosforilasi IRS-1 pada residu tirosin, yang mengaktifkan jalur PI3K/AKT.³⁴ Aktivasi ini penting untuk sejumlah fungsi sel beta, termasuk sekresi insulin yang distimulasi glukosa, translokasi GLUT4 untuk transportasi glukosa, aktivasi glukokinase (GCK) untuk metabolisme glukosa, dan regulasi faktor transkripsi seperti PDX-1, yang mendukung ekspresi insulin.^{35,36}

Ketika fungsi IRS-1 terganggu, baik akibat fosforilasi yang tidak normal pada residu serin maupun oleh penurunan ekspresinya, jalur sinyal insulin menjadi terganggu. Fosforilasi residu serin pada IRS-1 sering kali dipicu oleh stres oksidatif, inflamasi, atau paparan toksin, termasuk logam berat. Perubahan ini bersifat inhibitor, menghambat kemampuan IRS-1 untuk merekrut dan mengaktifkan

PI3K, yang pada gilirannya mengurangi fosforilasi AKT. Jalur PI3K/AKT yang terganggu menyebabkan penurunan translokasi GLUT4 ke membran sel beta, penurunan ekspresi GCK, dan gangguan aktivitas PDX-1, sehingga melemahkan kemampuan sel beta untuk mendeteksi dan merespons glukosa secara efektif. Akibatnya, terjadi penurunan sekresi insulin dan peningkatan risiko hiperglikemia kronis.³⁴⁻³⁶

Lebih jauh lagi, gangguan fungsi IRS-1 juga berdampak pada kelangsungan hidup sel beta. Jalur PI3K/AKT tidak hanya berperan dalam metabolisme glukosa, tetapi juga melindungi sel beta dari apoptosis melalui regulasi berbagai protein anti-apoptosis. Ketika jalur ini terganggu, sel beta menjadi lebih rentan terhadap stres oksidatif dan inflamasi yang sering diakibatkan oleh paparan logam berat. Hal ini memperburuk disfungsi pankreas dan berkontribusi pada perkembangan penyakit seperti diabetes tipe 2.³⁴⁻³⁶

Penelitian menunjukkan bahwa perbaikan fungsi IRS-1 dapat menjadi strategi terapeutik yang menjanjikan. Aktivasi ulang jalur IRS-1/PI3K/AKT dengan molekul seperti *Extendin-4*, agonis jalur tersebut, telah terbukti memulihkan sekresi insulin dan memperbaiki fungsi sel beta dalam model disfungsi pankreas. Selain itu, penghambatan jalur inflamasi, seperti inflammasom NLRP3, juga dapat melindungi IRS-1 dari fosforilasi inhibitor pada residu serin,

memperkuat sinyal insulin, dan meningkatkan kelangsungan hidup sel beta.³⁴⁻³⁶

IRS-1 memegang peran kunci dalam fungsi normal sel beta pankreas melalui regulasi jalur sinyal insulin. Gangguan fungsi IRS-1, baik akibat inflamasi, stres oksidatif, atau paparan logam berat, dapat menyebabkan disfungsi sel beta yang parah, mengurangi sekresi insulin, dan meningkatkan risiko diabetes. Pemahaman lebih lanjut tentang mekanisme ini dapat membuka jalan untuk terapi yang lebih efektif dalam mengatasi gangguan metabolisme.

2.2. AKT

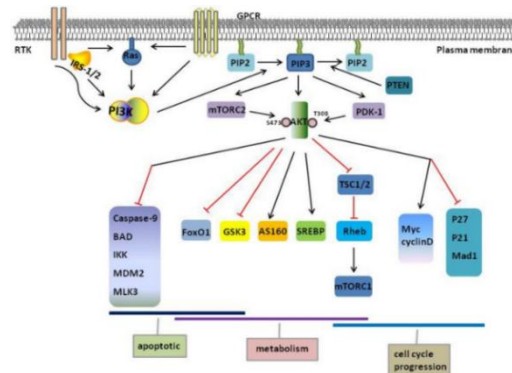
2.2.1 Definisi

Gen AKT adalah salah satu dari tiga isoform yang ada dalam famili *serine/threonine kinase*. AKT juga dikenal sebagai *protein kinase B* (PKB).² Gen AKT memainkan peran penting dalam berbagai jalur sinyal seluler, terutama dalam regulasi pertumbuhan sel, proliferasi, metabolisme, dan kelangsungan hidup.² Pada DM Tipe 2, AKT memiliki peran yang signifikan. DM Tipe 2 adalah kondisi metabolik yang ditandai dengan resistensi insulin dan gangguan pada fungsi sel beta pankreas, yang menyebabkan hiperglikemia kronis.² Gen AKT berkontribusi pada pengaturan metabolisme glukosa, terutama melalui mekanisme yang terkait dengan proliferasi sel dan resistensi terhadap stres oksidatif dalam jaringan tertentu seperti otak dan organ lain yang

memiliki ketergantungan tinggi pada energi seperti yang terlihat pada gambar 2.2.²

2.2.2 Struktur dan Aktivitas AKT

Struktur protein AKT mirip dengan *isoform* AKT lainnya, yang terdiri dari tiga domain utama yaitu domain *Pleckstrin Homology (PH)*, domain *kinase*, dan domain *C-terminal regulatory*.^{2,37-41} Domain PH memungkinkan AKT berinteraksi dengan fosfoinositida (seperti PIP3) yang terikat pada membran plasma, yang merupakan langkah penting dalam aktivasi AKT.^{2,37-41} Setelah sampai membran, AKT diaktifkan melalui fosforilasi pada residu *threonine* dan *serine* oleh *phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)* dan mTORC2. Aktivasi ini mengatur berbagai jalur sinyal *downstream* yang terkait dengan proliferasi sel, pertumbuhan, dan metabolisme energi.^{2,37-41} Jalur sinyal AKT sangat terlibat dalam pengaturan *glukogen sintase kinase-3 (GSK3)*, sintesis protein melalui mTOR, serta pengaturan glukosa dan metabolisme lipid.^{2,37-41} Pada DM Tipe 2, disfungsi dalam jalur ini, termasuk aktivitas AKT, dapat berkontribusi pada perkembangan resistensi insulin dan kegagalan kompensasi seluler terhadap hiperglikemia.^{2,37-41}



Gambar 2. 2. Peran Protein Keluarga AKT dalam transport glukosa

2.2.3 Peran AKT dalam Regulasi Metabolisme pada Diabetes Melitus

Tipe 2

Gen AKT memiliki peran penting dalam berbagai proses seluler, termasuk regulasi metabolisme glukosa, yang sangat erat kaitannya dengan DM Tipe 2.^{2,37-41} DM Tipe 2 ditandai oleh resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin, yang mengakibatkan hiperglikemia kronis. Meskipun AKT lebih dikenal sebagai regulator utama homeostasis glukosa, AKT juga memainkan peran yang signifikan, terutama dalam jaringan tertentu seperti otak dan otot, yang sangat bergantung pada metabolisme energi.^{2,37-41} Aktivasi AKT melalui fosforilasi oleh PDK dan mTORC2 pada membran plasma memicu serangkaian jalur sinyal *downstream* yang berkontribusi terhadap pemeliharaan homeostasis glukosa.^{2,37-41} AKT berfungsi dalam modulasi berbagai efek insulin, termasuk pengambilan glukosa oleh sel dan sintesis glikogen, meskipun secara spesifik kontribusi AKT lebih terlihat dalam pengaturan metabolisme di jaringan non-klasik seperti sistem saraf pusat.^{2,37-41} Dalam kondisi DM Tipe 2,

dimana resistensi insulin menghambat aktivasi jalur sinyal ini, fungsi AKT dapat terganggu, mengakibatkan penurunan efektivitas insulin dalam mengendalikan kadar glukosa darah.^{2,37-41}

Selain perannya dalam regulasi metabolisme, AKT juga berperan dalam respons seluler terhadap stres oksidatif, yang seringkali meningkat pada DM2 akibat hiperglikemia kronis.^{2,37-41} Gen AKT berkontribusi pada mekanisme seluler yang melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif, sebuah proses yang penting untuk mencegah komplikasi jangka panjang dari DM Tipe 2, seperti neuropati diabetik dan gangguan kardiovaskular.^{2,37-41} Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa AKT dapat memediasi mekanisme adaptif terhadap lingkungan hiperglikemik melalui peningkatan toleransi terhadap stres oksidatif dan inflamasi. Dengan demikian, AKT dapat menjadi target potensial untuk intervensi terapeutik yang bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas insulin dan melindungi jaringan dari efek merusak hiperglikemia. Pendekatan farmakologis yang memodulasi aktivitas AKT, baik melalui agonis selektif maupun strategi terapi gen, dapat memberikan manfaat dalam mengurangi resistensi insulin dan mencegah komplikasi jangka panjang DM2.^{2,37-41}

2.2.4. Ekspresi AKT pada Pankreas

Akt memainkan peran penting dalam fungsi pankreas, terutama dalam mendukung kelangsungan hidup dan fungsi sel beta pankreas

yang bertanggung jawab untuk sekresi insulin. Berdasarkan literatur, paparan arsenik lingkungan dapat memicu disfungsi pankreas melalui aktivasi inflammasom NLRP3, yang berdampak langsung pada jalur sinyal IRS-1/PI3K/AKT. Aktivasi inflammasom NLRP3 oleh arsenik menghasilkan perubahan patologis pada sel beta, termasuk peningkatan fosforilasi IRS-1 pada Ser616, yang merupakan tanda penghambatan sinyal insulin. Hal ini menyebabkan penurunan ekspresi PI3K dan fosforilasi AKT pada Ser473, yang pada akhirnya mengganggu fungsi downstream jalur sinyal ini.³⁴⁻³⁶

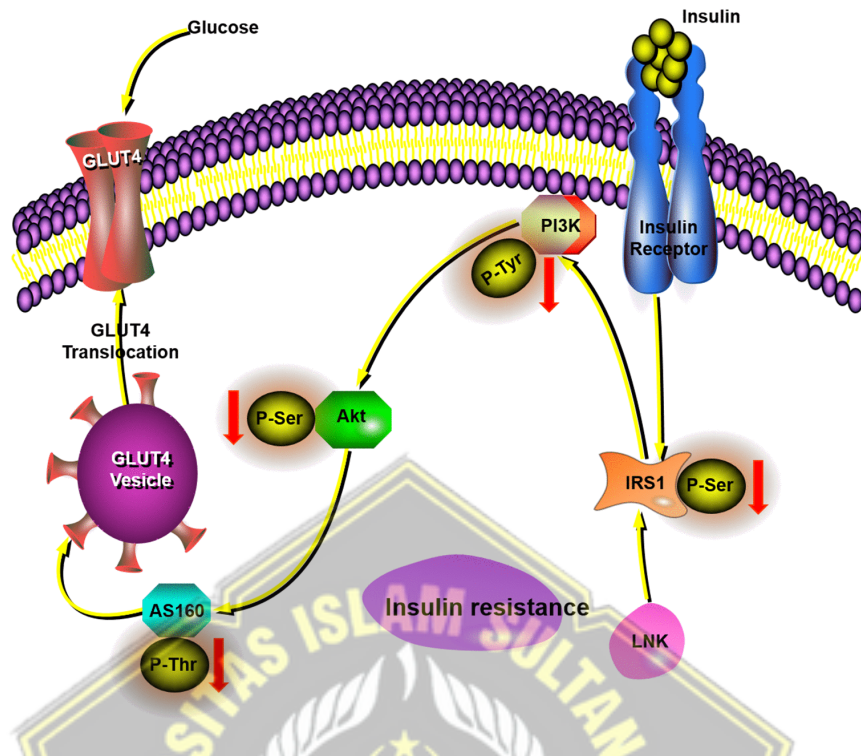
AKT berperan sebagai regulator utama beberapa proses metabolik dalam sel beta pankreas. Penurunan fosforilasi AKT yang disebabkan oleh arsenik menghambat transkripsi nuklir PDX-1, protein penting untuk fungsi dan kelangsungan hidup sel beta. Selain itu, jalur IRS-1/PI3K/AKT yang terganggu mengakibatkan penurunan translokasi GLUT4 ke membran plasma dan ekspresi glukokinase (GCK), yang secara kolektif menurunkan kemampuan sel beta untuk merespons glukosa dan menghasilkan insulin.³⁴⁻³⁶

Penelitian menunjukkan bahwa paparan arsenik juga menurunkan sekresi insulin yang distimulasi oleh glukosa secara *in vitro*, menegaskan efek destruktif pada jalur IRS-1/PI3K/AKT. Namun, penggunaan inhibitor inflammasom NLRP3 (MCC950) dan agonis jalur IRS-1/PI3K/AKT terbukti dapat membalikkan efek tersebut, menunjukkan potensi terapeutik untuk melindungi sel beta

dari kerusakan yang diinduksi arsenik.³⁴⁻³⁶ Hal ini menjelaskan bahwa AKT dalam pankreas sangat vital dalam mempertahankan fungsi normal sel beta. Disfungsi jalur AKT akibat paparan arsenik tidak hanya memperburuk metabolisme glukosa, tetapi juga meningkatkan risiko diabetes melalui gangguan pada sekresi insulin.

2.3. Hubungan Antara IRS-1 dan AKT

Dalam sinyal insulin, IRS-1 dan AKT berperan penting dalam regulasi metabolisme glukosa. Ketika insulin mengikat reseptornya, IRS-1 diaktifkan melalui fosforilasi, yang kemudian mengaktifkan PI3K.^{2,37-41} PI3K ini mengaktifkan AKT, melalui fosforilasi. AKT yang teraktivasi berperan dalam translokasi GLUT4 ke membran sel, yang meningkatkan pengambilan glukosa ke dalam sel. Dengan demikian, IRS-1 mempengaruhi aktivasi AKT secara tidak langsung melalui jalur PI3K seperti yang terlihat dalam gambar 2.3.^{2,37-42}



Gambar 2. 3. Jalur Regulasi Glukosa oleh IRS-1 dan AKT

2.4. *Mesenchymal Stem Cells* (MSC)

2.4.1. Definisi *Stem Cell*

Stem cell, atau sel punca, adalah sel-sel unik dalam tubuh yang memiliki kemampuan untuk memperbarui diri (*self-renewal*) dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel khusus yang fungsional. *Stem cell* dapat diklasifikasikan berdasarkan potensinya, yaitu kemampuan mereka untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel dalam tubuh. Berikut adalah jenis-jenis *stem cell* berdasarkan potensinya:^{43,44}

1. Totipoten (*Totipotent Stem Cells*)

Totipoten adalah *stem cell* dengan potensi tertinggi, mampu berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh dan jaringan

ekstraembrionik seperti plasenta. Contohnya adalah zigot (sel telur yang telah dibuahi) dan sel-sel awal embrio hingga tahap blastomer (beberapa pembelahan awal). Sel ini dapat membentuk organisme utuh.

2. Pluripoten (*Pluripotent Stem Cells*)

Stem cell pluripoten memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi hampir semua jenis sel dalam tubuh, kecuali jaringan ekstraembrionik. Contohnya adalah *embryonic stem cells* (ESCs) yang berasal dari massa sel dalam (*inner cell mass*) blastokista. *Stem cell* ini digunakan dalam penelitian untuk terapi regeneratif karena fleksibilitasnya.

3. Multipoten (*Multipotent Stem Cells*)

Stem cell multipoten mampu berdiferensiasi menjadi sel-sel dalam satu jenis atau kelompok jaringan tertentu. Misalnya, *hematopoietic stem cells* (HSCs) yang ditemukan di sumsum tulang dapat membentuk berbagai jenis sel darah (eritrosit, leukosit, trombosit). Contoh lainnya adalah *mesenchymal stem cells* (MSCs), yang dapat berdiferensiasi menjadi sel tulang, lemak, dan tulang rawan.

4. Oligopoten (*Oligopotent Stem Cells*)

Stem cell oligopoten memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dalam satu jaringan tertentu. Contohnya

adalah sel progenitor limfoid yang hanya dapat membentuk sel-sel dalam sistem kekebalan tubuh seperti limfosit T dan B.

5. Unipoten (*Unipotent Stem Cells*)

Unipoten adalah stem cell dengan potensi terbatas, hanya dapat berdiferensiasi menjadi satu jenis sel tertentu. Misalnya, sel otot satelit yang hanya dapat membentuk sel otot baru.

2.4.2. Karakteristik *Stem Cell* menurut ISCT

Menurut *International Society for Cell Therapy (ISCT)*, mesenchymal stem cells (MSCs) memiliki tiga karakteristik utama yang harus dipenuhi untuk dapat diklasifikasikan sebagai MSC. Kriteria ini pertama kali diusulkan pada tahun 2006 dan menjadi standar internasional. Berikut adalah karakteristik tersebut:⁴⁵

1. Kemampuan Adherensi pada Permukaan Plastik

- MSC harus dapat menempel pada permukaan plastik ketika dibiakkan dalam kondisi kultur yang sesuai. Hal ini mencerminkan sifat MSC sebagai sel yang berasal dari jaringan mesenkim.
- Kultur MSC biasanya dilakukan dalam medium tertentu yang mendukung pertumbuhan sel ini, seperti medium yang diperkaya dengan serum.

2. Ekspresi Penanda Permukaan Tertentu

- MSC harus menunjukkan profil ekspresi penanda permukaan spesifik, yang ditentukan melalui analisis imunofenotip. Kriteria ini mencakup:

- **Positif** untuk penanda:
 - **CD73**: Enzim *ecto-5'-nucleotidase*.
 - **CD90**: *Thy-1 glycoprotein*.
 - **CD105**: Endoglin, reseptor untuk *transforming growth factor*-beta (TGF- β).
- **Negatif** untuk penanda hematopoietik dan endotelial berikut:
 - **CD34**, **CD45** (penanda sel darah putih).
 - **CD14** atau **CD11b** (monosit/makrofag).
 - **CD79a** atau **CD19** (limfosit B).
 - **HLA-DR** (antigen kelas II MHC, kecuali dalam kondisi stimulasi).

3. Potensi Diferensiasi Multipoten

- MSC harus mampu berdiferensiasi menjadi tiga jenis sel utama jaringan mesenkim ketika diberi rangsangan tertentu dalam kultur:
 - **Adiposit (sel lemak)**: Dengan indikator akumulasi lipid, seperti pewarnaan *Oil Red O*.

- **Osteoblas (sel tulang):** Dengan pembentukan mineral kalsium, ditunjukkan oleh pewarnaan *Alizarin Red* atau *von Kossa*.
- **Kondroblas (sel tulang rawan):** Dengan produksi matriks proteoglikan, ditunjukkan oleh pewarnaan *Alcian Blue* atau *Safranin O*.

2.4.2. Definisi *Mesenchymal stem cells* (MSC)

Mesenchymal stem cells adalah sel punca multipoten yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, termasuk sel tulang, tulang rawan, dan lemak.^{43,44} MSC sering digunakan dalam terapi regeneratif karena kemampuan mereka untuk memperbaiki dan menggantikan jaringan yang rusak.^{43,44} MSC dapat diperoleh dari berbagai sumber jaringan, seperti sumsum tulang, jaringan lemak, tali pusat, pulpa gigi, plasenta, dan cairan amnion, yang masing-masing memiliki kelebihan dan potensi untuk aplikasi klinis.^{43,44}

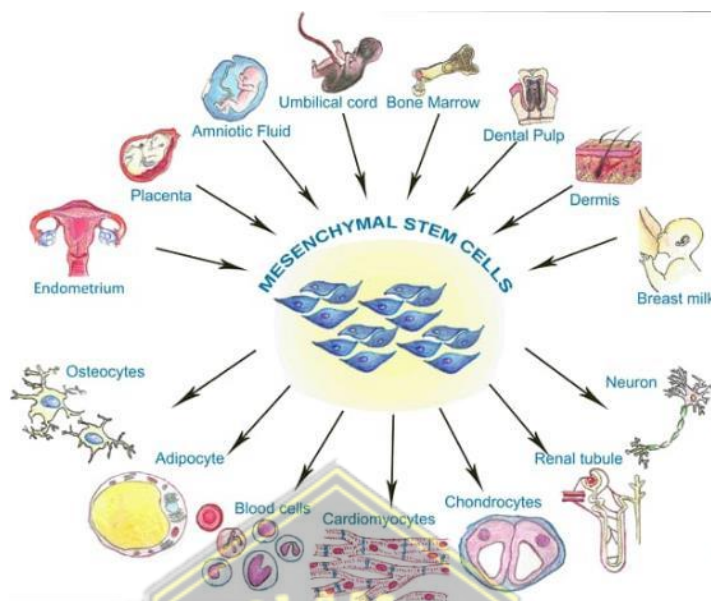
2.4.2. Sumber dan Karakteristik *Mesenchymal Stem Cell*

Mesenchymal stem cell adalah sel punca multipoten yang berasal dari jaringan mesenkimal seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat. MSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti osteoblas, kondrosit, dan adiposit serta kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit.^{43,44}

Selain kemampuan diferensiasi dan *self renewal* ini, MSC memiliki karakteristik mensekresikan sekretom, yaitu kumpulan molekul bioaktif yang terdiri dari protein, sitokin, faktor pertumbuhan, lipid, dan vesikel ekstraseluler. *Secretome* ini memainkan peran penting dalam berbagai proses biologis, termasuk regenerasi jaringan, imunomodulasi, anti-inflamasi, dan perlindungan sel dari apoptosis.^{43,44}

Molekul-molekul yang terkandung dalam *secretome* MSC bekerja melalui mekanisme parakrin untuk memediasi komunikasi sel-sel di sekitarnya. Proses ini memungkinkan MSC untuk mendukung perbaikan jaringan tanpa harus berintegrasi langsung dengan jaringan yang rusak. Keunggulan ini menjadikan *secretome* MSC sebagai alternatif yang menjanjikan dalam terapi regeneratif dan perawatan berbagai kondisi inflamasi.⁴⁶⁻⁴⁸

Metode untuk mendapatkan sekretom MSC dengan kandungan yang lebih tinggi dapat dilakukan dengan cara dikultur dalam kondisi hipoksia, yang meniru lingkungan alami mereka di dalam tubuh. Kondisi hipoksia ini merangsang MSC untuk menghasilkan dan melepaskan berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, dan vesikel ekstraseluler yang penting untuk fungsi regeneratif dan imunomodulasi mereka. Medium terkondisi, yang mengandung sekretom ini, kemudian dikumpulkan untuk digunakan dalam berbagai aplikasi terapeutik.^{49,50}



Gambar 2. 4. Sumber dan Kemampuan Diferensiasi *Mesenchymal Stem Cells*

2.5. Sekretom Hipoksia - *Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSC)

2.5.1. Definisi

Sekretom Hipoksia-*Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSC) merupakan sekumpulan molekul bioaktif yang disekresikan oleh *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) yang telah mengalami kondisi hipoksia, atau kekurangan oksigen.^{48,51-53} Ketika MSC dihadapkan pada lingkungan hipoksia, MSC merespons dengan mengubah profil sekresi mereka, menghasilkan sekretom yang lebih tinggi akan *growth factor*, sitokin, kemokin, serta vesikel ekstraseluler seperti *exosomes*. Kondisi hipoksia ini sering kali meniru situasi patologis di dalam tubuh, di mana jaringan mengalami kekurangan oksigen akibat sirkulasi yang buruk atau penyakit kronis, seperti pada DM2. Sekretom yang dihasilkan oleh MSC dalam kondisi hipoksia ini memiliki potensi terapeutik yang signifikan, terutama dalam

regenerasi jaringan, modulasi respon inflamasi, dan perbaikan lingkungan mikro seluler yang rusak.^{48,51-53}

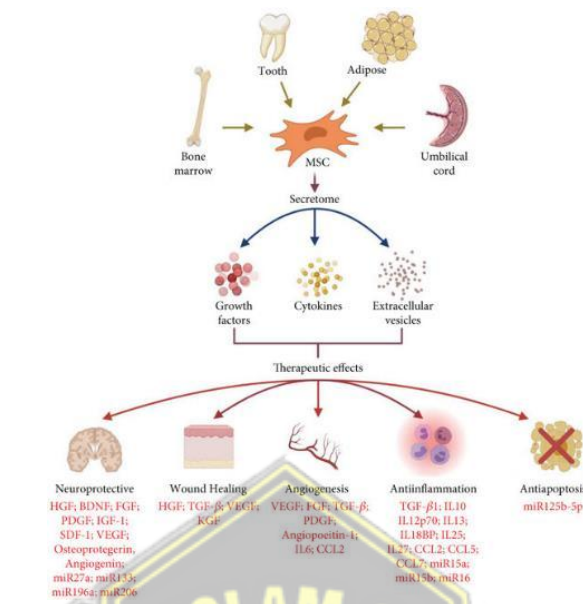
2.5.2. Kandungan Sekretom Hipoksia - *Mesenchymal Stem Cells*

Sekretom hipoksia-*mesenchymal stem cells* adalah cairan yang mengandung molekul bioaktif yang disekresikan oleh MSC selama proses kultur. Sekretom ini telah terbukti memiliki kandungan protein dan miRNA yang berperan penting dalam efek imunomodulator dan anti-inflamasi. Kandungan ini membuat sekretom MSC relevan dalam pengelolaan berbagai kondisi inflamasi.

Sekretom MSC mengandung berbagai protein yang secara langsung atau tidak langsung mengurangi inflamasi. Salah satunya adalah sitokin anti-inflamasi seperti TGF- β , yang dapat menghambat aktivasi sel T efektor dan mendukung perkembangan sel T regulator (Treg) untuk menekan inflamasi.^{54,54-59} Protein lain seperti IL-10 memainkan peran penting dalam menghambat produksi sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α dan IL-6.^{54,54-59} Selain itu, *hepatocyte growth factor* (HGF) yang terkandung dalam sekretom berkontribusi pada perbaikan jaringan dan memiliki efek imunomodulasi. Enzim seperti *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) juga berperan dengan menghambat proliferasi sel T dan menghasilkan metabolit imunomodulator.^{54,54-59} Prostaglandin E2 (PGE2), molekul lain dalam *secretome* MSCs, dapat mengubah makrofag proinflamasi (M1)

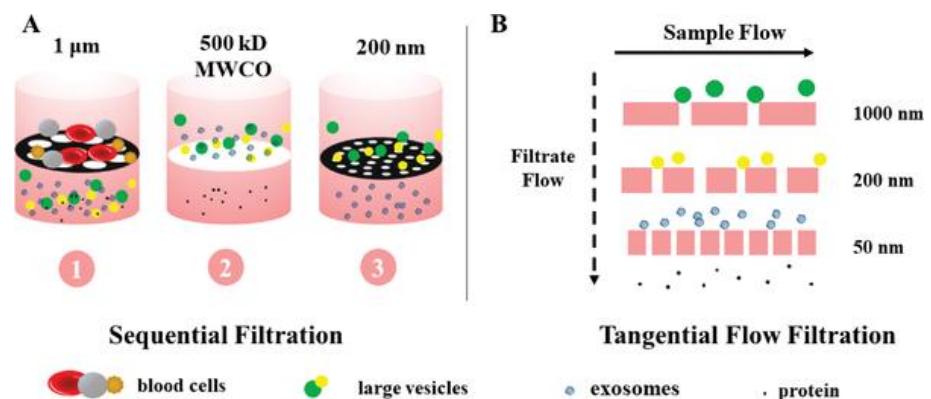
menjadi makrofag anti-inflamasi (M2), mendukung proses resolusi inflamasi.^{54,54-59}

Selain protein, sekretom MSCs juga kaya akan mikroRNA (miRNA), molekul kecil non-koding RNA yang memainkan peran penting dalam regulasi gen terkait inflamasi. miRNA seperti miR-21 dapat menekan jalur NF- κ B yang menjadi pemicu respon inflamasi dan mengurangi ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β dan TNF- α .^{54,54-59} miRNA lain, seperti miR-146a, menargetkan molekul dalam jalur inflamasi seperti TRAF6 dan IRAK1 untuk menekan produksi sitokin inflamasi dan mengatur makrofag agar beralih ke fenotip anti-inflamasi.^{54,54-59} miR-126 juga ditemukan dalam sekretom MSCs dan berperan dalam pemulihan inflamasi dengan mengatur jalur VEGF dan PI3K/AKT yang mendukung angiogenesis. miRNA seperti miR-155 dan miR-223 membantu mengatur aktivitas makrofag dan sel imun lainnya dengan menekan faktor yang memperburuk inflamasi.^{54,54-60}



Gambar 2. 5. Sekretom *Mesenchymal Stem Cell*

Konsentrasi sekretom ini biasanya didapatkan melalui metode pemisahan molekul seperti ultrafiltrasi atau sentrifugasi untuk meningkatkan kemurnian dan potensi terapeutiknya. Dengan kemampuan untuk meningkatkan proses penyembuhan, sekretom MSC diinduksi hipoksia menjadi fokus penelitian yang berkembang dalam bidang kedokteran regeneratif.^{61–63}



Gambar 2. 6. Metode Purifikasi Sekretom MSC Menggunakan TFF

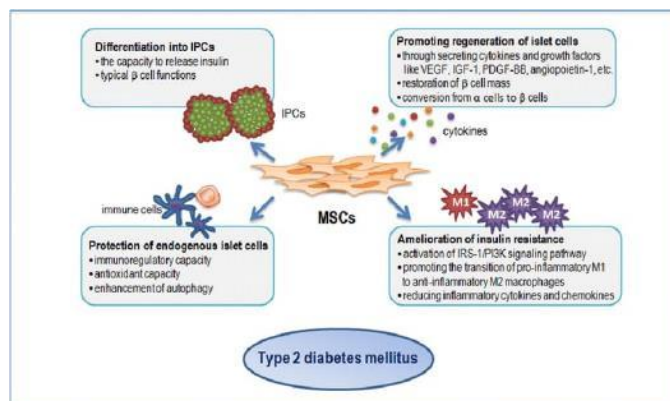
2.5.3. Peran SH-MSC pada DMT2

Pada DM Tipe 2, kondisi patologis yang ditandai oleh resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas, mengarah pada hiperglikemia kronis dan berbagai komplikasi terkait, termasuk neuropati, nefropati, dan kardiomiopati diabetikum. SH-MSC memiliki potensi untuk memperbaiki kerusakan yang diinduksi oleh hiperglikemia melalui mekanisme multifaset. Molekul bioaktif yang terkandung dalam sekretom, seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β), dan *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), dapat merangsang angiogenesis, mengurangi inflamasi, dan meningkatkan regenerasi seluler.^{48,51-53} *Exosomes* yang dilepaskan dalam sekretom juga mengandung mRNA dan protein yang dapat memodulasi kadar gen terkait resistensi insulin dan apoptosis sel beta pankreas. Selain itu, faktor-faktor yang terdapat dalam SH-MSC mampu meningkatkan sensitivitas insulin pada jaringan target seperti otot dan hati dengan mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan transduksi sinyal insulin.^{48,51-53} Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa SH-MSC dapat merangsang jalur sinyal AKT melalui sekresi faktor-faktor pertumbuhan yang meningkatkan sensitivitas insulin serta meningkatkan metabolisme glukosa dalam sel target.^{48,51-53,64-66} Aktivasi AKT oleh SH-MSC juga berkontribusi pada perbaikan fungsi sel beta pankreas yang terganggu dalam DM tipe 2, dengan mekanisme yang melibatkan peningkatan ketahanan sel terhadap stres

oksidatif dan perbaikan apoptosis sel. Dengan memodulasi jalur AKT, SH-MSC tidak hanya berperan dalam memperbaiki kerusakan seluler tetapi juga dalam mengatur homeostasis glukosa secara lebih efektif.

64–66

Selain berperan pada resistensi insulin dan fungsi sel beta, SH-MSC juga memainkan peran penting dalam memodulasi sistem imun dan perbaikan jaringan yang rusak akibat DM Tipe 2. Inflamasi kronis adalah komponen utama dalam perkembangan komplikasi DM Tipe 2, seperti nefropati diabetik, dimana sistem imun memainkan peran dalam kerusakan ginjal.⁶⁷ SH-MSC dapat menekan respon inflamasi dengan menurunkan aktivitas makrofag proinflamasi (M1) dan meningkatkan aktivitas makrofag antiinflamasi (M2), serta mengurangi sekresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6.⁶⁸ Selain itu, faktor-faktor dalam sekretom, seperti TGF- β dan IL-10, mendukung resolusi inflamasi dan perbaikan jaringan melalui stimulasi proliferasi dan diferensiasi sel progenitor lokal.^{64–66} Dalam konteks komplikasi kardiovaskular pada DM Tipe 2, SH-MSC dapat meningkatkan reparasi jaringan melalui mekanisme parakrin yang memperbaiki fungsi vaskular dan mencegah *remodelling* patologis pada miokardium.^{64–66,69}



Gambar 2. 7. Peran SH-MSC pada DMT2

2.6. Air Alkali

2.6.1. Definisi

Air alkali adalah air yang diproses untuk meningkatkan pH-nya melalui penambahan mineral basa seperti kalsium (Ca), magnesium (Mg), atau natrium (Na), atau melalui metode elektrolisis.⁷⁰ Peningkatan pH ini dipercaya dapat memengaruhi keseimbangan asam-basa dalam tubuh, yang berpotensi memiliki dampak positif pada kesehatan metabolik.⁷¹

2.6.2. Peran Air Alkali dalam Sindrom Metabolik

Peran air alkali dalam sindrom metabolik salah satunya disebabkan oleh kemampuan dalam menurunkan radikal bebas.⁷¹ Air alkali terbentuk melalui reaksi reduksi air ($[2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-]$), menghasilkan air dengan pH alkali, ion hidroksida (OH^-) yang meningkat, dan potensi reduksi oksidasi (ORP) negatif akibat adanya gas hidrogen terlarut (H_2). Air ini memiliki pH berkisar antara sedikit alkali hingga 11,5, ORP antara -300 mV hingga lebih

dari -800 mV, dan kadar H_2 terlarut hingga 1,6 mg/L. Ion hidroksida (OH^-) diketahui dapat menetralkan ROS.⁷²

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa air alkali yang diperkaya dengan hidrogen memiliki efek antioksidan yang signifikan, membantu menetralkan ROS dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Studi ini mendukung peran air alkali dalam menetralkan ROS melalui donasi elektron.⁷³ Selain itu Air alkali yang memiliki potensi oksidasi-reduksi (ORP) negatif dapat berperan sebagai agen reduksi yang baik. Ketika air alkali dikonsumsi, senyawa dengan ORP negatif dapat membantu menetralkan radikal bebas dengan mengubah ROS menjadi molekul air, yang aman bagi tubuh.⁷⁴ Penelitian lain juga menunjukkan bahwa air yang diperkaya dengan hidrogen, termasuk air alkali, dapat meningkatkan aktivitas antioksidan tubuh, seperti glutathione, dan mengurangi kerusakan akibat stres oksidatif. Temuan ini menegaskan bahwa konsumsi air alkali membantu memperbaiki mekanisme pertahanan antioksidan alami tubuh.⁷⁵

2.6.3. Peran Air Alkali dalam DMT2

Dalam DMT2, di mana resistensi insulin dan gangguan metabolik adalah ciri khas utama, air alkali dapat membantu mengurangi stres oksidatif dan peradangan sistemik, dua faktor kunci yang berkontribusi pada perkembangan dan progresi DM tipe 2. Dengan meningkatkan pH tubuh, air alkali dapat membantu mengurangi beban asam yang sering dikaitkan dengan disfungsi

metabolik, serta meningkatkan kapasitas tubuh untuk mengatasi stres oksidatif yang terkait dengan resistensi insulin.^{7,8}

Peran air alkali terhadap DM2 juga ditunjukkan oleh penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa konsumsi air alkali dapat berpotensi memperbaiki profil glukosa darah dan sensitivitas insulin pada individu dengan kondisi metabolik yang terganggu. Salah satu mekanisme yang diajukan adalah bahwa air alkali dapat mengurangi akumulasi asam dalam darah dan jaringan tubuh, yang sering kali berkontribusi pada inflamasi kronis dan gangguan metabolik.^{76,77} Pengurangan kadar asam dalam tubuh dapat membantu meningkatkan fungsi insulin dan memodulasi jalur sinyal yang terlibat dalam metabolisme glukosa. Penelitian juga menunjukkan bahwa kondisi homeostasis pH dapat mempengaruhi kadar hormon dan enzim yang terlibat dalam regulasi glukosa, seperti meningkatkan aktivitas enzim glukosa-6-fosfatase dan mengurangi aktivitas glukoneogenesis.⁷⁸ Selain itu, beberapa studi mengindikasikan bahwa air alkali dapat meningkatkan fungsi endotel vaskular dan mengurangi resistensi insulin, dua faktor yang penting dalam pengelolaan DM tipe 2.

2.7. Hubungan antara SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan AKT

Kombinasi SH-MSC dan air alkali memiliki potensi signifikan dalam meningkatkan ekspresi IRS-1 dan AKT yang merupakan komponen kunci

dalam jalur sinyal insulin yang berperan dalam pengaturan metabolisme glukosa dan lipid.^{79,80} Aktivasi IRS-1 memicu fosforilasi AKT, yang mengatur proses seperti penyerapan glukosa, sintesis glikogen, dan inhibisi glukoneogenesis. Pada kondisi resistensi insulin pada DMT2, ekspresi dan fungsi IRS-1 serta AKT sering terganggu, menyebabkan hiperglikemia dan gangguan metabolisme.^{81,82}

Secretome MSC mengandung berbagai faktor bioaktif, termasuk sitokin antiinflamasi, *growth factors*, dan vesikel ekstraseluler, yang dapat menekan inflamasi kronis dan stres oksidatif, dua faktor utama yang menyebabkan disfungsi IRS-1 dan AKT.^{24,83} *Secretome* MSC juga mampu memodulasi jalur fosforilasi serin pada IRS-1, sehingga meningkatkan sensitivitas insulin. Sementara itu, air alkali, yang memiliki sifat antioksidan karena kandungan ion hidroksilnya (OH⁻), membantu mengurangi stres oksidatif dan memperbaiki lingkungan mikro seluler, sehingga mendukung aktivasi IRS-1 dan AKT.^{72,84}

Kombinasi SH-MSC dan air alkali diperkirakan bekerja sinergis dalam menekan resistensi insulin. SH-MSC menargetkan perbaikan inflamasi dan kerusakan molekuler, sementara air alkali mengoptimalkan lingkungan redoks. Secara bersama-sama, keduanya dapat meningkatkan ekspresi IRS-1 dan AKT, memperbaiki jalur sinyal insulin, dan membantu mengontrol metabolisme glukosa, menjadikannya strategi potensial untuk mengatasi komplikasi DMT2.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

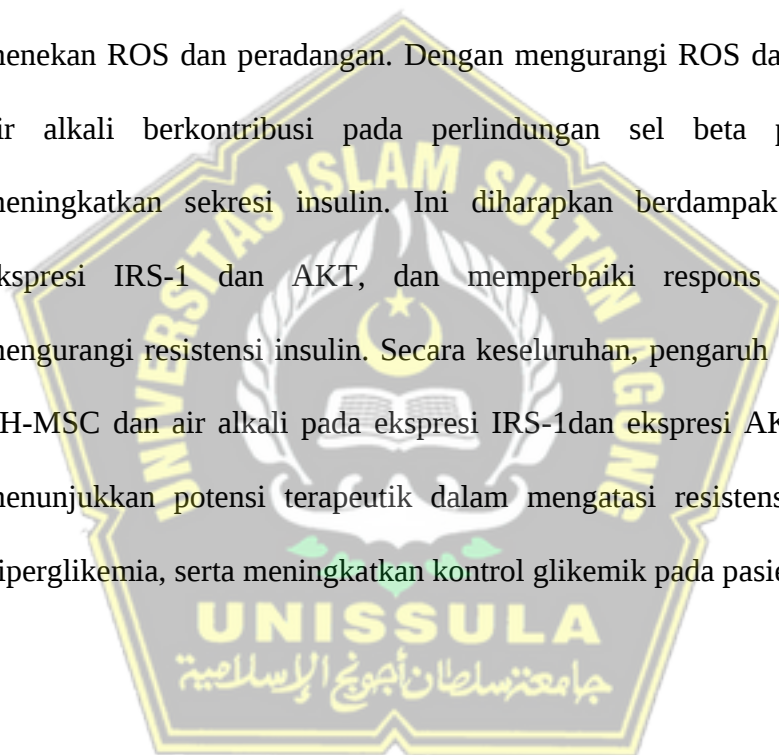
Injeksi Streptozotocin menginduksi terbentuknya ion nitrit (NO⁻), salah satu jenis dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bersifat oksidatif. Hal ini memicu stres oksidatif dengan meningkatkan produksi, yang memicu jalur IKK/NF- κ B dan JNK/AP-1.⁸⁵ Selain itu STZ juga memicu kerusakan DNA *pancreas* yang menyebabkan apoptosis sel beta *pancreas* dan berujung pada terbentuknya DAMP. Molekul DAMP kemudian ditangkap oleh sel imun dan mengaktifkan produksi protein pro inflamasi melalui aktivasi Nf- κ B.

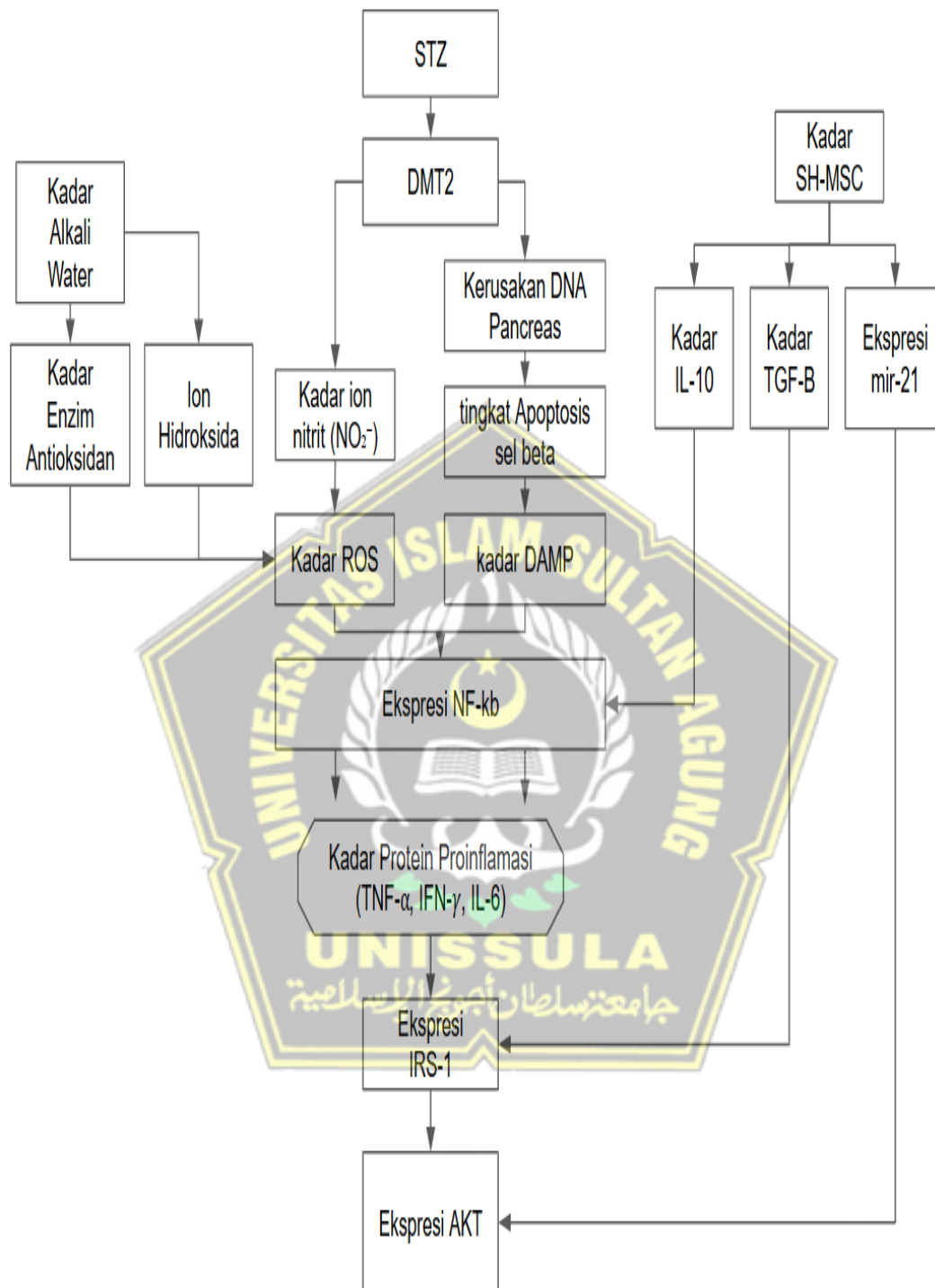
Aktivasi jalur ini menghasilkan pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α , dan IFN- γ , yang menyebabkan peradangan dan kerusakan pada sel beta pankreas di pulau Langerhans. Kerusakan ini menghambat sekresi insulin dan berkontribusi pada resistensi insulin dengan menghambat fosforilasi IRS-1 dan berujung pada tidak teraktifasinya AKT.

Sekretom MSC yang dipreparasi dalam kondisi hipoksia menunjukkan kemampuan lebih baik dalam mengatasi stress oksidatif, mengandung lebih banyak IL-10, TGF-beta, dan miR-21 meningkatkan sensitivitas insulin dengan mengaktifasi jalur IRS-1 dan AKT. IL-10 mengurangi peradangan dan meningkatkan aktivitas IRS-1, TGF-beta memodulasi ekspresi IRS-1

serta mengaktifkan jalur PI3K/AKT, sementara miR-21 menghambat PTEN, meningkatkan aktivasi AKT, dan memperbaiki sensitivitas insulin.⁸⁶

Air alkali yang dikenal kaya ion hidroksida yang memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi, juga berperan dalam menurunkan ROS dan menghambat pelepasan sitokin proinflamasi.⁷¹ Selain itu air alkali mampu meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan yang berperan dalam menekan ROS dan peradangan. Dengan mengurangi ROS dan peradangan, air alkali berkontribusi pada perlindungan sel beta pankreas dan meningkatkan sekresi insulin. Ini diharapkan berdampak positif pada ekspresi IRS-1 dan AKT, dan memperbaiki respons insulin serta mengurangi resistensi insulin. Secara keseluruhan, pengaruh gabungan dari SH-MSC dan air alkali pada ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT seharusnya menunjukkan potensi terapeutik dalam mengatasi resistensi insulin dan hiperglikemia, serta meningkatkan kontrol glikemik pada pasien diabetes.





Gambar 3. 1 Kerangka Teori

3.2. Kerangka konsep



Gambar 3. 2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat peningkatan ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT pasca pemberian SH-MSC dan Air Alkali pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DMT2 dibandingkan kontrol.



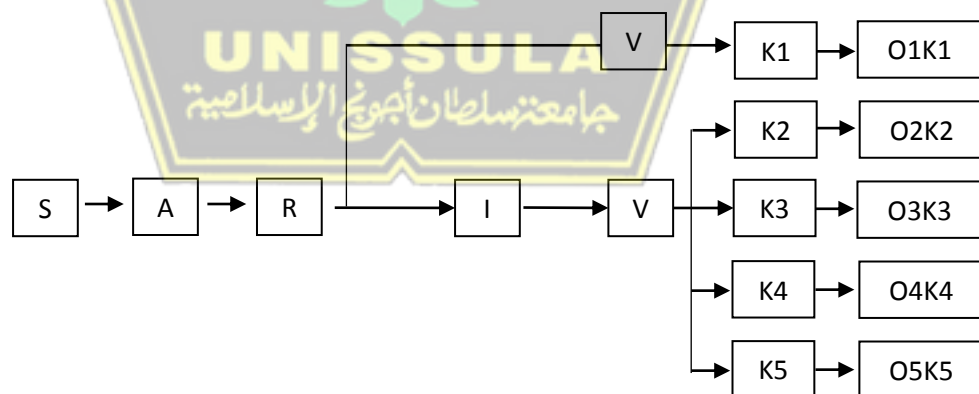
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* yang menggunakan rancangan penelitian *Randomised Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol negatif), 1 kelompok perlakuan yang mendapat terapi standar (kontrol positif) dan 1 kelompok tikus sehat sebagai *base line* data. Pengukuran data dilakukan setelah intervensi.^{87,88}

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut:



Gambar 4. 1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

S = Sampel

A = Aklimatisasi

R = Randomisasi

I = Induksi DMT2

V = Validasi gula darah dan HOMA-IR

K1 = Tikus sehat tidak diberi perlakuan

K2 = Tikus DMT2 diberi injeksi intraperitoneal NaCl 0,9% 500 μ L

K3 = Tikus DMT2 diberi metformin per oral sonde 45mg/kgbb

K4 = Tikus DMT2 diberi injeksi intraperitoneal SH-MSC 500 μ L

K5 = Tikus DMT2 diberi injeksi intraperitoneal SH-MSC 500 μ L dengan air alkali oral 5 mL/ hari

O1K1 = Observasi ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT K1

O2K2 = Observasi ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT K2

O3K3 = Observasi ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT K3

O4K4 = Observasi ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT K4

O5K5 = Observasi ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT 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 Antara

Variabel antara dalam penelitian ini adalah Ekspresi IRS-1

c. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Ekspresi AKT

d. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah DMT2

e. 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. Sekretom Hipoksia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC)

Kumpulan molekul bioaktif dari *stromal vascular fraction-derived mesenchymal*, produksi SCCR Semarang, yang dikondisikan pada keadaan 5% Oksigen selama 24 jam, suhu 37 °C dan disaring dengan metode TFF filter 10-500kDa. Validasi dengan ELISA KIT untuk kadar IL-6, TNF α , IL-10, TGF β , VEGF, FGF dan PDGF. Diberikan secara injeksi intraperitoneal pada hari ke 8, 15, dan 22 dengan dosis 500 μ L menggunakan spuit 1cc, needle 27G.

- Satuan : uL
- Skala : rasio

b. Air Alkali

Air alkali dengan pH 8+ diperoleh dari PT. SCCR Indonesia melalui teknologi nanopartikel dan diberikan secara oral

menggunakan metode sonde sebanyak 5 mL/hari, dibagi dalam 2x pemberian masing-masing 2,5 mL.⁶ Diberikan selama 28 hari (hari ke-1 sampai hari ke-29).

- Satuan : mL
- Skala : rasio

c. Ekspresi IRS-1

Ekspresi IRS-1 merujuk pada tingkat atau jumlah protein IRS-1 yang dihasilkan dalam sel. Ekspresi IRS-1 diukur dari jaringan pankreas pada hari ke-30 menggunakan teknik RT-PCR dengan primer gen berupa Primer *Rat IRS-1 Forward* 5'-CTG CAT AAT CGG GCA AAG GC-3, *Reverse* 5'-CAT CGC TAG GAG AAC CGG AC-3'. Hasil Ekspresi IRS-1 akan dianalisis dan dibandingkan antar kelompok untuk menilai dampak terapi terhadap peningkatan sensitivitas insulin dan kontrol glikemik.

- Satuan : *fold change*
- Skala : rasio

d. Ekspresi AKT

Ekspresi AKT merujuk pada tingkat atau jumlah protein AKT yang dihasilkan dalam sel. Ekspresi AKT diukur dari jaringan pankreas pada hari ke-30 menggunakan teknik RT-PCR dengan primer gen berupa Primer *Rat AKT Forward* 5'-CCTCAAGAATGATGGCACCT-3' *Reverse* 5'-TTTGAGTCCATCAGCCACAG-3'. Hasil Ekspresi AKT akan

dianalisis dan dibandingkan antar kelompok untuk menilai dampak terapi terhadap peningkatan sensitivitas insulin dan kontrol glikemik.

- Satuan : *fold change*
- Skala : rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1 Subyek penelitian

Penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya dengan menggunakan tikus jantan galur Wistar umur 6 sampai 8 minggu, berat 200 - 250 gram didapatkan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia, Semarang. Tikus dipelihara dalam kandang plastik yang berukuran 37 x 40 x 18 cm dengan kondisi temperatur ruangan 23-25°C, kelembaban 40-70% dan siklus gelap terang setiap 12 : 12 jam. Tikus diadaptasi selama 7 hari dengan diberi pakan standar *rat chow pellet* dan air minum secara *ad libitum*.⁸⁸

4.3.2 Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria inklusi

- a) Tikus putih jantan galur Wistar
- b) Usia 6-8 minggu
- c) Berat badan 200-250 gr
- d) Sehat, tidak ada kelainan anatomi
- e) Bergerak aktif

- f) Tidak pernah digunakan dalam penelitian lain sebelumnya

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

- a) Tikus yang tidak berhasil diinduksi menjadi DMT2 setelah disuntik STZ, ditandai dengan kadar gula darah puasa < 126 mg/dl dan kadar HOMA IR < 2.9

4.3.2.3 Kriteria Drop Out

- a) Tikus mengalami infeksi atau
b) Tikus mati 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 kelompok sehat, kontrol negatif (tikus model DMT2 yang diberikan NaCl 0.9%), kontrol positif (tikus model DMT2 dengan pemberian metformin 45 mg/kgBB secara oral), perlakuan 1 (tikus DMT2 yang mendapatkan intervensi injeksi intraperitoneal SH-MSC dengan dosis 500 μ l), dan perlakuan 2 (tikus model DMT2 yang mendapatkan intervensi injeksi intraperitoneal SH-MSC dengan dosis 500 μ l yang dikombinasikan air alkali secara oral dengan dosis 5mL/hari).

4.4. Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus sampel Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ dengan t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan. Sehingga penghitungannya adalah sebagai berikut:

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$n \geq 5$$

Berdasarkan penghitungan Federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Masing-masing kelompok penelitian ditambah 1 ekor sebagai cadangan sehingga total tikus per kelompok sejumlah 6 ekor.⁸⁸

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat penelitian

- Penggiling dengan *mesh* 80 mm
- *Head Stirrer*
- *Rotary evaporator*
- Sentrifuge
- *Waterbath*
- *Vaccum Pump*

- *Circulated Chiller*
- Set kandang dengan tempat pakan dan minum
- alat cukur
- sarung tangan
- tempat fiksasi
- objek *glass*
- kaca penutup
- pisau scalpel
- pinset
- *freezer* dengan suhu -20°C
- *microtome*
- mesin *processor jaringan* otomatis
- *assay plate*
- mikropipet *single channel*
- mikropipet multichannel
- *incubator*
- vortex
- Spektrofotometer 450 nm UV-Vis

4.5.2. Bahan penelitian

- SH-MSC
- Air Alkali
- *Pellet*

- Povidon iodine
- Akuabides
- Primer *Rat IRS-1 Forward* 5'-CTGCATAATCGGGCAAAGGC-3'
- Primer *Rat IRS-1 Reverse* 5'-CATCGCTAGGAGAACCGGAC-3'
- Primer *Rat AKT Forward* 5'-CCTCAAGAATGATGGCACCT-3'
- Primer *Rat AKT Reverse* 5'-TTTGAGTCCATCAGCCACAG-3'
- *Phosphat buffer saline*
- *Streptozotocine*
- *Nicotinamide*
- *Citrate buffer*
- *RNA later*
- *RNAse inhibitor*

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. *Ethical clearance*

Penelitian dimulai dengan pengajuan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Langkah ini diambil setelah mendapatkan persetujuan proposal penelitian dari pembimbing dan penguji. Permohonan persetujuan etik ini diperlukan untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip etika dalam penggunaan hewan percobaan. Selain itu, persetujuan etik juga menjamin bahwa perlakuan terhadap hewan coba akan dilakukan

dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan, serta meminimalkan penderitaan yang tidak perlu.

4.6.2. Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar umur 6 sampai 8 minggu, berat 200-250 gram didapatkan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia, Semarang. Tikus dipelihara dalam kandang plastik yang berukuran 37 x 40 x 18 cm dengan kondisi temperatur ruangan 23-25°C, kelembaban 40-70% dan siklus gelap terang setiap 12 : 12 jam. Tikus diadaptasi selama 7 hari dengan diberi pakan standar BR A591K dan air minum secara *ad libitum*.

4.6.3. Induksi DMT2

Induksi DMT2 dilakukan dengan injeksi *Nicotinamide* dengan dosis 15 mg/kg secara intra peritoneal dan setelah 15 menit dilakukan 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, selain itu tikus diberi minum larutan sukrosa 30% sebanyak 50 cc secara *ad libitum* selama 2 hari.⁸⁹ 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. Tikus dinyatakan diabetes apabila glukosa darah puasa > 126 mg/dL.⁸⁸

4.6.4. Validasi HOMA-IR

Validasi HOMA-IR dilakukan pada hari ke-7 setelah injeksi STZ. Serum darah diambil dari vena sub orbita tikus 4-6 jam puasa, kadar insulin dievaluasi dengan ELISA. Glukosa darah puasa dihitung menggunakan alat pengukur gula darah. Nilai HOMA-IR pada tikus diabetes yang yaitu >2.9 .^{90,91} Penghitungan HOMA-IR menggunakan rumus :

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

4.6.5. Pembuatan Air Alkali

Prosedur ini dimulai dengan sintesis nanopartikel yang akan digunakan untuk meningkatkan pH air. Nanopartikel umumnya diproduksi melalui metode kimia atau fisik, seperti reduksi kimia, presipitasi, atau penguapan. Setelah nanopartikel sintetis berhasil diproduksi, mereka perlu dikarakterisasi untuk memastikan ukuran, morfologi, dan kemurniannya sesuai dengan spesifikasi yang diinginkan.

Selanjutnya, nanopartikel yang telah dikarakterisasi akan didispersi dalam matriks pembawa, sering kali berupa pelarut atau larutan stabil, untuk memastikan distribusi yang merata dalam air. Proses ini memerlukan perhatian khusus pada parameter-parameter seperti konsentrasi nanopartikel dan metode pencampuran untuk mencapai hasil yang optimal.

4.6.6. Isolasi MSC dan Pembuatan SH-MSC

Seluruh prosedur dilaksanakan di dalam *biosafety cabinet* kelas 2, menggunakan peralatan steril dan dengan menjaga tingkat sterilitas yang tinggi. *Umbilical cord* bersama janin tikus dikumpulkan dan ditempatkan dalam wadah steril berisi NaCl 0,9%. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* dan janin tikus dipindahkan ke petri *dish*, kemudian dicuci dengan PBS hingga bersih. Setelah itu, *umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus, dan pembuluh darahnya dibuang. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan secara merata di atas flask 25T, lalu dibiarkan selama 3 menit agar jaringan melekat pada permukaan *flask*. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan perlahan hingga menutupi jaringan. Eksplan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Sel mulai muncul setelah sekitar 14 hari sejak proses kultur dimulai. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari dengan cara membuang setengah dari medium lama dan menggantinya dengan medium komplit yang baru. Pemeliharaan sel dilakukan hingga mencapai konfluensi 80%.

Setelah MSCs mencapai konfluensi 80%, medium kultur lengkap ditambahkan hingga volume mencapai 10 mL. *Flask* yang berisi MSC kemudian dipindahkan ke dalam *hypoxic chamber*. Gas nitrogen dialirkan melalui katup inlet, dan sebuah *oxygen meter* diletakkan pada lubang sensor untuk memantau konsentrasi oksigen di dalam

chamber. Nitrogen ditambahkan sampai jarum indikator menunjukkan konsentrasi oksigen sebesar 5%. *Chamber* yang berisi *flask* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah periode inkubasi selesai, media kultur diambil dan disaring menggunakan TFF untuk memperoleh SMSCs.

4.6.7. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari flask menggunakan larutan *detachment* BDTM Accutase™ (cat No. 561527) atau larutan *detachment* lainnya. Cuci sel-sel tersebut dan lakukan resuspensi pada konsentrasi 1×10^7 sel/ml dalam BD Pharmingen™ Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Jika jumlah sel terbatas, resuspensi dapat dilakukan pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml.
2. Siapkan tabung Falcon 5 ml yang berisi reagen *flow cytometry* sesuai dengan tabel 4.1.
3. Ulangi langkah 2 untuk membuat 5 sampai 7 tabung, masing-masing untuk sampel yang akan dianalisis.
4. Pipet 100 µl sampel ke dalam masing-masing tabung.
5. Vortex atau goyang tabung untuk memastikan pencampuran yang merata.
6. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar di dalam ruang gelap.

7. Cuci sampel dua kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain buffer* (PBS) atau satu kali dengan *washing buffer* (FBS).
8. Bacalah sampel menggunakan *flow cytometry*. Gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk mengatur *flow cytometry*.

Tabel 4. 1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukan
1	FITC mouse anti-human CD29	5 μ l
2	PE mouse anti-human CD90	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5 μ l
4	APC Mouse anti-human CD31	5 μ l
5	Kosong	-
6	hMSC positive isotype control cocktail	20 μ l
	hMSC negative isotype control cocktail	20 μ l
	hMSC positive cocktail	20 μ l
	PE hMSC negative cocktail	20 μ l

4.6.8. Uji Diferensiasi MCSs

MSCs dikultur pada kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel per *well* dalam 24 *well plate* dengan menggunakan media standar yang mengandung DMEM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), ditambahkan dengan 10% FBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) dan 1% penisilin (100 U/mL) / streptomisin (100 μ g/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Sel-sel ditumbuhkan pada suhu 37 °C dengan 5% CO₂ dan kelembapan $\geq$ 95%. Setelah mencapai 80% konfluensi, media standar diaspirasi dan

diganti dengan media diferensiasi osteogenik yang terdiri dari Media Basal Diferensiasi Osteogenik *MesenCult™* (*Stem Cell Technologies*, Vancouver, BC, Canada), ditambah 20% Suplemen Diferensiasi Osteogenik *MesenCult™ 5X* (*Stem Cell Technologies*, Vancouver, BC, Canada) dan 1% *L-Glutamine* (*Gibco™* Invitrogen, NY, USA). Media diferensiasi diperbarui setiap 3 hari. Setelah sekitar 21 hari, matriks tulang yang terbentuk dapat divisualisasikan menggunakan pewarnaan dengan 1 mL larutan *Alizarin Red* 2% (*Sigma*, St. Louis, MO, USA).

Untuk uji diferensiasi adipogenik, prosedur serupa diterapkan. Setelah media kultur diganti dengan Basal Diferensiasi Adipogenik *MesenCult™* (*StemCell Technologies*, Vancouver, BC, Canada), ditambah 20% Suplemen Diferensiasi Adipogenik *MesenCult™ 5X* (*StemCell Technologies*, Vancouver, BC, Canada) dan 1% *L-Glutamine* (*Gibco™* Invitrogen, NY, USA), media diferensiasi diperbarui setiap 3 hari selama sekitar 30 hari. Diferensiasi adipogenik divisualisasikan dengan pewarnaan menggunakan *Oil Red O* (*Sigma*, St. Louis, MO, USA).

4.6.9. Proses Hipoksia dan TFF

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. *Flask* yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.

3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan *oxygen* meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SMSCs.

4.6.10. Validasi SH-MCSs

Kandungan molekul proinflamasi, antiinflamasi, dan faktor pertumbuhan dalam SH-MSC divalidasi menggunakan ELISA Kit. Analisis dilakukan untuk mengukur kadar molekul proinflamasi seperti SDF-1, VEGF, dan IL-10.

4.6.11. Perlakuan Hewan Coba

Setelah tikus model DMT2 terbentuk, tikus kontrol negatif (K2) disuntik intraperitoneal dengan NaCl 0,9% pada dosis 500 µL. Sebagai Kontrol Positif (K3) dilakukan pemberian per oral dengan metode sonde, metformin 45 mg/kgbb. SH-MSCs diinjeksi secara intraperitoneal pada dosis 500 µL pada hari ke-8, ke-15, dan ke-22 untuk K4 dan K5.⁹² Selain itu, K5 juga mendapatkan asupan oral air alkali 5 mL/hari melalui sonde hingga hari ke 29.⁹³ Terminasi dan pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-30.

4.6.12. Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah tikus melalui vena orbital 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 insulin.

4.6.13. Pengambilan Sampel Jaringan Pankreas Tikus

1. Pengambilan sampel dilakukan di hari ke-30
2. Sterilkan pisau bedah, pinset, tabung sampel, serta siapkan larutan *saline*, nitrogen cair, dan formalin untuk fiksasi.
3. Matikan tikus secara etis menggunakan inhalasi isofluran atau CO₂, sesuai protokol yang disetujui komite etika.
4. Letakkan tikus pada punggungnya di atas permukaan steril, lalu rentangkan kaki dengan pin.
5. Buat sayatan di garis tengah perut untuk membuka rongga perut dan *expose* hati.
6. Potong jaringan hati sekitar 50-100 mg menggunakan pisau bedah steril, lalu simpan dalam tabung yang berisi RNA later.

4.6.14. cDNA sintesis

1. Ambil sampel pankreas seberat 100 mg, potong kecil-kecil, lalu masukkan ke dalam tabung yang telah berisi 50 mL RNA Iso Plus.

2. Hancurkan potongan jaringan menggunakan *micropestle*, tambahkan lagi 50 mL RNA Iso Plus, dan biarkan selama 5 menit pada suhu ruangan.
3. Tambahkan 20 mL kloroform ke dalam larutan, kemudian aduk hingga campuran tampak berwarna putih susu.
4. Inkubasi campuran tersebut selama 2–3 menit pada suhu ruangan, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Setelah sentrifugasi, akan terbentuk tiga lapisan: lapisan atas berupa RNA dalam fase cair, lapisan tengah berisi DNA (fase setengah padat), dan lapisan bawah mengandung sisa-sisa sel.
5. Pindahkan lapisan atas yang berisi RNA ke tabung sentrifuge baru, ukur volumenya, lalu tambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan lapisan RNA tersebut.
6. Goyangkan tabung hingga terbentuk serat-serat putih, lalu sentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Setelah itu, buang supernatan dan biarkan pelet putih terlihat di dasar tabung.
7. Keringkan pelet, tambahkan 100 mL etanol 70% yang dilarutkan dalam larutan DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*), aduk kembali, dan sentrifugasi lagi pada kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.

8. Buang supernatan, tambahkan 30–50 μL DEPC, dan inkubasi larutan tersebut pada suhu 55°C selama 10 menit. Larutan RNA total yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu -80°C . Kuantifikasi RNA dilakukan menggunakan Nanodrop dengan target konsentrasi sebesar 3000 ng.
9. Untuk sintesis cDNA, campurkan RNA yang telah dikuantifikasi dengan 1 μL Oligo(dT) dan PCR water hingga mencapai volume 10 μL . Campuran ini diinkubasi selama 5 menit pada suhu 70°C .
10. Selanjutnya, gabungkan campuran A dengan campuran B yang terdiri dari 4 μL *buffer* 5X, 5 μL air yang telah diolah dengan DEPC, dan 1 μL enzim ReverTraAce. Inkubasi campuran tersebut pada suhu bertahap: 25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit, dan 85°C selama 5 menit. Proses ini menghasilkan cDNA.

4.6.15. Pembacaan ekspresi gen IRS-1 dan AKT dengan RT-PCR

1. Ekspresi gen IRS-1 dan AKT dianalisis menggunakan metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).
2. Reaksi PCR dilakukan dengan mencampurkan 3 μL cDNA sampel, 12,5 μL Taq master *mix* yang berisi dNTPs, Taq DNA polymerase, *reaction buffer*, dan MgCl_2 , 0,6 μL primer spesifik untuk gen target (primer *forward* dan *reverse*), serta 8,3 μL *Nuclease Free Water*.

3. Primer yang digunakan untuk gen IRS-1 adalah *Forward*: 5'-CTG TCA CGG AGA CCA ATG TGG-3' dan *Reverse*: 5'-AAG GCG TAG CTG AAC AAG GTG-3'; Sedangkan untuk gen AKT, menggunakan primer *Forward*: 5'-CTG CTG AGG AGG ATT GTC CAC-3' dan *Reverse*: 5'-CAC AAC AGC AAG GAG GTG A-3'.
4. Produk PCR kemudian diuji menggunakan metode RT-PCR dengan perangkat Illumina.
5. Tingkat ekspresi gen diukur dengan menghitung rasio terhadap gen *housekeeping*, kemudian data dianalisis menggunakan perangkat lunak *EcoStudy*.

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan SH-MSC dan Air Alkali dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia Semarang. Pemeliharaan, induksi hewan coba, dan perlakuan hewan coba dilakukan di *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia. Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2024 - Januari 2025.

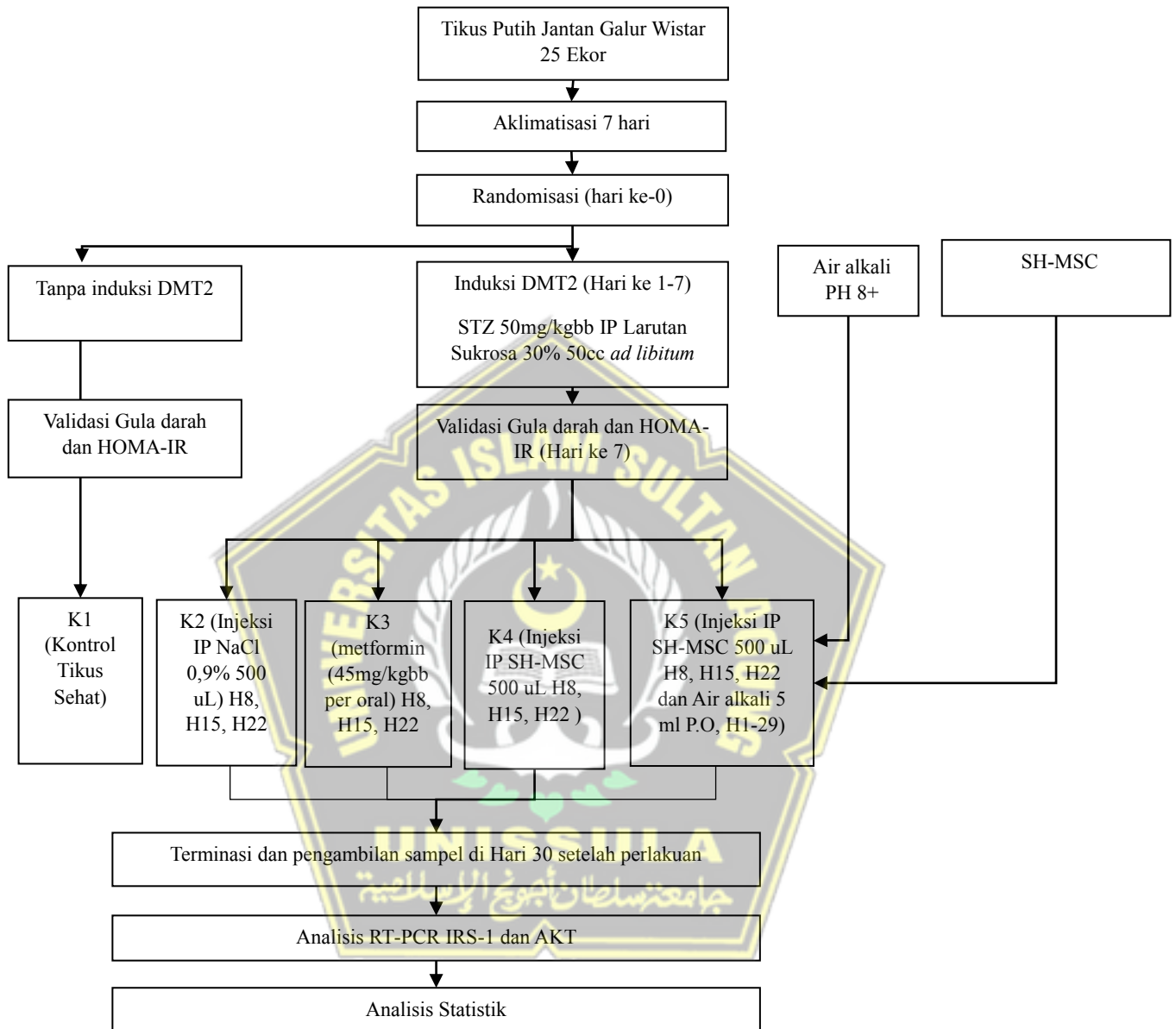
4.8. Analisa Data

Analisis data dilakukan dengan *software* SPSS. Uji deskriptif digunakan untuk mengukur Ekspresi IRS-1 dan AKT pada Tikus Wistar dari penelitian ini. Skala data yang digunakan adalah skala rasio. Setelah itu data diperoleh data diuji dengan Shapiro-Wilk dan Levene untuk analisis

normalitas dan homogenitas. Uji beda menggunakan analisis *One-Way* ANOVA dengan uji *Post Hoc* LSD.



4.9. Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

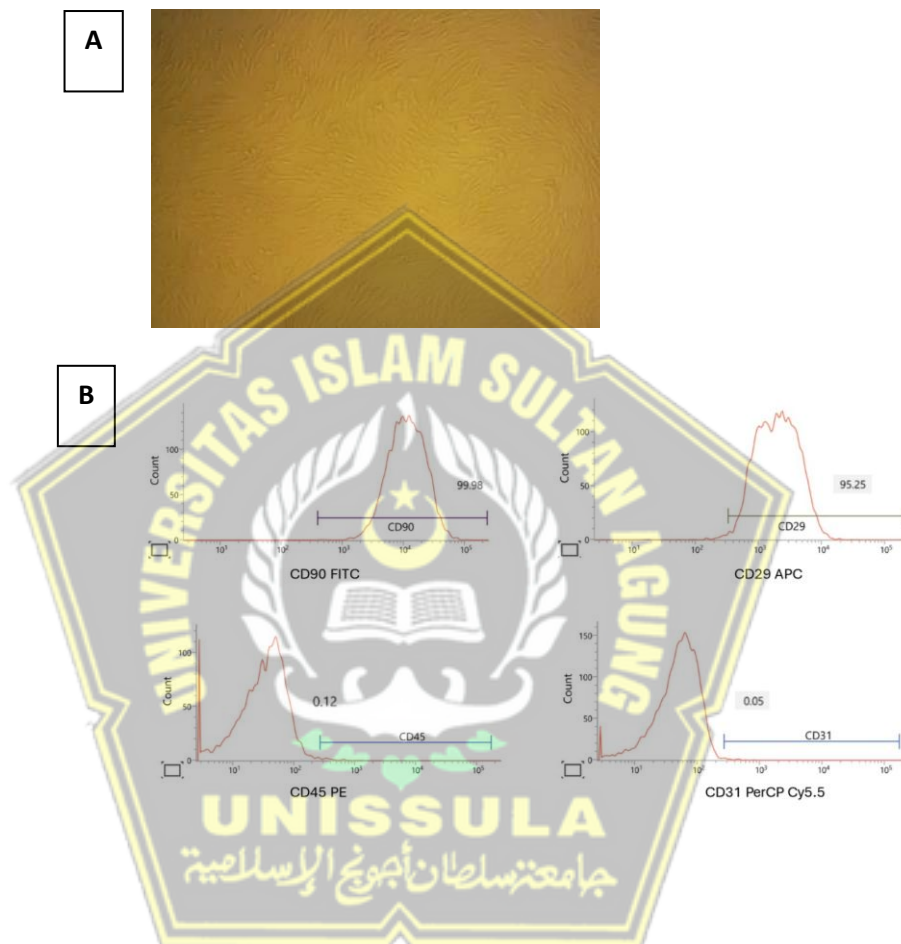
5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi EH-MSC

MSC diperoleh melalui proses isolasi di Laboratorium SCCR Indonesia, Semarang, dengan memanfaatkan tali pusat tikus pada usia kehamilan 21 hari sebagai sumber sel. Setelah isolasi, sel-sel tersebut ditumbuhkan dalam *flask* berisi media DMEM. Pada pasase kelima, morfologi sel diamati menggunakan mikroskop. Hasil pengamatan mengungkapkan bahwa sel-sel tersebut memiliki ciri khas MSC, yakni berbentuk memanjang seperti spindle (fusiform) dan mampu menempel pada permukaan *flask* (Gambar 5.1A).

Untuk memastikan identitas MSC, dilakukan analisis *flow cytometry* guna mengukur ekspresi penanda permukaan sel. Teknik ini digunakan untuk mendeteksi keberadaan protein spesifik pada membran sel, yang menjadi kunci dalam mengonfirmasi karakteristik MSC. Penanda yang diteliti meliputi CD90 dan CD29 yang merupakan penanda positif MSC, serta CD45 dan CD31 sebagai penanda negatif MSC. Hasil analisis menunjukkan bahwa sel-sel tersebut secara dominan mengekspresikan CD90 (99,98%) dan CD29 (95,25%), sementara ekspresi CD45 (0,12%) dan CD31 (0,05%) sangat minimal (Gambar 5.1B). Hasil ini memperkuat kesimpulan

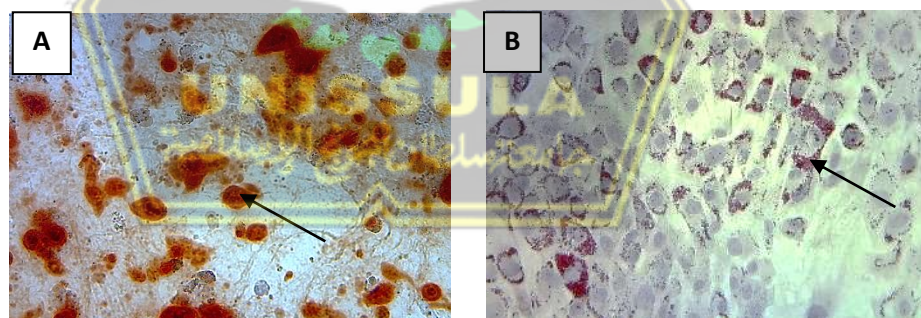
bahwa sel yang dikultur memenuhi kriteria MSC berdasarkan profil ekspresi penanda permukaan sel.



Gambar 5. 1. Validasi Karakteristik MSC. (A) morfologi MSC berbentuk *spindle-like* pada pembesaran 100x. (B) Analisis *flow cytometry* ekspresi *surface marker* CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Setelah validasi melalui metode *flow cytometry*, sesuai dengan kriteria yang ditetapkan oleh *International Society of Cell Therapy (ISCT)*, MSC harus memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi

menjadi berbagai jenis sel. Untuk menguji hal ini, sel-sel diinduksi guna mengevaluasi potensi diferensiasinya. Dalam penelitian ini, kemampuan diferensiasi MSC diuji untuk membentuk sel-sel dewasa, seperti osteosit dan adiposit, dengan menggunakan medium khusus yang dirancang untuk memicu proses diferensiasi. Verifikasi kemampuan diferensiasi ini sangat penting untuk memastikan sifat multipoten MSC, yang merupakan karakteristik dari sel punca. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa MSC berhasil berdiferensiasi menjadi osteosit, yang dikonfirmasi melalui pewarnaan positif dengan Alizarin *Red*, serta menjadi adiposit, yang teridentifikasi melalui pewarnaan *Oil Red O*. Temuan ini membuktikan bahwa MSC memiliki kemampuan untuk berkembang menjadi sel-sel fungsional tertentu ketika diberikan kondisi yang tepat (Gambar 5.2 A dan B).



Gambar 5. 2. Kemampuan MSC berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin *red* dan (B) Adiposit pada pewarnaan *oil red o* (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 400x).

MSC selanjutnya diinkubasi dalam lingkungan hipoksia dengan konsentrasi oksigen 5% selama 24 jam menggunakan *chamber* hipoksia. Setelah masa inkubasi, medium kultur yang mengandung

sekretom MSC dipanen dan disaring melalui metode *Tangential Flow Filtration* (TFF) dengan rentang ukuran molekul 10-100 kDa untuk memperoleh SH-MSC. Hasil analisis profil protein SH-MSC ditampilkan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5. 1. Profil Sitokin SH-MSC

Paramater	Hasil	Standar	Metode Analisis
VEGF	1064,74 pg/mL	>500 pg/mL	ELISA
SDF-1	7374,95 pg/mL	>500 pg/mL	ELISA
IL-10	523,23 pg/mL	>500 pg/mL	ELISA

5.1.2. Hasil Validasi Diabetes Melitus Tipe 2

Validasi pembentukan model DMT2 pada tikus dilakukan mengukur GDP dan HOMA-IR didapatkan hasil seperti pada tabel 5.2.

Tabel 5. 2. Hasil Validasi Tikus DMT2

Parameter	Nilai Standar	Nilai Analisis
Gula Darah Puasa	105 mg/dL	481 mg/dL
HOMA-IR	0,77	20,91

Setelah tikus tervalidasi mengalami DMT2, tikus yang tanpa induksi STZ digunakan sebagai kontrol sehat (K1), sedangkan tikus yang mengalami DMT2 akibat induksi STZ dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan secara acak yaitu K2 (tikus DMT2 diinjeksi IP NaCl 500 uL), K3 (Tikus dengan metformin per oral dosis 45

mg/kgBB), K4 (tikus DMT2 dengan injeksi IP SH-MSC 500 uL pada hari ke-8, 15 dan 22), K5 (tikus DMT2 dengan injeksi IP SH-MSC 500 uL pada hari ke-8, 15 dan 22 dan air alkali 5 ml pada hari ke 1 sampai 29).

Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-30 setelah diterminasi. Jaringan pankreas kemudian dihomogenisasi menggunakan trizole RNase inhibitor untuk menghambat kerusakan RNA yang diekstraksi. Setelah RNA didapatkan, analisis ekspresi IRS-1 dan AKT dilakukan menggunakan RT-PCR.

5.1.3. Ekspresi IRS-1

Hasil penelitian pengaruh pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi IRS-1 pada tikus model DM2 menemukan bahwa kelompok K1 (tikus sehat), nilai ekspresi IRS-1 berada pada *base line* sebesar $1,00 \pm 0,00$. Sementara itu, kelompok K2 menunjukkan peningkatan ekspresi sebesar $2,24 \pm 0,87$. Pada kelompok K3 terjadi peningkatan ekspresi IRS-1 menjadi $3,41 \pm 1,13$, kemudian K4, ekspresi IRS-1 meningkat lebih tinggi dibandingkan K2, dengan nilai $4,59 \pm 0,87$. Sedangkan kelompok K5, yang menerima kombinasi SH-MSC dan air alkali, menunjukkan peningkatan ekspresi tertinggi dengan nilai $7,57 \pm 1,23$.

Uji normalitas *Saphiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ($P > 0,05$). Berdasarkan data yang normal dan

homogen, dilanjutkan dengan uji beda menggunakan uji ANOVA. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok ($P < 0,05$), mengindikasikan bahwa perlakuan yang diberikan memiliki efek yang nyata terhadap ekspresi IRS-1. Deskripsi dan analisis data ditampilkan pada tabel 5.3.

Tabel 5. 3. Data Hasil Analisis Ekspresi IRS-1

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4	K5	
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
IRS-1	1,00±0,00	2,24±0,87	3,41±1,13	4,59±0,87	7,57±1,23	
<i>Shapiro Wilk</i>	-	0,160	0,400	0,448	0,252	
<i>Lavene test</i>						0,462
<i>One Way Anova</i>						0,000

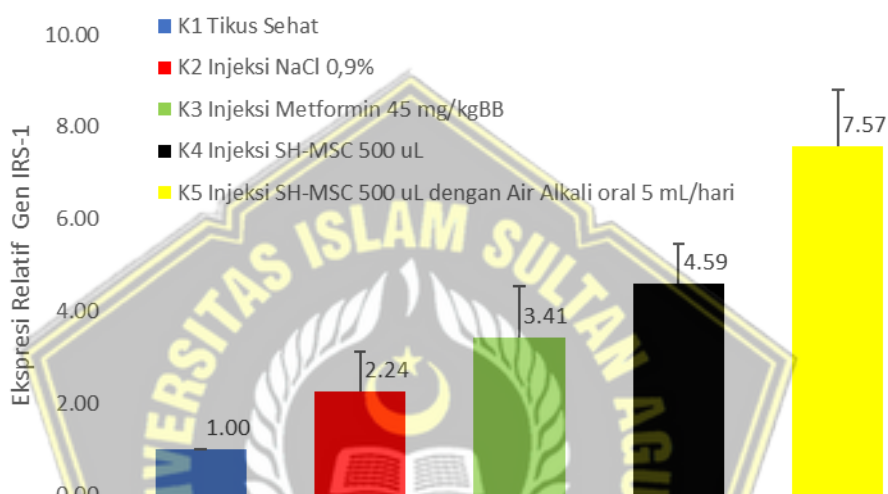
Berdasarkan data ekspresi IRS-1 yang memiliki beda nyata setelah uji parametrik *One Way ANOVA*. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji *Post Hoc LSD*, karena data bersifat normal dan homogen.

Tabel 5.4. Uji *Post Hoc LSD* Ekspresi Gen IRS-1

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K2	K3	0,066
	K4	0,001
	K5	0,000
K3	K4	0,064
	K5	0,000
K4	K5	0,000

Data hasil uji *post hoc LSD* tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.4. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K4 tidak

berbeda secara signifikan dibandingkan dengan K3 ($P>0,05$), namun berbeda signifikan dibanding K2 ($p<0,05$), sedangkan K5 berbeda secara signifikan dengan seluruh kelompok ($p<0,05$). Berdasarkan hasil penelitian, terdapat pola peningkatan ekspresi gen AKT seperti yang terlihat pada gambar 5.3



Gambar 5. 3 Pola Peningkatan Ekspresi Gen IRS-1

5.1.4. Ekspresi AKT

Hasil analisis ekspresi AKT menggunakan RT-PCR

menunjukkan bahwa Kelompok K1 menunjukkan ekspresi baseline $1,00\pm0,00$. Kelompok K2 mengalami peningkatan ekspresi menjadi $2,88\pm1,59$. Kelompok K3 memiliki ekspresi sebesar $3,26\pm0,76$, sedangkan Kelompok K4 menunjukkan peningkatan signifikan menjadi $8,59\pm2,04$ dan Kelompok K5 mencapai ekspresi tertinggi, yaitu $12,66\pm3,87$.

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *lavene test* mengonfirmasi distribusi data normal dan homogen ($P > 0,05$), sementara uji *ANOVA* ($P < 0,05$) menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok, membuktikan bahwa perlakuan yang diberikan secara nyata memengaruhi ekspresi AKT pada tikus model DMT2. Data ditampilkan pada Tabel 5.5.

Tabel 5. 5. Data Hasil Analisis Ekpresi AKT

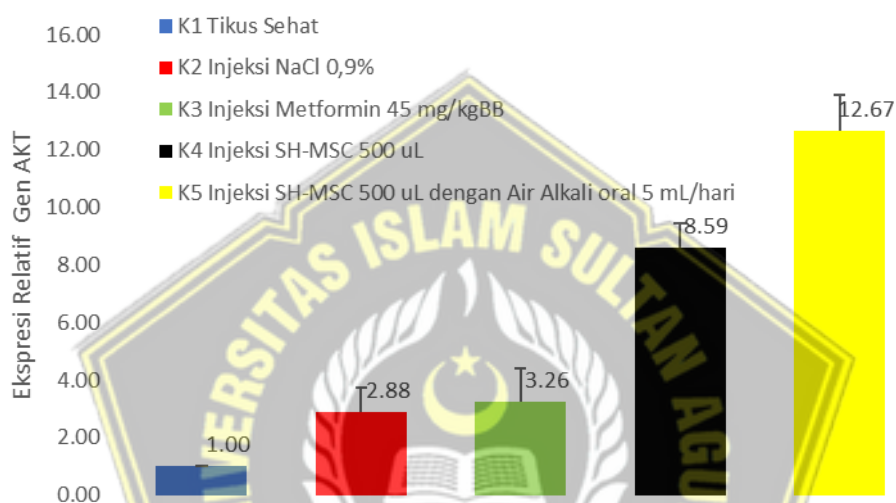
Variabel	Kelompok					P
	K1 Rerata $\pm$ SD	K2 Rerata $\pm$ SD	K3 Rerata $\pm$ SD	K4 Rerata $\pm$ SD	K5 Rerata $\pm$ SD	
AKT	1,00 $\pm$ 0,00	2,88 $\pm$ 1,59	3,26 $\pm$ 0,76	8,59 $\pm$ 2,04	12,66 $\pm$ 3,87	
<i>Shapiro Wilk</i>	-	0,060	0,127	0,257	0,077	
<i>Lavene test</i>						0,095
<i>One Way Anova</i>						0,000

Berdasarkan data analisis *One Way ANOVA* terhadap ekspresi AKT yang berbeda nyata. Selanjutnya, untuk mengevaluasi hubungan antar kelompok, dilakukan uji *Post Hoc LSD*, karena data bersifat normal dan homogen. Hasil uji *Post Hoc LSD* ditampilkan pada Tabel 5.6.

Tabel 5. 6. Uji *Post Hoc* LSD Ekspresi Gen AKT

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K2	K3	0,786
	K4	0,000
	K5	0,000
K3	K4	0,001
	K5	0,000
K4	K5	0,007

Data hasil uji *post hoc* LSD tersebut ditampilkan dalam Tabel 5.6. Berdasarkan hasil analisis data ditemukan bahwa K4 dan K5 berbeda signifikan dibanding dengan K2 dan K3 ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian, terdapat pola peningkatan ekspresi gen AKT seperti yang terlihat pada gambar 5.4.



Gambar 5. 4 Pola Peningkatan Ekspresi Gen AKT

5.2. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi SH-MSC dan air alkali secara signifikan meningkatkan ekspresi IRS-1 dan AKT pada pankreas tikus model DMT2. Menurut penelitian terdahulu, peningkatan ini dapat disebabkan oleh berbagai mekanisme molekuler yang melibatkan penghambatan stres oksidatif, penurunan inflamasi, serta aktivasi jalur pensinyalan insulin melalui PI3K/AKT.^{36,94,95}

Insulin Receptor Substrate-1 adalah protein kunci dalam transduksi sinyal insulin.²⁸ Penurunan ekspresi IRS-1 akibat peningkatan stres oksidatif dan inflamasi kronis menyebabkan DMT2.²⁸ Protein dalam SH-MSC diketahui mengandung berbagai *growth factor* dan miRNA yang berperan dalam regulasi IRS-1. Beberapa faktor penting yang terlibat meliputi HGF yang dapat meningkatkan ekspresi IRS-1.^{96,97}

Penelitian terdahulu melaporkan miRNA yang terkandung dalam SH-MSC seperti miR-21 diketahui mampu menghambat ekspresi NOX4, yang merupakan salah satu sumber utama produksi ROS.⁹⁸ Dengan menekan produksi ROS, SH-MSC membantu menjaga stabilitas IRS-1, memungkinkan aktivasi jalur pensinyalan insulin yang lebih optimal.^{99,100} Stres oksidatif merupakan salah satu penyebab utama resistensi insulin pada DMT2, dimana kelebihan produksi ROS di pankreas mengakibatkan kerusakan sel β dan gangguan fungsi insulin.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ ROS yang berlebihan dapat merusak protein, lipid, dan DNA, sehingga menghambat mekanisme fosforilasi yang diperlukan dalam pensinyalan insulin. Pada kondisi normal, aktivasi IRS-1 bergantung pada fosforilasi tirosin, namun dalam kondisi DMT2, peningkatan ROS memicu fosforilasi serin pada IRS-1, yang justru menghambat aktivitasnya.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ SH-MSC yang dikondisikan dalam hipoksia diketahui memiliki kemampuan antioksidan yang kuat melalui produksi SOD, CAT, dan GPx.¹⁰⁸ Enzim-enzim ini bekerja sama untuk menetralkan ROS dengan cara mengubah radikal superoksida menjadi

senyawa yang lebih stabil seperti H_2O_2 , yang kemudian dipecah menjadi air dan oksigen.¹⁰⁸

Selain stres oksidatif, inflamasi kronis juga memainkan peran penting dalam resistensi insulin. Kondisi DM2 sering dikaitkan dengan aktivasi NF- κ B, yang meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β . Sitokin ini berperan dalam menghambat jalur pensinyalan insulin dengan cara meningkatkan fosforilasi serin pada IRS-1, yang pada akhirnya menghambat aktivasi PI3K/AKT.^{36,94,95} SH-MSC memiliki kemampuan imunomodulator yang dapat menekan inflamasi melalui produksi IL-10 dan TGF- β , dua sitokin anti-inflamasi yang menekan aktivasi NF- κ B, sehingga mengurangi produksi TNF- α dan IL-6.^{16,109–112} Selain itu, SH-MSC juga diketahui meningkatkan produksi PGE2 yang berperan dalam menekan respons inflamasi berlebihan. Penurunan inflamasi ini berkontribusi terhadap peningkatan stabilitas IRS-1, yang pada akhirnya meningkatkan respons sel terhadap insulin.^{16,109–112}

Selain meningkatkan ekspresi IRS-1, kombinasi SH-MSC dan air alkali juga berperan dalam peningkatan ekspresi AKT, yang merupakan komponen kunci dalam jalur pensinyalan insulin.^{16,109–112} Aktivasi AKT sangat penting dalam berbagai proses biologis, termasuk regulasi transportasi GLUT4 ke membran sel untuk meningkatkan penyerapan glukosa, serta pencegahan apoptosis sel β pankreas.⁴ Pada kondisi DM2, penurunan IRS-1 menyebabkan gangguan aktivasi PI3K, yang pada akhirnya menghambat fosforilasi AKT. Dengan meningkatnya ekspresi IRS-

1 akibat terapi SH-MSC dan air alkali, aktivasi PI3K meningkat, sehingga memungkinkan fosforilasi AKT yang lebih optimal. SH-MSC juga diketahui mengandung HGF, yang berperan langsung dalam meningkatkan ekspresi dan aktivasi AKT.^{113–115}

miR-21, salah satu mikroRNA utama dalam SH-MSC, berperan penting dalam modulasi jalur sinyal insulin. miR-21 diketahui dapat meningkatkan ekspresi IRS-1 dengan menekan sinyal inflamasi yang biasanya menurunkan IRS-1 dalam kondisi resistensi insulin. Dengan menghambat sitokin pro-inflamasi dan stres oksidatif, miR-21 menciptakan lingkungan yang lebih kondusif bagi aktivasi IRS-1, sehingga meningkatkan transduksi sinyal insulin. Selain itu, miR-21 secara tidak langsung meningkatkan fosforilasi AKT, yang merupakan langkah kunci dalam pengambilan glukosa dan metabolisme seluler. Dengan menghambat PTEN, regulator negatif jalur PI3K/AKT, miR-21 meningkatkan aktivasi AKT, yang pada akhirnya memperbaiki sensitivitas insulin dan fungsi sel β pankreas.^{116–119}

Air alkali dalam penelitian ini juga berperan dalam menunjang efektivitas terapi SH-MSC. Beberapa studi menunjukkan bahwa air alkali mengandung banyak ion hydrogen sehingga dapat berperan sebagai *ion scavenger* yang dapat mengurangi stres oksidatif dan inflamasi.^{6,7,71} Selain itu, air alkali mendukung aktivitas enzim-enzim antioksidan seperti SOD dan CAT yang juga berujung pada penekanan stres oksidatif dan inflamasi.^{72,76,77} Ketika inflamasi berkurang, aktivasi jalur NF- κ B dan JNK

juga menurun, yang berarti produksi sitokin proinflamasi berkurang. Hal ini memungkinkan IRS-1 mengalami fosforilasi tirosin yang lebih baik, yang meningkatkan aktivasi PI3K/Akt dan memperbaiki sensitivitas insulin.^{7,8,71,72,76,77}

Berdasarkan hasil penelitian ini, kombinasi SH-MSC dan air alkali meningkatkan ekspresi IRS-1 dan AKT melalui berbagai mekanisme, termasuk penghambatan ROS, penurunan inflamasi, serta aktivasi jalur pensinyalan PI3K/AKT melalui peningkatan enzim antioksidan dan regulasi NOX4, penekanan NF- κ B. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi SH-MSC dan air alkali berpotensi sebagai terapi alternatif untuk meningkatkan sensitivitas insulin dan memperbaiki fungsi pankreas pada kondisi DMT2. Namun demikian, penelitian ini memiliki keterbatasan karena tidak mengkaji ekspresi dari NOX4 dan Nf-kb yang merupakan faktor kunci dalam penurunan ROS dan inflamasi.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi IRS-1 dan AKT pada tikus jantan galur Wistar model DMT2 menunjukkan hal-hal berikut:

1. Pemberian SH-MSC dan Air Alkali berpengaruh terhadap ekspresi IRS-1 dan ekspresi AKT pada Tikus Jantan Galur Wistar Model DMT2
2. Terdapat pengaruh signifikan terhadap peningkatan ekspresi IRS-1 pada kelompok K4 dan K5 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Terdapat pengaruh signifikan terhadap peningkatan ekspresi AKT pada kelompok K4 dan K5 dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

1. Penelitian ini masih terbatas pada hewan coba sehingga diperlukan penelitian lanjutan ke manusia.
2. Penelitian diharapkan dilanjutkan dengan mengkaji peran SH-MSC yang dikombinasikan dengan obat standar pada DMT2.
3. Melakukan penelitian selanjutnya dengan pemeriksaan histopatologi pankreas untuk evaluasi efek terapi pada tingkat jaringan.
4. Melakukan penelitian tentang uji keamanan jangka panjang kombinasi SH-MSC dan air alkali

5. Studi yang akan datang diharapkan untuk mengkaji ekspresi NOX4 dan Nf- κ b yang merupakan faktor kunci dalam penurunan ROS dan inflamasi.



DAFTAR PUSTAKA

1. Yujiao Xie, Xiawei Xu, Jie Lin, Yanping Xu, Jing Wang, Yong Ren, A. W. Effective Separation of Cancer-Derived Exosomes in Biological Samples for Liquid Biopsy: Classic Strategies and Innovative Development. *Glob. Challenges* **6**, 1–16 (2022).
2. Huang, X., Liu, G., Guo, J. & Su, Z. Q. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences* vol. 14 1483–1496 at <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173> (2018).
3. Ijaz, A., Babar, S., Sarwar, S., Shahid, S. U. & Shabana. The combined role of allelic variants of IRS-1 and IRS-2 genes in susceptibility to type2 diabetes in the Punjabi Pakistani subjects. *Diabetol. Metab. Syndr.* **11**, (2019).
4. Zolfaghari, N. *et al.* microRNA-96 targets the INS/AKT/GLUT4 signaling axis: Association with and effect on diabetic retinopathy. *Heliyon* **9**, (2023).
5. 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.* **41**, (2022).
6. 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.* **44**, 179–185 (2021).
7. 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).
8. Wicaksono, S. A. . N. D. H. . & U. S. B. (2018). T. 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* **14**, 1–6 (2020).
9. Kementrian kesehatan republik indonesia. Tetap Produktif, Cegah Dan Atasi Diabetes Mellitus. *pusat data dan informasi kementrian kesehatan RI* at (2020).
10. Federation, I. D. IDF Diabetes Atlas Tenth edition 2021. *International Diabetes Federation* 176 (2021).
11. Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* vol. 60 1577–1585 at

<https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z> (2017).

12. Gumantara, M. P. B., Oktarlina, R. Z., Farmakologi, B., Kedokteran, F. & Lampung, U. Perbandingan Monoterapi dan Kombinasi Terapi Sulfonilurea-Metformin terhadap Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Comparison of Monotherapy and Sulfonilurea-Metformin Combination Therapy to Patient with Type 2 Diabetes Mellitus. *Majority* **6**, 55–59 (2017).
13. Gomez-Peralta, F. *et al.* Practical Approach to Initiating SGLT2 Inhibitors in Type 2 Diabetes. *Diabetes Therapy* vol. 8 953–962 at <https://doi.org/10.1007/s13300-017-0277-0> (2017).
14. Galicia-Garcia, U. *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms21176275> (2020).
15. Teratani, T. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Secretions Enhanced ATP Generation on Isolated Islets during Transplantation. *Islets* **14**, 69–81 (2022).
16. Abdolmohammadi, K. *et al.* Effect of hypoxia preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Adv. Pharm. Bull.* **10**, 297–306 (2020).
17. Cooper, T. T. *et al.* Ultrafiltration and injection of islet regenerative stimuli secreted by pancreatic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.* **30**, 247–264 (2021).
18. Cooper, T. T. *et al.* Characterization of a Vimentinhigh/Nestinhigh proteome and tissue regenerative secretome generated by human pancreas-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* **38**, 666–682 (2020).
19. Samakova, A. *et al.* The pi3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia. *Physiol. Res.* **68**, S131–S138 (2019).
20. Gesualdi, L. *et al.* The PI3K/AKT pathway is activated by HGF in NT2D1 non- seminoma cells and has a role in the modulation of their malignant behavior. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–22 (2020).
21. Ribot, J. *et al.* Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* (2017) doi:10.1111/jcmm.12969.
22. Deng, Z. *et al.* Infusion of adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits skeletal muscle Mitsugumin 53 elevation and thereby alleviates insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Mol. Med. Rep.* **17**, 8466–8474 (2018).
23. 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.* **12**, 1–13 (2018).
24. 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. . C. R. in P. and D. D. 2 (2021): 100069. Secretome effect of adipose tissue- derived stem cells cultured two- dimensionallyand three- dimensionallyin mice with streptozocin induced type 1 diabetes. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* **2** 100069 **2**, 1–10 (2021).
 25. Luo, Q., Xiao, Y., Alex, A., Cummins, T. R. & Bhatwadekar, A. D. The diurnal rhythm of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and Kir4.1 in diabetes: Implications for a clock gene *bmal1*. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **60**, 1928–1936 (2019).
 26. Yang, H. *et al.* Activation of Hippocampal IR/IRS-1 Signaling Contributes to the Treatment with Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction on the Diabetes-Related Depression. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2021**, (2021).
 27. Talbot, K. *et al.* Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* **122**, 1316–1338 (2012).
 28. Martínez Báez, A., Ayala, G., Pedroza-Saavedra, A., González-Sánchez, H. M. & Chihu Amparan, L. Phosphorylation Codes in IRS-1 and IRS-2 Are Associated with the Activation/Inhibition of Insulin Canonical Signaling Pathways. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 46 634–649 at <https://doi.org/10.3390/cimb46010041> (2024).
 29. Gao, X. K. *et al.* VAPB-mediated ER-targeting stabilizes IRS-1 signalosomes to regulate insulin/IGF signaling. *Cell Discov.* **9**, (2023).
 30. Yu, Y. & Chai, J. The function of miRNAs and their potential as therapeutic targets in burn-induced insulin resistance (Review). *International Journal of Molecular Medicine* vol. 35 305–310 at <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.2023> (2015).
 31. Nagarajan, S. R. *et al.* Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: A comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **316**, E578–E589 (2019).
 32. Lacy, M. E. *et al.* Comparison of cognitive function in older adults with type 1 diabetes, type 2 diabetes, and no diabetes: results from the Study of Longevity in Diabetes (SOLID). *BMJ open diabetes Res. care* **10**, (2022).
 33. Arneth, B., Arneth, R. & Shams, M. Metabolomics of type 1 and type 2

- diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms20102467> (2019).
34. Huang, R., Lu, Y., Xie, Z., Yang, X. & Ou, Y. A bovine milk-derived peptide ameliorates alloxan-injured pancreatic β cells through IRS2/PI3K/Akt signaling. *Life Sci.* **308**, (2022).
 35. Li, W. *et al.* MicroRNA-191 blocking the translocation of GLUT4 is involved in arsenite-induced hepatic insulin resistance through inhibiting the IRS1/AKT pathway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **215**, (2021).
 36. Liu, Y., Wang, W., Liang, B., Zou, Z. & Zhang, A. NLRP3 inflammasome activation and disruption of IRS-1/PI3K/AKT signaling: Potential mechanisms of arsenic-induced pancreatic beta cells dysfunction in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **289**, 117504 (2025).
 37. Miao, R. *et al.* Akt: A Potential Drug Target for Metabolic Syndrome. *Frontiers in Physiology* vol. 13 at <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.822333> (2022).
 38. Mackenzie, R. W. A. & Elliott, B. T. Akt/PKB activation and insulin signaling: A novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity* vol. 7 55–64 at <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260> (2014).
 39. Chen, S. H., Liu, X. N. & Peng, Y. MicroRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 5895–5906 (2019).
 40. Yang, S. *et al.* MicroRNA-193b impairs muscle growth in mouse models of type 2 diabetes by targeting the PDK1/Akt signalling pathway. *Diabetologia* **65**, 563–581 (2022).
 41. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (80-.).* **307**, 1098–1101 (2005).
 42. Benite-Ribeiro, S. A., Rodrigues, V. A. de L. & Machado, M. R. F. Food intake in early life and epigenetic modifications of pro-opiomelanocortin expression in arcuate nucleus. *Molecular Biology Reports* vol. 48 3773–3784 at <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06340-x> (2021).
 43. Scuteri, A. & Monfrini, M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 44. Ullah, I., Subbarao, R. B. & Rho, G. J. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* **35**, e00191 (2015).
 45. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position

statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).

46. Ibrahim, R., Mndlovu, H., Kumar, P., Adeyemi, S. A. & Choonara, Y. E. Cell Secretome Strategies for Controlled Drug Delivery and Wound-Healing Applications. *Polymers* at <https://doi.org/10.3390/polym14142929> (2022).
47. Putra, A. *et al.* Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Research* 2021 10228 **10**, 228 (2021).
48. Huzes, G. & Sipos, F. Mesenchymal stem cell-derived secretome: a potential therapeutic option for autoimmune and immune-mediated inflammatory diseases. *Cells* **11**, 2300 (2022).
49. Caroti, C. M. *et al.* A Novel Technique for Accelerated Culture of Murine Mesenchymal Stem Cells that Allows for Sustained Multipotency. *Sci. Rep.* 1–14 (2017) doi:10.1038/s41598-017-13477-y.
50. Macrin, D., Joseph, J. P., Pillai, A. A. & Devi, A. Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence. *Stem Cell Rev. Reports* **13**, 741–756 (2017).
51. Su, Y. *et al.* Pretreated Mesenchymal Stem Cells and Their Secretome: Enhanced Immunotherapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms24021277> (2023).
52. Trzyna, A. & Banaś-Ząbczyk, A. Adipose-derived stem cells secretome and its potential application in “stem cell-free therapy”. *Biomolecules* vol. 11 at <https://doi.org/10.3390/biom11060878> (2021).
53. Pinho, A. G., Cibrão, J. R., Silva, N. A., Monteiro, S. & Salgado, A. J. Cell secretome: Basic insights and therapeutic opportunities for CNS disorders. *Pharmaceuticals* **13**, 1–18 (2020).
54. Huo, W., Li, Y., Zhang, Y. & Li, H. Mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-21-5p downregulates PDCD4 and ameliorates erectile dysfunction in a rat model of diabetes mellitus. *FASEB J.* **34**, 13345–13360 (2020).
55. Ruvolo, P. P. *et al.* Exosomes Mediate Communication Between the Microenvironment and Leukemic Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **120**, 3469–3469 (2012).
56. Norouzi-Barough, L., Shirian, S., Gorji, A. & Sadeghi, M. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes as a cell-free therapy approach for the treatment of skin, bone, and cartilage defects. *Connective Tissue Research* at <https://doi.org/10.1080/03008207.2021.1887855> (2022).
57. Sandonà, M. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells and Their Secretome: New Therapeutic Perspectives for Skeletal Muscle Regeneration. *Frontiers in*

Bioengineering and Biotechnology at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.652970> (2021).

58. Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D. & Ritter, T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy* at <https://doi.org/10.1038/mt.2015.44> (2015).
59. Bi, Y. *et al.* Systemic proteomics and miRNA profile analysis of exosomes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, (2022).
60. Foo, J. B. *et al.* Comparing the Therapeutic Potential of Stem Cells and their Secretory Products in Regenerative Medicine. *Stem Cells International* vol. 2021 at <https://doi.org/10.1155/2021/2616807> (2021).
61. Kim, J. Y. *et al.* Defined MSC exosome with high yield and purity to improve regenerative activity. *J. Tissue Eng.* **12**, (2021).
62. Driscoll, J., Yan, I. K. & Patel, T. Development of a Lyophilized Off-the-Shelf Mesenchymal Stem Cell-Derived Acellular Therapeutic. *Pharmaceutics* **14**, (2022).
63. Sung, S. E. *et al.* Human Epidural AD–MSC Exosomes Improve Function Recovery after Spinal Cord Injury in Rats. *Biomedicines* **10**, (2022).
64. Ko, E., Yoon, T., Lee, Y., Kim, J. & Park, Y. B. ADSC secretome constrains NK cell activity by attenuating IL-2-mediated JAK-STAT and AKT signaling pathway via upregulation of CIS and DUSP4. *Stem Cell Res. Ther.* **14**, (2023).
65. Morales-Guadarrama, G. *et al.* The Inhibition of the FGFR/PI3K/Akt Axis by AZD4547 Disrupts the Proangiogenic Microenvironment and Vasculogenic Mimicry Arising from the Interplay between Endothelial and Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
66. Wang, P., Anderson, D. E. & Ye, Y. PI3K-AKT activation rescults integrin signaling to drive filamentous tau-induced proinflammatory astrogliosis. *Cell Biosci.* **13**, (2023).
67. Tesch, G. H. Diabetic nephropathy - is this an immune disorder? *Clinical Science* vol. 131 2183–2199 at <https://doi.org/10.1042/CS20160636> (2017).
68. Holthaus, M., Santhakumar, N., Wahlers, T. & Paunel-Görgülü, A. The secretome of preconditioned mesenchymal stem cells drives polarization and reprogramming of M2a macrophages toward an IL-10-producing phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4104 (2022).
69. Zang, L. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 1–11 (2017).
70. Fenton, T. R. & Huang, T. Systematic review of the association between dietary acid load, alkaline water and cancer. *BMJ Open* **6**, (2016).

71. Lee, M. *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults. *Processes* **10**, (2022).
72. LeBaron, T. W., Sharpe, R. & Ohno, K. Electrolyzed–Reduced Water: Review II: Safety Concerns and Effectiveness as a Source of Hydrogen Water. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 at <https://doi.org/10.3390/ijms232314508> (2022).
73. Li, H. *et al.* Hydrogen-rich water attenuates the radiotoxicity induced by tritium exposure in vitro and in vivo. *J. Radiat. Res.* **62**, 34–45 (2021).
74. Franceschelli, S. *et al.* New approach in translational medicine: Effects of electrolyzed reduced water (ERW) on NF- κ B/iNOS pathway in U937 cell line under Altered Redox state. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
75. Lebaron, T. W. *et al.* The effects of 24-week, high-concentration hydrogen-rich water on body composition, blood lipid profiles and inflammation biomarkers in men and women with metabolic syndrome: A randomized controlled trial. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes.* **13**, 889–896 (2020).
76. Wasserfurth, P. *et al.* Effects of mineral waters on acid–base status in healthy adults: Results of a randomized trial. *Food Nutr. Res.* **63**, (2019).
77. Setzler, B. P. & Yan, Y. Modeling of Performance Loss and pH Gradients in Hydroxide Exchange Membrane Fuel Cells Exposed to Carbon Dioxide. *ECS Meet. Abstr.* **MA2017-01**, 1654–1654 (2017).
78. Aoi, W. & Marunaka, Y. Importance of pH Homeostasis in Metabolic Health and Diseases: Crucial Role of Membrane Proton Transport. *BioMed Research International* vol. 2014 at <https://doi.org/10.1155/2014/598986> (2014).
79. Remmerie, A. & Scott, C. L. Macrophages and lipid metabolism. *Cell. Immunol.* **330**, 27–42 (2018).
80. Mutlu, A. S., Duffy, J. & Wang, M. C. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity. *Developmental Cell* vol. 56 1394–1407 at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.034> (2021).
81. Alharbi, K. K. *et al.* Association of the genetic variants of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) with type 2 diabetes mellitus in a Saudi population. *Endocrine* **47**, 472–477 (2014).
82. Jabur, E. A. A., Al-Tu'ma, F. J. & Al-Safi, W. G. Insulin Receptor Substrate Gene Polymorphism and its Association with Insulin Resistance in Iraqi Gestational Diabetic Women Eman. *Biochem. Cell. Arch.* **21**, 1055–1060 (2021).
83. Saheli, M. *et al.* Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast

- behaviors. *Arch Dermatol Res* **3125**, 325 (2020).
84. Bajgai, J. *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Gastrointestinal Diseases. *Processes* vol. 10 at <https://doi.org/10.3390/pr10010087> (2022).
 85. Ghasemi, A. & Jeddi, S. STREPTOZOTOCIN AS A TOOL FOR INDUCTION OF RAT MODELS OF DIABETES: A PRACTICAL GUIDE. *EXCLI Journal* vol. 22 274–294 at <https://doi.org/10.17179/excli2022-5720> (2023).
 86. Isildar, B. *et al.* 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.* **129**, (2024).
 87. Marczyk, G. R., DeMatteo, D., & Festinger, D. *Essentials of Research Design and Methodology*. John Wiley & Sons (2010).
 88. Widyaningsih, W. ., Putra, A. ., Priyantini, S. ., Muhar, A. M. ., Sumarawati, T. ., Trisnadi, S. ., Amalina, N. D. ., Alif, I. ., Prasetyo, A. ., & Satria Irawan, R. C. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Trends Sci.* , 7278. **21**, 72–78 (2024).
 89. Rais, N. *et al.* Model of Streptozotocin-nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: a Comparative Review. *Curr. Diabetes Rev.* **18**, (2021).
 90. Rahmawati, N., DK, K. & Afifah, D. N. Antioxidant Total and HOMA-IR of Diabetic Rats Given *Crocatum piper* and *Andrographis paniculata* Leaf Extracts. *J. Biomed. Transl. Res.* **7**, 56–61 (2021).
 91. Aleme, B. M. & Amadi, B. A. Assessment of the Risk of Developing Cardiovascular Disease in Prediabetic and Diabetic Wistar Rats with Insulinaemia, in a Selected Model. *J. Complement. Altern. Med. Res.* 1–11 (2022) doi:10.9734/jocamr/2022/v18i130341.
 92. Irawan, R. C. S., Putra, A., Setyo, T., Ghaisani, S. S. & 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.* **42**, 320–328 (2023).
 93. Jackson, K. *et al.* Effects of alkaline-electrolyzed and hydrogen-rich water, in a high-fat-diet nonalcoholic fatty liver disease mouse model. *World J. Gastroenterol.* **24**, 5095–5108 (2018).
 94. Rohm, T. V, Meier, D. T., Olefsky, J. M. & Donath, M. Y. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.013> (2022).
 95. Mehta, S., Kanwar, D., Nain, P., Kaur, J. & Chauhan, S. Inflammation and

- diabetes. in *Inflammation and Chronic Disorders: The Secret Connection* 273–287 (2023). doi:10.1001/jama.2008.737.
96. Oliveira, A. G. *et al.* The role of Hepatocyte Growth Factor (HGF) in insulin resistance and diabetes. *Frontiers in Endocrinology* vol. 9 at <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00503> (2018).
 97. Bancks, M. P. *et al.* Circulating level of hepatocyte growth factor predicts incidence of type 2 diabetes mellitus: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Metabolism*. **65**, 64–72 (2016).
 98. Cuevas, S. *et al.* Abstract 098: MicroRNA Regulation of NADPH Oxidase Mediates the Antioxidant Effect of Renal Paraoxonase 2. *Hypertension* **66**, (2015).
 99. Elshemy, M. M. *et al.* Antioxidative Capacity of Liver- And Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Media and Their Applicability in Treatment of Type 2 Diabetic Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2021 at <https://doi.org/10.1155/2021/8833467> (2021).
 100. Domingues, C. C., Kundu, N., Kropotova, Y., Ahmadi, N. & Sen, S. Antioxidant-upregulated mesenchymal stem cells reduce inflammation and improve fatty liver disease in diet-induced obesity. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, (2019).
 101. Asmat, U., Abad, K. & Ismail, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* vol. 24 547–553 at <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013> (2016).
 102. Caturano, A. *et al.* Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 45 6651–6666 at <https://doi.org/10.3390/cimb45080420> (2023).
 103. Ighodaro, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 108 656–662 at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058> (2018).
 104. Zhang, P. *et al.* Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Frontiers of Medicine* vol. 14 583–600 at <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0729-1> (2020).
 105. Maharini, F. S., Sansuwito, T. Bin & Sunarti. Antioxidant Effects of Gude Bean (*Cajanus cajan*) to Homa-IR and IRS-1 of High Fat and High Fructose Diet Rats. *Int. J. Adv. Life Sci. Res.* **7**, 73–81 (2024).
 106. Gharib, E., Kouhsari, S. M. & Izad, M. Punica granatum L. Fruit aqueous extract suppresses reactive oxygen species-mediated p53/p65/miR-145 expressions followed by Elevated Levels of irs-1 in alloxan-diabetic rats. *Cell J.* **19**, 520–527 (2018).

107. Tanti, J. F. & Jager, J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 9 753–762 at <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.004> (2009).
108. Chen, Z. Y., Hu, Y. Y., Hu, X. F. & Cheng, L. X. The conditioned medium of human mesenchymal stromal cells reduces irradiation-induced damage in cardiac fibroblast cells. *J. Radiat. Res.* **59**, 555–564 (2018).
109. Su, V. Y. F., Lin, C. S., Hung, S. C. & Yang, K. Y. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ b pathway in endotoxin- induced acute lung injury. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
110. Balasubramanian, S. *et al.* Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *J. Cosmet. Dermatological Sci. Appl.* **07**, 99–117 (2017).
111. Jun, E. K. *et al.* Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 605–628 (2014).
112. Yang, M. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium improved mitochondrial function and alleviated inflammation and apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease by regulating SIRT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **546**, 74–82 (2021).
113. Yang, S. *et al.* Effect of FGF-21 on implant bone defects through hepatocyte growth factor (HGF)-mediated PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 1259–1267 (2019).
114. Lucarelli, S., Pandey, R., Judge, G. & Antonescu, C. N. Similar requirement for clathrin in EGF- and HGF- stimulated Akt phosphorylation. *Commun. Integr. Biol.* **9**, e1175696 (2016).
115. Chen, J. *et al.* USP11 potentiates HGF/AKT signaling and drives metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **43**, 123–135 (2024).
116. Lhamyani, S. *et al.* miR-21 mimic blocks obesity in mice: A novel therapeutic option. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **26**, 401–416 (2021).
117. Zhong, X. *et al.* MiR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* **56**, 663–674 (2013).
118. Yazdanpanah, Z., Kazemipour, N., Kalantar, S. M. & Vahidi Mehrjardi, M. Y. Plasma miR-21 as a potential predictor in prediabetic individuals with a positive family history of type 2 diabetes mellitus. *Physiol. Rep.* **10**, (2022).

119. Mostahfezian, M., Azhir, Z., Dehghanian, F. & Hojati, Z. Expression Pattern of microRNAs, miR-21, miR-155 and miR-338 in Patients with Type 1 Diabetes. *Arch. Med. Res.* **50**, 79–85 (2019).

