

**PENGARUH KONSENTRASI GLUKOSA MEDIUM
TERHADAP EKSPRESI GEN RIPK1 DAN MLKL
PADA *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS
(Studi Eksperimental *In-Vitro*)**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister (S-2)



Magister Ilmu Biomedik

IFRINDA GIANTARI

MBK.22.20.010315

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

TESIS

**PENGARUH KONSENTRASI GLUKOSA MEDIUM
TERHADAP EKSPRESI GEN RIPK1 DAN MLKL
PADA *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS
(Studi Eksperimental *In-Vitro*)**

disusun oleh

IFRINDA GIANTARI

MBK.22.20.010315

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 29 Juli 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. dr. H. Agung Putra,

M.Si.Med

NIDN: 0607067102

Prof. Dr. dr. Dewi Masyithoh,

DAP&E, Sp.Park

NIP: 197407302001122003

Mengetahui,

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

Dr. dr. Eko Setiawan, SpB., FINACS

NIP: 210.113.160

PERNYATAAN

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

Semarang, 30 Juli 2025

Penulis

Ifrinda Giantari



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

Nama : Ifrinda Giantari
Tempat/ tanggal lahir : Pati, 29 April 1979
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan Formal

SDN Krandan : Lulus tahun 1990
SMPN 3 Pati : Lulus tahun 1993
SMAN 1 Pati : Lulus tahun 1996
FKUB Malang : Lulus tahun 2003
PPDS1 OBGYN UGM : Lulus tahun 2011
PPDS2 KFM UGM : Lulus tahun 2019
Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2022-sekarang

C. Riwayat Keluarga

Ibu : Tutik Eka Kristiani
Ayah : Sunardi
Suami : Heru Sasongko, ST
Anak 1 : Ramansa Abdillah Fattah
Anak 2 : Rangga Satria Rahman
Anak 3 : Mohammad Rashid Hisyami

KATA PENGANTAR

Assalamu alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan judul **“PENGARUH KONSENTRASI GLUKOSA MEDIUM TERHADAP EKSPRESI GEN RIPK1 DAN MLKL PADA HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS (Studi Eksperimental *In-Vitro*)”**. Penyusunan tesis ini sebagai salah satu syarat kelulusan dalam jenjang pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Tesis ini dapat tersusun dan terselesaikan karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Ketua Dewan Penguji
3. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku Anggota Dewan Penguji
4. Prof. Dr.dr. Prasetyowati Subchan, Sp.DVE., Subsp.DKE, FINS DV, FAADV selaku Anggota Dewan Penguji
5. Dr. dr. Eko Setiawan, SpB., FINACS selaku Ketua program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
6. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med selaku Pembimbing 1
7. Prof. Dr. dr. Dewi Masyithoh, DAP&E, Sp.Park selaku pembimbing 2.
8. Kepada orang tua, suami dan anak-anak saya yang senantiasa mendukung serta mendoakan.
9. Segenap staf administrasi program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
10. Teman-teman program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. 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.

Semarang, 30 Juli 2025

Ifrinda Giantari



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
ABSTRAK.....	xiii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Orisinalitas Penelitian.....	3
1.5 Manfaat penelitian.....	7
BAB II.....	8
TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 RIPK1.....	8
2.2 MLKL	9
2.3. NEKROPTOSIS.....	10

2.4. <i>Human umbilical cord Mesenchymal Stem Cells</i>	11
2.5 Pengaruh Konsentrasi Glukosa dalam Kultur Sel	12
BAB III.....	24
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	24
3.1. Kerangka Teori.....	24
3.3. Hipotesis.....	26
BAB IV	27
METODOLOGI PENELITIAN.....	27
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	27
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian	28
4.3. Variabel dan Definisi Operasional	29
4.4. Bahan dan Materi Penelitian	29
4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja	30
4.6.7. Alur Penelitian	34
4.7. Teknik Pengumpulan Data Penelitian.....	34
4.8. Analisis Data	35
4.9 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	35
4.10. Ethical Clearance	36
BAB V.....	37

HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
Ekspresi MLKL pada hUC-MSC di Media Glukosa Tinggi	50
Perbandingan dengan Literatur (2015–2025) pada MSC dan Sel Lain (Ginjal, Jantung, Saraf).....	52
Implikasi Klinis dan Rekomendasi Ilmiah.....	63
BAB VI	66
KESIMPULAN DAN SARAN.....	66
DAFTAR PUSTAKA	67



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Orisinalitas penelitian	3
Tabel 2. Reagen rang digunakan dalam flowcytometry.....	31
Tabel 3. Hasil analisis deskriptif ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada semua kelompok.	42
Tabel 4. Hasil analisis statistik ekspresi gen RIPK1 dan MLKL antar kelompok.....	43
Tabel 5. Hasil analisis statistik ekspresi gen RIPK1 dan MLKL.....	44

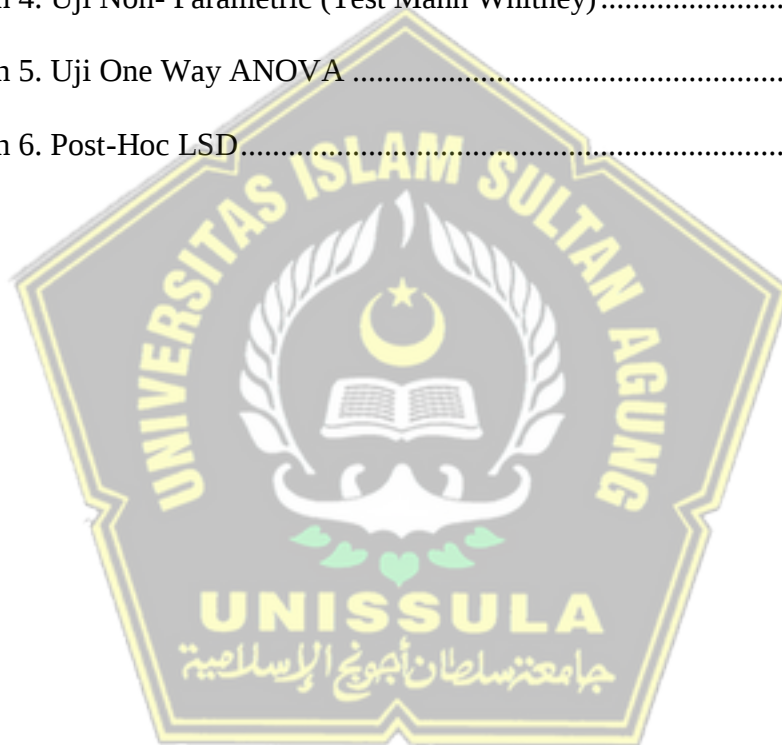


DAFTAR GAMBAR

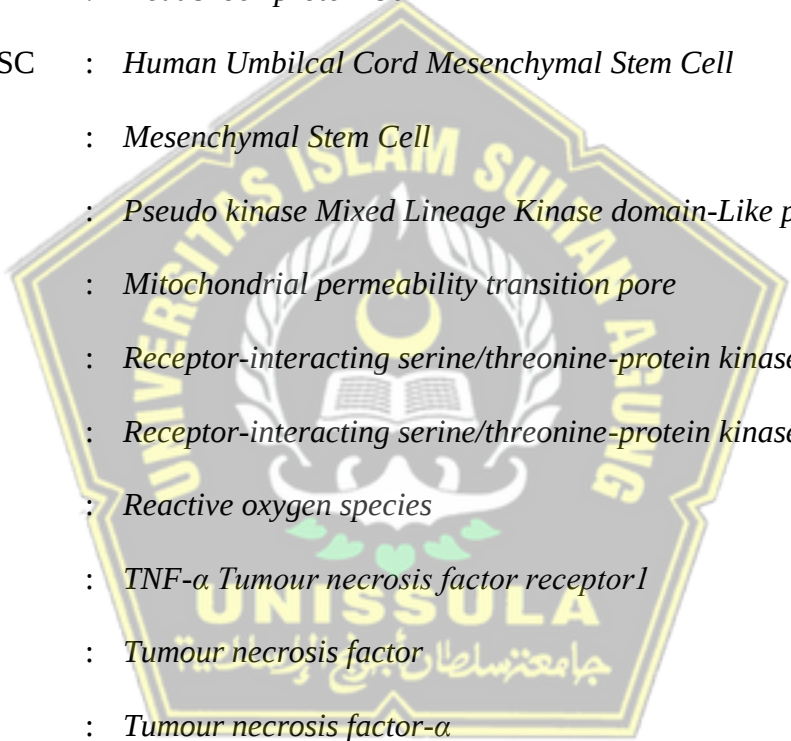
Gambar 1. Kerangka teori Penelitian	25
Gambar 2. Kerangka konsep penelitian	26
Gambar 3. Skema rancangan penelitian.....	27
Gambar 4. Alur penelitian.....	34
Gambar 5. UC-MSC Passage 7 dengan konfluensi 80%, dengan pembesaran 40x. ..	38
Gambar 6. hUC-MSC diferensiasi adipogenik, dengan pembesaran 400x.....	39
Gambar 7. hUC-MSV diferensiasi <i>osteogenik</i> dengan pembesaran 400x	40
Gambar 8. Hasil analisis flowcytometry sel hUC-MSC yang memiliki ekspresi CD90, CD44, CD105 dan CD73 yang tinggi serta ekspresi Lin yang rendah. ...	40
Gambar 9. Rerata Ekspresi gen RIPK1 pada kultur hUC-MSC pada semua kelompok. K (5,5 mM), P1 (11 mM), P2 (16,5 mM), P3 (22 mM), dan P4 (27,5 mM).	46
Gambar 10. Rerata Ekspresi gen MLKL pada kultur hUC-MSC pada semua kelompok, K (5,5 mM), P1 (11 mM), P2 (16,5 mM), P3 (22 mM), dan P4 (27,5 mM).	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Deskriptif	72
Lampiran 2. Uji Normalitas dan Homogenitas	73
Lampiran 3. Uji Non Parametric (Uji Kruskal Wallis)	74
Lampiran 4. Uji Non- Parametric (Test Mann Whitney)	75
Lampiran 5. Uji One Way ANOVA	80
Lampiran 6. Post-Hoc LSD	81



DAFTAR SINGKATAN



CamKII	: <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II</i>
DAMP	: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
FADD	: <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
HSP90	: <i>Heat shock protein 90</i>
hUC-MSC	: <i>Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MLKL	: <i>Pseudo kinase Mixed Lineage Kinase domain-Like protein</i>
MPTP	: <i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
RIPK1	: <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase-1</i>
RIPK-3	: <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase-3</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
TNFR1	: <i>TNF-α Tumour necrosis factor receptor1</i>
TNF	: <i>Tumour necrosis factor</i>
TNF- α	: <i>Tumour necrosis factor-α</i>
TRADD	: <i>Tumour necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain</i>
UC	: <i>Umbilical cord</i>

ABSTRAK

Latar Belakang: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) memiliki potensi tinggi dalam terapi regeneratif karena kemampuan diferensiasi dan proliferasinya. Namun, jumlah MSC terbatas setelah isolasi sehingga perlu ekspansi dalam kultur 2D tradisional, yang dapat menurunkan viabilitas dan fungsi sel. Pada kondisi diabetes mellitus, hiperglikemia kronis dapat mempengaruhi viabilitas dan fungsi MSC melalui aktivasi jalur nekroptosis. Jalur ini melibatkan protein utama Mixed Lineage Kinase domain-Like protein (MLKL) dan receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), yang ekspresinya diduga dipengaruhi oleh hiperglikemia, sehingga berpotensi mengganggu efektivitas terapi seluler. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi glukosa tinggi terhadap ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada UC-MSC secara *in vitro*.

Metode: Penelitian ini menggunakan desain eksperimental *Post-test Only Control Group*, dengan total 24 flask UC-MSC yang dibagi menjadi lima kelompok: satu kelompok kontrol (K; medium glukosa 5,5 mM) dan empat kelompok perlakuan dengan medium glukosa bertingkat, yaitu P1 (11 mM), P2 (16,5 mM), P3 (22 mM), dan P4 (27,5 mM). Kultur dilakukan selama 4 hari, dan ekspresi gen RIPK1 serta MLKL diukur menggunakan qRT-PCR.

Hasil: Terdapat peningkatan signifikan ekspresi gen RIPK1 mulai konsentrasi glukosa 11 mM ($p < 0,05$), sedangkan peningkatan ekspresi MLKL signifikan hanya pada 27,5 mM ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan pola aktivasi bertahap jalur necroptosis akibat paparan glukosa tinggi.

Kesimpulan: Paparan glukosa tinggi menginduksi aktivasi jalur necroptosis pada hUC-MSC melalui peningkatan ekspresi gen RIPK1 dan MLKL. Temuan ini menunjukkan bahwa hiperglikemia dapat mengganggu kelangsungan hidup MSC dan penting untuk diperhatikan dalam aplikasi terapi sel pada kondisi diabetes.

Kata kunci: glukosa tinggi, necroptosis, hUC-MSC, RIPK1, MLKL

ABSTRACT

Background: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) hold great potential in regenerative therapy due to their differentiation and proliferation capabilities. However, the number of MSCs is limited after isolation, necessitating expansion in traditional 2D culture systems, which may reduce cell viability and function. In diabetes mellitus, chronic hyperglycemia can impair MSC viability and function through activation of the necroptosis pathway. This pathway involves key proteins such as Mixed Lineage Kinase domain-Like protein (MLKL) and receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), whose expression is thought to be influenced by hyperglycemia, potentially compromising the effectiveness of cellular therapy. This Study investigate the effect of high glucose concentrations on the gene expression of RIPK1 and MLKL in cultured hUC-MSCs in vitro.

Methods: A post-test only control group design was used. hUC-MSCs were cultured for 24 hours in media containing five glucose concentrations: 5.5 mM, 11 mM, 16.5 mM, 22 mM, and 27.5 mM. mRNA expression levels of RIPK1 and MLKL were analyzed using qRT-PCR. Data were evaluated using Kruskal-Wallis, ANOVA, and post hoc tests.

Results: A significant increase in RIPK1 expression was observed starting from 11 mM glucose ($p < 0.05$), while MLKL expression increased significantly only at 27.5 mM ($p < 0.05$). These results indicate a stepwise activation of the necroptosis pathway in response to high glucose exposure.

Conclusion: High glucose exposure induces activation of the necroptosis pathway in hUC-MSCs through upregulation of RIPK1 and MLKL. This finding highlights the potential detrimental effect of hyperglycemia on MSC viability and underscores the need for protective strategies in cell-based therapies for diabetic conditions.

Keywords: high glucose, necroptosis, hUC-MSC, RIPK1, MLKL

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stem Cells terutama *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) merupakan sel non-hematopoietik yang berasal dari mesoderm dan memiliki multipotensi kuat serta sifat regeneratif yang tinggi, sehingga menjadikannya kandidat unggul dalam terapi regeneratif.(1)(2) Di antara berbagai sumber MSCs, *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUC-MSCs) menjadi salah satu sumber MSCs yang menjanjikan karena kemudahan akses, minimnya risiko etis, dan karakteristik imunomodulatornya.(3–5)

Meskipun potensi terapeutik MSCs sangat besar, keberhasilan terapi sel masih menghadapi berbagai tantangan, khususnya penurunan viabilitas dan fungsi sel selama kultur *in vitro* maupun setelah transplantasi. Kondisi hiperglikemia kronis sebagai karakteristik utama penyakit metabolik seperti diabetes mellitus telah terbukti memengaruhi berbagai jalur molekuler dan seluler dalam MSCs, sehingga pemahaman mendalam mengenai dampak hiperglikemia terhadap viabilitas dan fungsi MSCs menjadi esensial untuk meningkatkan efektifitas terapi seluler.(6)

Salah satu mekanisme kematian sel dalam konteks hiperglikemia adalah necroptosis, yaitu jalur kematian sel yang terprogram dan berperan dalam berbagai kondisi patologis, termasuk diabetes. *Mixed Lineage Kinase domain-Like protein* (MLKL) dan *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1) merupakan komponen protein kunci dalam jalur nekroptosis. Ekspresi kedua protein ini dapat dipengaruhi oleh kondisi hiperglikemia, yang berpotensi mengganggu fungsi dan viabilitas MSCs dalam terapi seluler.(7–9)

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa dalam medium kultur secara langsung berkorelasi dengan tingkat kematian MSCs, yang selanjutnya memengaruhi keberhasilan terapi dengan *Stem Cell* pada kondisi hiperglikemia. Berdasarkan hasil penelitian McCaig (2018) menyatakan bahwa pada

kondisi hiperglikemik terdapat pergeseran dominasi mekanisme kematian sel dari apoptosis menjadi nekroptosis. Pertama, peningkatan kadar glukosa menghasilkan konversi dari kematian sel yang awalnya bergantung pada caspase menjadi bergantung pada RIPK1. Hal ini dibuktikan dengan penurunan aktivitas caspases-3, -6, dan -7 (yang berperan penting untuk apoptosis), dan sebaliknya diikuti dengan meningkatnya aktivitas RIPK1 (yang merupakan inisiator nekroptosis) secara bersamaan. Kedua, ditemukan peningkatan fosforilasi RIPK-3 dan transformasi membrane MLKL, keduanya merupakan peristiwa penting dalam nekroptosis. Secara fenotipik, sel-sel yang mengalami kematian akibat TNF dalam kondisi hiperglikemik menunjukkan karakteristik nekrotik dengan penurunan karakteristik apoptosis: (1) permeabilitas membran meningkat sementara eksternalisasi fosfatidilserin menurun dan (2) ukuran sel awalnya membesar diikuti dengan penurunan ukuran yang tajam dibandingkan dengan penurunan ukuran sel yang stabil dalam kondisi glukosa normal.(10,11)

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi glukosa medium kultur (5,5; 11; 16,5; 22; dan 27,5 mM) terhadap ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada kultur hUC-MSC secara *In-Vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah konsentrasi glukosa dalam medium berpengaruh terhadap ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada hUC-MSC?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Tujuan Umum
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh medium konsentrasi glukosa tinggi dalam kultur hUC-MSC terhadap ekspresi gen RIPK1 dan MLKL sebagai penanda nekroptosis.
- 1.3.2 Tujuan Khusus
 1. Membandingkan pengaruh medium konsentrasi glukosa 5,5; 11; 16,5; 22; dan 27,5 mM dalam kultur hUC-MSC terhadap ekspresi gen RIPK1.
 2. Membandingkan pengaruh medium konsentrasi glukosa 5,5; 11; 16,5; 22; dan 27,5 mM dalam kultur hUC-MSC terhadap ekspresi gen MLKL.

1.4 Orisinalitas Penelitian

Tabel 1. Orisinalitas penelitian

No.	Penulis, tahun	Judul	Metode	Hasil
1	Zafarvahedian (2017) (12)	Effect of metformin and celecoxib on cytotoxicity and release of GDF-15 from human mesenchymal stem cells in high glucose condition	- Menggunakan hUC-MSCs yang dikultur dalam tiga kondisi kadar glukosa medium: normoglikemik (5,5 mM), mid-glycemic (sedang, 10 mM), dan hiperglikemik (25 mM). - Setelah adaptasi pada masing-masing kondisi glukosa, sel mendapat perlakuan dengan metformin (obat antidiabetes) atau celecoxib (inhibitor COX-2, obat antiinflamasi) untuk mengevaluasi pengaruhnya terhadap sel dalam lingkungan glukosa berbeda. - Kemudian dianalisis menggunakan: (1) Uji viabilitas sel (MTT assay) untuk menilai proliferasi/kelangsungan hidup sel pada berbagai kondisi; (2) Uji sitotoksitas (mengamati kematian sel, selain MTT) serta pengukuran sekresi GDF-15 (Growth Differentiation Factor-15, juga dikenal sebagai NAG-1) dari sel MSC setelah perlakuan metformin atau celecoxib. - Pengukuran GDF-15 digunakan sebagai indikator respon stres seluler atau sinyal biokimia yang dilepaskan MSC di bawah pengaruh perlakuan obat dan kadar glukosa tinggi.	- Hiperglikemia menurunkan viabilitas MSC - Pengaruh metformin tidak dipengaruhi oleh hiperglikemia - Celecoxib bersifat toksik, diperparah oleh hiperglikemia - Hiperglikemia memengaruhi pelepasan GDF-15 oleh MSCs. - Studi ini tidak secara langsung mengukur penanda jalur necroptosis, namun penurunan viabilitas sel akibat hiperglikemia yang dilaporkan mengindikasikan adanya peningkatan kematian sel terprogram.

2	Shadi Nosrati (2024) (13)	The impact of diabetic glucose concentration on viability and cardiac differentiation of mesenchymal stem cells	• MSC tulang dari tikus diisolasi dan dikultur pada berbagai konsentrasi glukosa (1–107 μM), kemudian difokuskan pada 8.5 mM sebagai model glukosa diabetik. • Uji MTT, kurva pertumbuhan, population doubling time (PDT). • Induksi diferensiasi kardiak menggunakan 5-azacytidine. • Ekspresi GATA4 dan troponin dianalisis dengan qPCR pada hari ke-3 dan ke-7.	• Viabilitas MSC menurun seiring peningkatan konsentrasi glukosa, terutama setelah 3 hari. • Pertumbuhan dan PDT pada grup glukosa tinggi lebih lambat (~1.6 kali). • Ekspresi GATA4 dan troponin menurun pada hari ke-3, namun meningkat kembali pada hari ke-7 → mengindikasikan pemulihan parsial atau efek 5-azacytidine.
Kesimpulan: Paparan glukosa diabetik menurunkan proliferasi dan kapasitas diferensiasi kardiak MSC, dan kondisi hiperglikemik sebaiknya dipertimbangkan dalam penerapan klinis terapi sel pada pasien kardiovaskular.				
3	Shih-Yu Lee (2025) (14)	The investigation of effects, signal pathways, and applications of high glucose on dental pulp stem cells	• DPSCs dikultur pada kadar glukosa 5.5, 11, 22, 33, dan 55 mM selama 96 jam. • Uji viabilitas: CCK-8. • Western blot: apoptosis (cleaved caspase-3, PARP), autophagy (LC3B-II/I, ATG12-ATG5, p62), dan protein diferensiasi. • Flow cytometry untuk analisis imunofenotip MSC. • Uji diferensiasi osteogenik (Alizarin red), adipogenik (Oil red-O), dan neurogenik	• Viabilitas menurun signifikan pada 33 mM dan 55 mM. • Ekspresi cleaved caspase-3, cleaved PARP, dan LC3B-II/I meningkat → apoptosis dan autophagy meningkat. • Imunofenotip MSC (CD44, CD73, CD90 positif) tidak berubah oleh glukosa tinggi. • Pretreatment dengan 33 mM glukosa meningkatkan diferensiasi

		(morfologi + western blot).	osteogenik (↑ DMP-1), adipogenik (↑ PPAR γ), dan neurogenik (↑ NeuN, GFAP, MAP2) dibanding kontrol.
			Kesimpulan: Meskipun glukosa tinggi menurunkan viabilitas dan menginduksi apoptosis pada DPSCs, preeksposur HG meningkatkan potensi diferensiasi ke arah osteo-, adipo-, dan neurogenik, menunjukkan efek kompleks dari glukosa terhadap DPSCs.
4	Khasawneh (2024) (15)	<i>Addressing the impact of high glucose microenvironment on the immunosuppressive characteristics of human mesenchymal stem cells</i> - Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) dikultur dalam kondisi glukosa normal (5,5 mM) vs glukosa tinggi (sekitar 25–30 mM) untuk meniru kondisi hiperglikemik. - Kemudian diukur aspek Immunomodulasinya: Mengukur ekspresi dan sekresi faktor imunomodulator seperti IDO, IL-10, dan complement factor H (CFH). - Aktivitas immunoproteasome sebagai indikator stimulasi inflamasi seluler. - Cari pathway metabolik: Mengevaluasi protein seperti AMPK dan PFK-1 (regulator utama glikolisis).	- hAD-MSCs yang dikultur dalam glukosa tinggi hilang kemampuan menekan aktivitas sel imun, menunjukkan peningkatan sensitivitas terhadap pengenalan oleh sistem imun. - Terdapat penurunan signifikan dalam kadar IDO, IL-10, dan CFH — protein yang berperan penting dalam fungsi anti-inflamasi MSC. - Aktivitas immunoproteasome secara nilai yang jauh meningkat pada sel dalam kondisi glukosa tinggi, menunjukkan peningkatan respons inflamasi. - Terjadi penurunan ekspresi AMPK

					dan PFK-1, mengindikasikan gangguan homeostasis energi dan penurunan efisiensi glikolisis dalam kondisi hiperglikemi
5	Ejlal Abu-El-Rub (2023) (16)	Human mesenchymal stem cells exhibit altered mitochondrial dynamics and poor survival in high glucose microenvironment	- Sel hAD-MSC dikultur dalam media glukosa rendah (5.6 mM) dan tinggi (25 mM) selama 3, 7, dan 14 hari. - Uji viabilitas: LDH assay dan Trypan blue exclusion. - Disfungsi mitokondria: TMRE untuk potensi membran mitokondria, rasio NAD⁺/NADH. - Apoptosis: Annexin V assay. - Western blot untuk PI3K, TSC1, mTOR, dan kompleks mitokondria (I, IV, V).	- Glukosa tinggi menurunkan viabilitas MSC secara signifikan (↑ LDH, ↓ Trypan blue). - Menyebabkan penurunan TMRE dan rasio NAD⁺/NADH → menunjukkan disfungsi mitokondria. - Menurunkan ekspresi PI3K dan mTOR, serta meningkatkan TSC1 → mengindikasikan gangguan pada jalur PI3K/mTOR. - Kompleks mitokondria I, IV, dan V menurun secara bermakna. - Peningkatan apoptosis terjadi akibat disfungsi mitokondria.	
Kesimpulan: Hiperglikemia menyebabkan disfungsi mitokondria dan menurunkan survival hAD-MSC melalui gangguan pada jalur PI3K/mTOR dan aktivasi apoptosis.					

1.5 Manfaat penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi pada pemahaman kita tentang nekroptosis pada hUC-MSC terkait dengan konsentrasi glukosa dalam medium kultur.

1.5.2 Manfaat Praktis

- Hasil penelitian ini dapat memberikan wawasan baru dalam memahami jalur kematian hUC-MSC.
- Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk pengembangan strategi kultur yang optimal dalam aplikasi terapi regeneratif.
- Penelitian ini akan melengkapi pemahaman kita tentang kondisi lingkungan yang memengaruhi kelangsungan hidup dan fungsi hUC-MSC, serta dapat membuka jalan untuk pengembangan terapi regeneratif yang lebih efektif.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 RIPK1

RIPK1 (*Receptor-interacting protein kinase-1*) adalah pengatur utama kematian sel dan peradangan, terutama terlibat dalam pengaturan necroptosis.(17) Nekroptosis adalah jalur kematian sel terprogram yang diaktifkan sebagai respons terhadap berbagai rangsangan, seperti TNF, Fas, atau stres genotoksik. Ini dimediasi oleh kompleks yang disebut nekrosom, yang berisi RIPK1, RIPK-3, dan MLKL.(21, 23, 24) RIPK1 sangat penting untuk memulai nekroptosis, karena mengaktifkan RIPK-3 dan memfosforilasi MLKL, menyebabkan gangguan membran sel dan akhirnya menyebabkan kematian sel nekroptotik. RIPK1 juga meningkatkan respons inflamasi melalui kematian sel nekroptotik dan inflamasi yang tidak bergantung pada kematian sel, karena RIPK1 mengaktifkan RIPK-3 dan menginduksi produksi sitokin proinflamasi.(21–23)

Nekroptosis yang dimediasi RIPK1/RIPK-3 adalah bentuk kematian sel terprogram yang memainkan peran penting dalam berbagai proses biologis, termasuk peradangan, respon imun, perkembangan embrio, dan kelainan metabolisme. Nekroptosis adalah proses teregulasi yang melibatkan aktivasi RIPK1 dan RIPK-3, yang kemudian memfosforilasi dan oligomerisasi MLKL, yang menyebabkan gangguan membran sel dan pada akhirnya mengakibatkan nekrosis terprogram. Nekroptosis dapat disebabkan oleh rangsangan yang berbeda, seperti TNF, Fas, dan stres genotoksik, dan terlibat dalam berbagai penyakit manusia, termasuk cedera otak

iskemik, gangguan sistem kekebalan, dan kanker. Menargetkan dan menghambat nekroptosis berpotensi digunakan untuk tujuan terapeutik, karena dapat meringankan gejala dan memperpanjang hidup pasien yang menderita penyakit ini.(10,24)

2.2 MLKL

Mixed Lineage Kinase domain-Like (MLKL) adalah protein yang menjadi komponen penting dalam proses nekroptosis, suatu bentuk kematian sel terprogram. MLKL telah diidentifikasi sebagai mediator penting dalam pelaksanaan nekroptosis, khususnya sebagai respons terhadap rangsangan seperti faktor nekrosis tumor (TNF).(25) Penelitian telah menunjukkan bahwa MLKL memainkan peran penting dalam nekroptosis dengan melakukan translokasi ke membran plasma dan menyebabkan pecahnya membran, yang penting untuk perkembangan kematian sel nekroptotik.(26) Selain itu, MLKL diketahui membentuk polimer mirip amiloid yang bergantung pada ikatan disulfida, sehingga besar perannya dalam menginduksi nekroptosis melalui mekanisme molekuler yang kompleks.(21)

Penelitian juga menunjukkan bahwa keberadaan MLKL dapat mengatur cedera jaringan yang disebabkan oleh nekroptosis dan pembersihan patogen, yang menggarisbawahi pentingnya modifikasi pasca-translasi dalam memodulasi kematian sel nekroptotik.(27) Selain itu, oligomerisasi MLKL sangat penting untuk fungsi saluran kation selama nekroptosis, yang selanjutnya menekankan pentingnya MLKL dalam proses seluler yang menyebabkan kematian sel nekroptotik.(20)

Selain itu, penelitian menunjukkan bahwa MLKL dapat diatur oleh berbagai faktor seperti HSP90, yang memodulasi stabilitas MLKL dan diperlukan untuk nekroptosis yang diinduksi TNF. Hal ini berkaitan dengan regulasi aktivitas MLKL dan keterlibatannya dalam jalur nekroptotik. Selain itu, MLKL telah terlibat dalam berbagai penyakit dan kondisi, termasuk osteoporosis, dimana penargetan MLKL telah diusulkan sebagai strategi potensial untuk mencegah patologi terkait tulang.

MLKL adalah pemain kunci dalam jalur nekroptosis, dengan aktivasi dan regulasinya sangat penting untuk pelaksanaan kematian sel nekroptotik. Memahami mekanisme molekuler dan faktor yang mengatur fungsi MLKL sangat penting untuk mengungkap kompleksitas nekroptosis dan implikasinya dalam konteks fisiologis dan patologis yang berbeda.

2.3. NEKROPTOSIS

Nekroptosis adalah bentuk kematian sel terprogram yang menggabungkan ciri-ciri apoptosis dan nekrosis. Nekroptosis adalah proses yang diatur yang melibatkan aktivasi RIPK1 dan mediator hilirnya, MLKL, yang mengarah pada permeabilisasi membran plasma dan organel, menyebabkan pelepasan pola molekuler terkait kerusakan (*Damage-associated molecular patterns*, DAMP) dan sinyal proinflamasi. Nekroptosis disebabkan oleh berbagai rangsangan, termasuk aktivasi reseptor seluler yang terlibat sebagai reseptor kematian seperti *Toll-like receptor* (TLR4 dan TLR3),

serta adanya IFN dan TNF α . Nekroptosis terlibat dalam berbagai penyakit, termasuk penyakit neurodegeneratif, penyakit inflamasi, dan kanker.(18,19,22)

2.4. *Human umbilical cord Mesenchymal Stem Cells*

Human umbilical cord Mesenchymal Stem Cells (hUC-MSCs) atau Sel punca mesenkim tali pusat manusia adalah sumber sel punca mesenkim yang menjanjikan dan telah menunjukkan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tiga lapisan germinal, melakukan perbaikan jaringan yang rusak, dan memodulasi respon imun. hUC-MSC berasal dari tali pusat manusia, yang berisi dua arteri umbilikalis dan satu vena umbilikalis, keduanya tertanam dalam jaringan ikat mukosa yang dikenal sebagai Wharton jelly. Penggunaan hUC-MSC bersifat non-invasif dan tidak menimbulkan masalah etika, menjadikannya pilihan yang menarik untuk aplikasi pengobatan regeneratif dan imunoterapi. hUC-MSC dapat berdiferensiasi menjadi adiposit, osteosit, kondrosit, neuron, dan hepatosit, serta memiliki sifat imunomodulator. *Umbilical cord*/ tali pusat selama ini dianggap sebagai limbah medis, dan akses terhadapnya tidak dibebani dengan masalah etika. hUC-MSC dapat diisolasi dari berbagai kompartemen tali pusat, seperti Wharton jelly, vena, arteri, membran pelapis *Umbilical cord* (UC), serta daerah subamnion dan perivascular.(28,29)

2.5 Pengaruh Konsentrasi Glukosa dalam Kultur Sel

Konsentrasi glukosa tinggi dalam kultur sel, seperti dalam kondisi hiperglikemia, dapat mempengaruhi nekroptosissel melalui beberapa mekanisme:

Stres Oksidatif

Glukosa tinggi dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS), yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA, protein, dan lipid. ROS yang berlebihan dapat mengaktifkan jalur sinyal yang memicu necroptosis.(3,30–32)

Aktivasi Receptor Interacting Protein (RIP) Kinase

Glukosa tinggi dapat menginduksi aktivasi protein kinase RIP1 dan RIP3. RIP1 dan RIP3 adalah kunci dalam jalur necroptosis, dan aktivasi mereka dapat menyebabkan fosforilasi dan oligomerisasi protein *Mixed Lineage Kinase domain-Like* (MLKL), yang akhirnya mengarah pada necroptosis.(8,33,34)

Disfungsi Mitokondria

Hiperglikemia dapat menyebabkan disfungsi mitokondria, termasuk hilangnya potensial membran mitokondria dan pelepasan faktor pro-apoptotik. Disfungsi ini dapat memicu sinyal nekroptosissel dan meningkatkan sensitivitas sel terhadap kematian sel yang terprogram.(3,35–37)

Inflamasi

Konsentrasi glukosa tinggi dapat memicu respon inflamasi melalui aktivasi jalur NF- κ B dan produksi sitokin pro-inflamasi. Sitokin seperti TNF- α dan IL-1 β dapat menginduksi nekroptosis dengan mengaktifkan RIP1 dan RIP3.(8)

Disregulasi Metabolisme

Glukosa tinggi mengganggu metabolisme seluler dan dapat menyebabkan akumulasi metabolit beracun seperti sorbitol dan *advanced glycation end products* (AGEs). Metabolit ini dapat merusak struktur sel dan memicu nekroptosis.(38)

Secara keseluruhan, konsentrasi glukosa tinggi dalam kultur sel dapat memicu nekroptosis melalui kombinasi mekanisme peningkatan stres oksidatif, aktivasi jalur sinyal nekroptosis, disfungsi mitokondria, inflamasi dan disregulasi metabolisme.

Keterkaitan Nekroptosis dengan Jalur Molekuler Lain pada Stres Glukosa Tinggi

Hiperglikemia tidak hanya mengaktifkan nekroptosis secara terisolasi, tetapi juga mempengaruhi jalur-jalur molekuler lain yang saling berhubungan. Berikut pembahasan peran ROS, PI3K/Akt/mTOR, TGF- β 1/PKC, dan AMPK/mitofagi dalam konteks glukosa tinggi dan hubungannya dengan nekroptosis.

Stres Oksidatif (ROS) dan Nekroptosis dalam Hiperglikemia

Reactive oxygen species (ROS) meningkat tajam pada kondisi hiperglikemia karena metabolisme glukosa yang berlebihan dan aktivasi enzimatis tertentu (misal,

jalur poliol, *protein kinase C*-NADPH oxidase). Peningkatan ROS merupakan penanda stres oksidatif yang dapat merusak DNA, protein, dan membran sel (39,40). Dalam konteks nekroptosis, ROS berperan ganda: sebab dan akibat. Paparan glukosa tinggi terbukti menyebabkan produksi ROS yang memicu nekroptosis, dan aktivasi nekroptosis sendiri dapat memperparah produksi ROS, membentuk *feedback loop* yang merusak. Sebuah studi *in vivo* dan *in vitro* pada model diabetes ginjal menunjukkan bahwa nekroptosis pada tubulus ginjal akibat glukosa tinggi sebagian bergantung pada level ROS, dan ROS tersebut turut memperkuat sinyal RIPK1/RIPK3 melalui umpan balik positif. Dengan kata lain, hiperglikemia dapat membuat sel berada dalam lingkaran setan: ROS tinggi mengaktifkan nekroptosis, lalu nekroptosis meningkatkan stres oksidatif lebih lanjut.

Pada hUC-MSK kita, sangat mungkin skenario serupa terjadi. Kenaikan ekspresi RIPK1/MLKL menandakan sel menuju nekroptosis; proses ini diketahui melibatkan kerusakan mitokondria dan kebocoran elektron rantai transport yang kian menghasilkan ROS. Sebaliknya, ROS yang terakumulasi (misal ditunjukkan dengan kultur glukosa tinggi) bisa langsung mengaktifasi kompleks necrosome melalui oksidasi protein kunci. LaRocca *et al.* (2023) melaporkan bahwa hiperglikemia menggeser keseimbangan dari apoptosis ke nekroptosis tergantung pada RIPK1 dan ROS mitokondria (10). Pemberian antioksidan *N-acetylcysteine* (NAC) dapat menghambat migrasi faktor-faktor nekroptosis ke mitokondria dan menurunkan kematian sel pada glukosa tinggi. Senada dengan itu, pada model *diabetic kidney disease*, NAC menurunkan aktivasi RIPK1/RIPK3/MLKL, mengurangi nekroptosis

dan stres oksidatif di ginjal, serta melindungi fungsi ginjal. Fakta ini menegaskan bahwa stres oksidatif adalah pemicu utama jalur nekroptosis di bawah hiperglikemia, sekaligus target intervensi potensial (10).

Di samping memicu nekroptosis, ROS juga memengaruhi jenis kematian sel lain. Sebagai contoh, ROS akibat glukosa tinggi dapat mengaktifkan inflammasome NLRP3 yang memicu pyroptosis (kematian sel pro-inflamasi), dan juga mengoksidasi CaMKII sehingga membuka *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) yang terkait nekroptosis pada kardiomyosit (41–43). ROS yang dihasilkan melalui jalur PKC-NADPH oxidase di hiperglikemia diketahui menyebabkan apoptosis β -sel pankreas dan disfungsi endotel. Ini mengindikasikan ROS sebagai *cross-talk* node di antara berbagai mode kematian sel. Namun uniknya, nekroptosis berbeda dari apoptosis karena menimbulkan dampak pro-inflamasi (melepas DAMPs saat sel lisis). Oleh karenanya, ROS yang memicu nekroptosis akan memperburuk peradangan jaringan (misal pada ginjal diabetik ditemukan pelepasan sitokin proinflamasi yang meningkat seiring nekroptosis tubulus).

Singkatnya, hiperglikemia memicu stres oksidatif tinggi yang mendorong sel MSC menuju nekroptosis, dan nekroptosis yang terjadi makin memperburuk keadaan oksidatif. Intervensi antioksidan berpotensi memutus siklus ini, seperti ditunjukkan pada model ginjal diabetik (NAC melindungi ginjal dengan mengurangi ROS dan nekroptosis). Bagi terapi berbasis MSC ke depannya, mungkin diperlukan kondisi kultur dengan antioksidan atau rekayasa sel anti-oksidatif agar MSC tidak mudah mengalami nekroptosis dalam lingkungan hiperglikemia.

Jalur PI3K/Akt/mTOR pada Hiperglikemia

PI3K/Akt/mTOR merupakan jalur isyarat sentral yang mengatur pertumbuhan, metabolisme, dan kelangsungan hidup sel (44). Di bawah kondisi normal, aktivasi *Akt* mendorong *survival* dan pertumbuhan sel (misal via meningkatkan sintesis protein melalui mTOR, dan menghambat apoptosis). Hiperglikemia diketahui dapat mengganggu keseimbangan jalur ini. Beragam penelitian menunjukkan bahwa glukosa tinggi dapat mengaktifkan PI3K/Akt secara aberrant di berbagai tipe sel, yang berkontribusi pada patologi diabetes. Contohnya, pada *podocyte* ginjal, sel otot polos vaskular, sel endotel, hingga sel kanker pankreas, paparan glukosa tinggi mengaktifkan sinyal PI3K/Akt. Akibatnya, terjadi peningkatan ekspresi protein matriks (fibronectin, kolagen IV, laminin) melalui jalur ini, berkontribusi terhadap fibrosis seperti dalam retinopati diabetik. Jalur PI3K/Akt juga diperlukan untuk regulasi metabolik oleh insulin; hiperglikemia kronis dapat menyebabkan disfungsi sinyal insulin (insulin resistance) sehingga mengganggu aktivasi Akt yang normal.

Keterkaitan jalur PI3K/Akt dengan nekroptosis cukup kompleks. Di satu sisi, Akt biasanya dianggap pro-survival sehingga aktifnya dapat menekan kematian sel. Namun, studi terbaru mengungkap sisi lain: PI3K ternyata esensial bagi nekroptosis yang diinduksi TNF- α . Liu *et al.* (2019) menemukan bahwa PI3K berperan sebagai mitra RIPK3 untuk menginisiasi aktivasi kompleks RIPK1-RIPK3-MLKL. Artinya, meskipun Akt downstream sering bersifat anti-apoptosis, komponen upstream PI3K dapat membantu perakitan *necrosome*. Salah satu mekanisme yang diusulkan adalah produk PI3K (fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfat) mungkin merekrut protein tertentu ke

membran dalam platform kompleks nekroptosis. Implikasi ini menarik: hiperglikemia yang mengaktivasi PI3K/Akt mungkin secara tak langsung mempermudah nekroptosis ketika ada trigger (seperti TNF- α).

Pada MSC dan banyak sel lain, sinyal insulin/IGF-1 melalui PI3K-Akt sering terganggu pada diabetes kronis, sehingga survival pathway menurun. Memang, terdapat laporan bahwa hiperglikemia jangka panjang menurunkan aktivasi Akt di sel endotel, berujung penurunan proliferasi dan meningkatkan apoptosis. Hal serupa dilihat pada MSC: Paparan glukosa tinggi menghambat jalur Akt-SIRT1-Twist1, yang penting untuk kelangsungan hidup dan sifat stemness, sehingga MSC lebih rentan mengalami apoptosis dan berubah diferensiasi. Jadi, tergantung konteks waktu dan jenis sel, hiperglikemia awalnya bisa mengaktivasi berlebih Akt (menyebabkan respons metabolik/patologis), namun lama kelamaan menyebabkan disfungsi Akt (karena feedback negatif, resistensi insulin, dll). Disfungsi ini berarti hilangnya sinyal pro-hayat, membuat sel lebih rentan ke jalur kematian (nekroptosis/apoptosis). Selain itu, Akt berhubungan erat dengan mTOR dan autofagi. Akt mengaktifkan mTORC1 yang dapat menghambat autofagi. Pada kondisi kaya nutrisi (glukosa tinggi), mTOR aktif dan autofagi ditekan, yang biasanya akan meningkatkan kerentanan sel terhadap stres (karena kurangnya pembersihan organel rusak). Namun, seperti diuraikan di bagian berikut, kasus MSC dalam hiperglikemia menunjukkan *respons autofagi yang kompleks*. Jika autophagy terganggu, sel dapat condong ke nekroptosis karena penumpukan kerusakan (misal mitokondria rusak memicu sinyal kematian).

Singkatnya, jalur PI3K/Akt/mTOR di bawah hiperglikemia berperan ganda. Aktivasi awalnya berkontribusi pada patologi (fibrosis, hipertrofi sel) dan mungkin mendukung pembentukan platform nekroptosis. Namun disfungsi akhirnya justru melemahkan sinyal survival sel, memperbesar peluang terjadinya nekroptosis maupun apoptosis pada MSC. Oleh karena itu, menjaga regulasi tepat PI3K/Akt bisa penting. Sebagai contoh, *exercise* atau *AMPK activation* (kebalikan dari mTOR) diketahui meningkatkan sensitivitas insulin dan menormalkan Akt, yang mungkin melindungi sel dari kematian berlebihan. Intervensi farmakologis seperti insulin sensitizers atau *growth factor* mungkin membantu MSC bertahan di lingkungan glukosa tinggi dengan mempertahankan sinyal Akt pro-kehidupan.

Aktivasi TGF- β 1/PKC pada Kondisi Hiperglikemia

Hiperglikemia kronis diketahui mengaktifkan jalur TGF- β 1 dan protein kinase C (PKC), terutama dalam konteks komplikasi diabetik (nefropati, retinopati, kardiomiopati diabetik). TGF- β 1 adalah sitokin pro-fibrotik yang meningkat pada hiperglikemia dan memicu deposisi matriks ekstraseluler berlebihan (menyebabkan fibrosis ginjal, penebalan membran basement retina, dll). Sedangkan PKC (terutama isoform PKC- β dan δ) diaktifkan oleh peningkatan diasilgliserol (DAG) akibat glukosa tinggi. PKC kemudian memfosforilasi banyak target, termasuk *NADPH oxidase*, menyebabkan produksi ROS vaskular, disfungsi endotel, dan peradangan.

Walau TGF- β 1 utamanya dikenal dalam fibrogenesis, jalur ini berpotensi beririsan dengan jalur kematian sel. TGF- β 1 mengaktifasi *kinase* hilir (seperti TAK1,

p38 MAPK) yang dapat memodulasi respons sel terhadap stres. Menariknya, TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) adalah molekul kunci: dalam kondisi normal TAK1 membantu aktivasi NF- κ B (survival), tapi jika TAK1 terhambat, sel cenderung masuk nekroptosis. Beberapa studi menunjukkan inhibisi TAK1 bersamaan stimulasi TNF dapat memicu nekroptosis massif karena sinyal pro-survival hilang. Mengingat TGF- β 1 mengaktifkan TAK1 di banyak jaringan fibrotik, ada kemungkinan hiperaktivasi TGF- β 1 kronis membuat sel berada pada “edge”: di satu sisi mendorong fibrotik dan henti siklus (TGF- β 1 bisa menyebabkan senescence), di sisi lain bila sinyal ini disertai stres lain (inflamasi), sel bisa kolaps ke nekroptosis atau apoptosis.

PKC berperan nyata dalam memediasi glucotoxicity. Seperti disinggung, PKC mengaktifkan NADPH oksidase sehingga menghasilkan ROS tinggi. ROS ini lalu memicu kerusakan sel dan berbagai mode kematian (apoptosis di sel β pankreas, nekroptosis di ginjal/jantung, dll). Selain itu, PKC dapat mempengaruhi *blood flow* mikrovaskular dan menyebabkan hipoksia relatif, memperparah cedera sel. Pada MSC, jika PKC aktif abnormal, sel bisa menerima sinyal berbeda: misalnya PKC- δ diketahui pro-apoptosis pada banyak sel. Belum ada bukti langsung PKC memicu nekroptosis, tapi *downstream* efeknya (ROS dan inflamasi) jelas dapat menginduksi nekroptosis.

Dalam MSC kultur kita, kemungkinan TGF- β 1 meningkat akibat autokrin di media tinggi glukosa (beberapa sel stres mengeluarkan TGF- β 1). TGF- β 1 kemudian bisa menghambat proliferasi MSC dan mendorong diferensiasi fibroblastik, mengurangi sifat stemness. Hal ini sejalan dengan temuan bahwa hiperglikemia mempercepat penuaan (senescence) MSC, dan TGF- β 1 adalah salah satu inducer

senescence. Senescence sel sendiri bukan kematian, tapi sel senesens mengeluarkan *SASP* (senescence-associated secretory phenotype) termasuk TGF- β 1, IL-6, dll, yang menciptakan lingkungan inflamasi. Inflamasi ini (IL-6, TNF- α) lantas dapat memicu nekroptosis di sel-sel sekitar. Jadi ada hubungan tidak langsung: hiperglikemia via TGF- β 1 mendorong senescence/fibrosis, lalu inflamasi sekunder mendorong nekroptosis di sel punca yang tersisa.

Sebaliknya, jika MSC masuk nekroptosis, ia akan melepas isi imunogenik (DAMPs) yang memicu lebih banyak TGF- β 1 dari sel imun sebagai respons penyembuhan luka. Ironisnya, hal ini bisa memperburuk fibrosis (misal di jantung atau ginjal). Contohnya, pada gagal jantung diabetik, nekroptosis kardiomyosit akan memicu fibroblas mengaktivasi TGF- β , akhirnya jantung kaku. Jadi siklus saling pengaruh terjadi: hiperglikemia $\rightarrow$ PKC/ROS + TGF- β 1 $\rightarrow$ kerusakan sel & fibrosis $\rightarrow$ nekroptosis $\rightarrow$ inflamasi $\rightarrow$ fibrosis lanjut.

Dari sisi intervensi, penghambatan PKC telah lama diujicoba (misal ruboxistaurin untuk retinopati diabetik), namun efeknya terbatas. Menghambat TGF- β secara langsung berisiko karena perannya penting di banyak fungsi. Tetapi memahami bahwa TGF- β 1/PKC adalah jalur hulu dari stres hiperglikemia memberi petunjuk: kombinasi terapi anti-fibrotik dan anti-nekroptosis mungkin sinergis mencegah kerusakan organ. Misalnya, inhibitor PKC- β + necrostatin-1 mungkin mencegah baik kerusakan vaskular maupun kematian sel tubulus pada nefropati diabetik. Ini area yang patut diteliti lebih lanjut.

Peran AMPK dan Mitofagi dalam Hiperglikemia

AMPK (AMP-activated protein kinase) adalah sensor energi seluler yang diaktifkan saat level ATP rendah (misal saat puasa, hipoksia, olahraga). AMPK mendorong mekanisme penghematan energi: meningkatkan autofagi (termasuk *mitophagy*) dan menghambat mTOR serta biosintesis yang boros energi. Dalam kondisi hiperglikemia, sel berada pada keadaan surplus energi sehingga AMPK cenderung tidak aktif. Konsekuensinya, *autophagic clearance* menurun, yang dapat menyebabkan penumpukan mitokondria rusak dan agregat protein. Ironisnya, hiperglikemia juga bisa menyebabkan stres oksidatif yang *seharusnya* memicu autofagi sebagai respons protektif. Beberapa laporan menunjukkan hasil beragam: glukosa tinggi dapat *menekan autofagi melalui inaktivasi AMPK*, namun di sisi lain oksidatif stress berlebih dapat memicu autofagi sebagai respon darurat. Pada MSC, Chang *et al.* (2015) menemukan hiperglikemia justru meningkatkan autofagi (LC3-II, Beclin1) dan hal ini berhubungan dengan penuaan dini sel; menghambat autofagi mencegah senescence tapi malah meningkatkan apoptosis. Mereka juga mendapati bahwa peningkatan autofagi itu dimediasi oleh ROS, karena antioksidan NAC dan inhibitor NADPH oxidase (DPI) mampu mencegah induksi autofagi dan senescence oleh glukosa tinggi. Ini menunjukkan autofagi dapat bersifat pedang bermata dua di bawah stres metabolik: kadang melindungi sel, tapi kadang berlebihan dan berkontribusi pada *cell fate* negatif (senescence).

Terkait *mitophagy* (autofagi mitokondria), fungsinya adalah membuang mitokondria yang disfungsi. Hiperglikemia bisa mengganggu jalur *PINK1-Parkin*,

sehingga mitokondria rusak tidak dibersihkan optimal. Akibatnya, mitokondria cacat menumpuk dan bocor ROS, memicu apoptosis atau nekroptosis. Studi pada sel NP disc menunjukkan hiperglikemia mengganggu mitophagy sehingga meningkatkan apoptosis. Dalam konteks nekroptosis, mitophagy yang gagal berarti sinyal kerusakan mitokondria (seperti *PGAM5*, *cytochrome c*, ROS) bisa berakumulasi dan mengaktifkan mesin nekroptosis. MDPI LaRocca *et al.* (2023) melaporkan bahwa migrasi RIPK1/MLKL ke mitokondria pada hiperglikemia menyebabkan hilangnya potensial membran mito dan pelepasan *cytochrome c*. Jika mitophagy berjalan baik, seharusnya mitokondria yang mengalami porasi semacam itu segera dibuang sebelum mencederai sel. Jadi, mitophagy insufisien memperparah efek nekroptosis.

Aktivasi AMPK dapat membalik beberapa efek buruk di atas. Aktivator AMPK (misal AICAR, A-769662, metformin) terbukti melindungi sel dari nekroptosis yang diinduksi berbagai injuri. Zeng *et al.* (2018) menunjukkan AMPK yang aktif akan berinteraksi dengan kompleks *Keap1-PGAM5* dan memfasilitasi degradasi *PGAM5* (protein mitokondria yang berperan dalam nekroptosis). Dengan kata lain, AMPK mencegah nekroptosis dengan mempercepat pembuangan komponen pro-necroptosis di mitokondria. Metformin – obat antidiabetik yang mengaktifkan AMPK – dalam riset tersebut mampu mengurangi nekroptosis dan melindungi jantung dari cedera iskemia-reperfusi. Relevan dengan temuan kita, metformin juga diuji pada kardiomyosit dalam glukosa tinggi: ternyata metformin (500 μ M) secara signifikan menurunkan fosforilasi RIPK3 dan MLKL, mengurangi pelepasan LDH dan jumlah sel mati pada kultur high glucose. Ini paralel dengan empagliflozin (inhibitor SGLT2), yang juga menurunkan

aktivasi RIPK3/MLKL dan kematian sel pada kardiomyosit hiperglikemik. Kedua agen tersebut diketahui mengaktifkan AMPK (metformin langsung, empagliflozin melalui mekanisme sekunder peningkatan keton/hipokalori), sehingga mendukung peran protektif AMPK.

Bagi MSC, hal ini mengisyaratkan strategi potensial: meningkatkan aktivitas AMPK atau *mitophagy* dapat melindungi MSC dari dampak merusak glukosa tinggi. Sebaliknya, lingkungan hiperglikemia yang kurang aktivasi AMPK membuat MSC rentan. Sebagai rekomendasi, dapat dipertimbangkan perlakuan *preconditioning* MSC dengan aktivator AMPK (seperti metformin dosis aman atau AICAR) sebelum ditransplantasi ke pasien diabetes, guna mengurangi kemungkinan MSC mengalami nekroptosis di tubuh pasien. Selain itu, modulasi autofagi perlu seimbang – terlalu sedikit berbahaya, terlalu berlebihan juga tidak diinginkan (karena bisa mendorong senescence seperti studi Chang et al.). Kombinasi antioksidan untuk menekan *ROS-triggered autophagy* berlebihan mungkin diperlukan. Intinya, mengembalikan homeostasis energi sel (melalui AMPK) dan memastikan pembuangan mitokondria rusak (*mitophagy*) merupakan kunci mencegah aktivasi jalur kematian nekroptosis pada MSC di kondisi hiperglikemia.

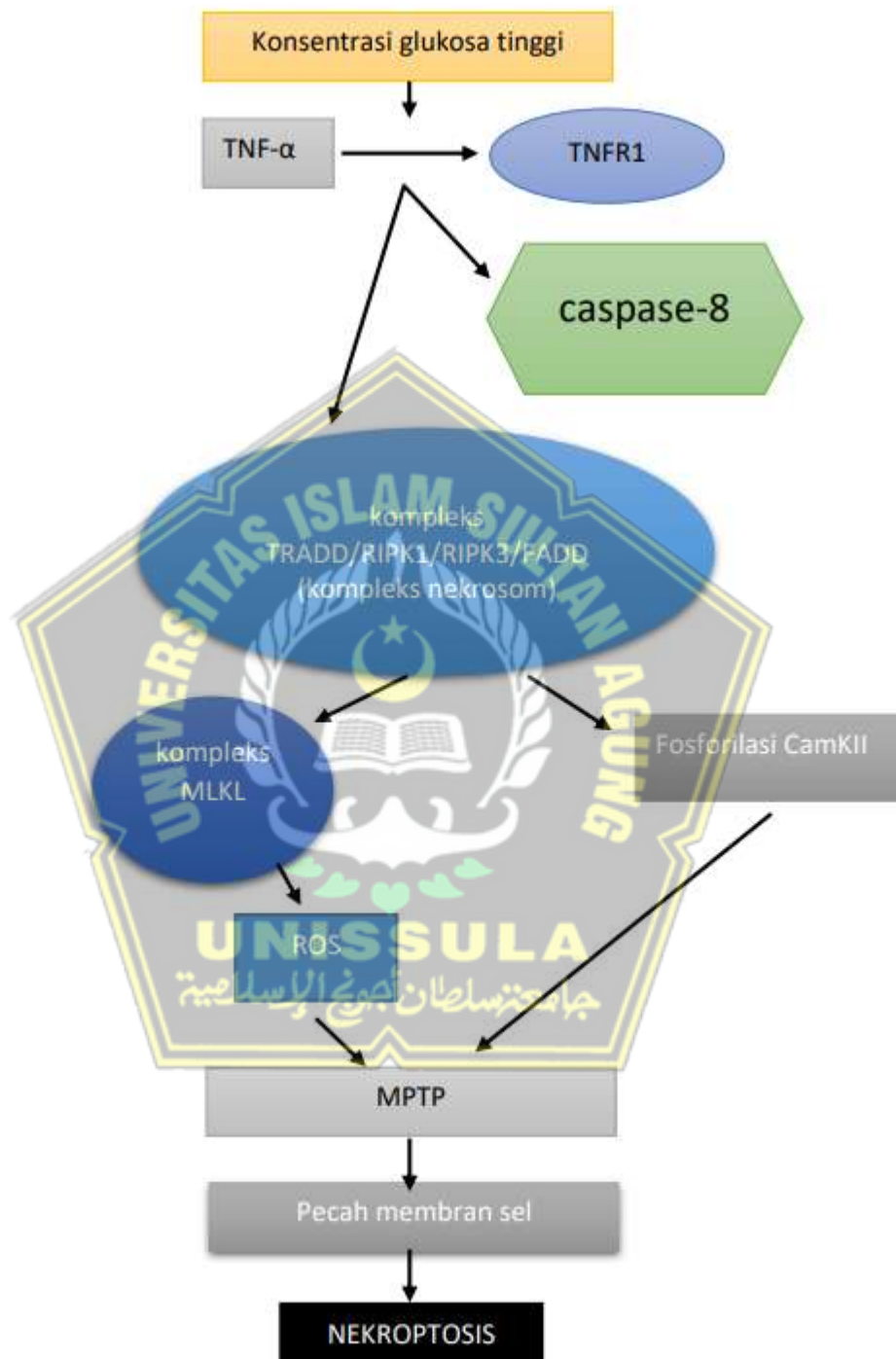
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

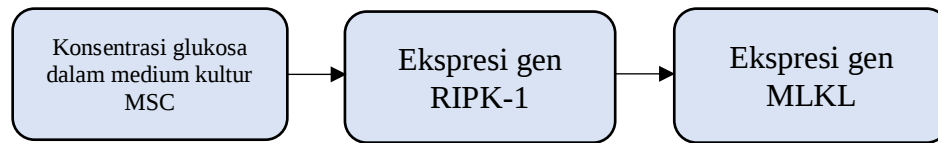
Konsentrasi glukosa dalam medium kultur memiliki pengaruh langsung dan tidak langsung terhadap aktivasi jalur necroptosis, baik melalui regulasi redoks seluler, sinyal inflamasi, maupun keseimbangan energi intraseluler.

- Pengaruh langsung jalur necroptosis
Konsentrasi glukosa dalam medium kultur dapat memengaruhi aktivitas jalur nekroptosis, terutama melalui jalur yang melibatkan RIPK1 (*receptor-interacting protein kinase 1*) dan MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain-Like protein*).
- Regulasi redoks seluler
ROS memiliki peran penting dalam menginduksi aktivasi RIPK1, baik melalui oksidasi residu sistein maupun dengan memfasilitasi proses ubiquitinasi dan autotransfosforilasi RIPK1. Aktivasi ini memungkinkan terbentuknya kompleks nekrosom bersama RIPK3 dan MLKL. Sebaliknya, pada kondisi hipoglikemia, penurunan produksi ATP menekan aktivitas sistem antioksidan endogen seperti glutathione, sehingga menyebabkan peningkatan ROS intraseluler yang juga berkontribusi pada aktivasi jalur necroptosis. (10,33,45)
- Sinyal inflamasi
Fluktuasi glukosa dapat menginduksi sekresi sitokin proinflamasi, seperti Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dan Interleukin-1 β (IL-1 β), oleh makrofag dan sel endotel. TNF- α kemudian berikatan dengan reseptor TNFR1, yang merekrut adaptor TRADD dan FADD serta mengaktifkan RIPK1 melalui fosforilasi. Aktivasi berurutan RIPK1–RIPK3–MLKL tersebut selanjutnya mengarah pada oligomerisasi dan translokasi MLKL ke membran plasma, di mana MLKL membentuk pori yang menyebabkan hilangnya integritas membran sel — ciri khas nekroptosis. Interaksi sinergis antara ROS dan sinyal inflamasi ini menunjukkan bahwa mikro- dan makro-lingkungan metabolik sel secara aktif mendorong MSC ke dalam jalur necroptosis (46)
- Keseimbangan energi intraseluler
Glukosa sebagai sumber energi utama memengaruhi rasio AMP/ATP yang menjadi penentu aktivasi AMP-activated Protein Kinase (AMPK). Pada kelebihan glukosa, aktivitas AMPK menurun karena rasio AMP/ATP rendah. Kondisi ini menghilangkan efek penghambatan AMPK terhadap RIPK1 dan memungkinkan aktivasi penuh jalur necroptosis. Selain itu, kelebihan energi juga memperkuat biosintesis lipid membran melalui akumulasi asetil-CoA dan sitrat, yang dapat mendukung oligomerisasi MLKL serta stabilisasi pori di membran plasma. Sebaliknya, pada stres energi (glukosa rendah), AMPK teraktivasi dan menstimulasi mitofagi melalui fosforilasi ULK1. Proses ini membersihkan mitokondria yang rusak, menurunkan produksi ROS, dan mempromosikan degradasi RIPK1 melalui ubiquitinasi oleh kompleks SCF $^{\beta}$ TrCP. Dengan demikian, AMPK dan dinamika mitokondria bertindak sebagai “penjaga gerbang” yang menentukan apakah sel akan mengalami nekroptosis atau bertahan hidup (47,48).



Gambar 1. Kerangka teori Penelitian

3.2. Kerangka Konseptual



Gambar 2. Kerangka konsep penelitian

3.3. Hipotesis

1. Medium konsentrasi glukosa tinggi dalam kultur hUC-MSC meningkatkan ekspresi gen RIPK1.
2. Medium konsentrasi glukosa tinggi dalam kultur hUC-MSC meningkatkan ekspresi gen MLKL.



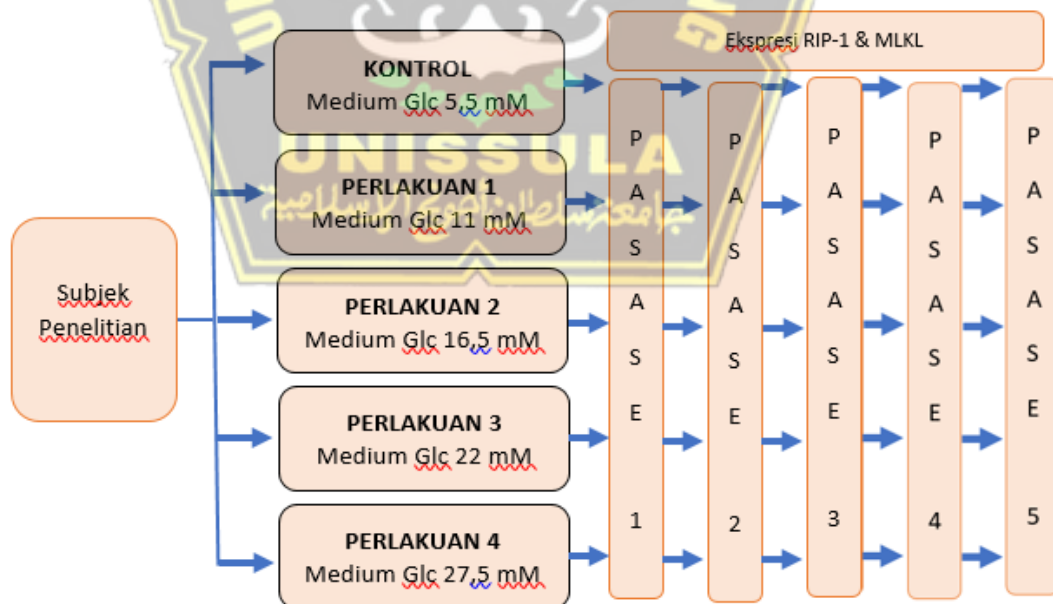
BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan desain penelitian analitik eksperimental laboratorik yang dilakukan secara *In-Vitro* dengan jenis penelitian post-test dengan kelompok kontrol (post-test only kontrol group design).

Kelompok penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan pada medium hUC-
MSC, yaitu medium yang diperkaya dengan konsentrasi glukosa 11; 16,5; 22; dan 27,5
mM dan satu kelompok kontrol yaitu pada medium HUC-MSC dengan konsetrasi
glukosa rendah 5,5 mM. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Al-
Qarahli (2019) yang menggunakan konsentrasi glukosa medium 25 mM konsentrasi
glukosa medium sebagai kelompok perlakuan glukosa tinggi yang dibandingkan
dengan kondisi glukosa medium normal 5,5 mM (49). Pada penelitian ini masing-
masing kelompok terdiri dari 5 cawan hUC-MSC.



Gambar 3. Skema rancangan penelitian

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah *Human umbilical cord Mesenchymal Stem Cells* yang didapatkan dari *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research Laboratory*.

4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah sel hUC-MSC yang diisolasi dan dikultur dalam medium yang mengandung konsentrasi glukosa tertentu.

4.2.2.1. Kriteria Inklusi

hUC-MSC dengan karakteristik sebagai berikut:

1. Mengekspresikan CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺ dan negatif marker Lin⁻
2. Mampu berdiferensiasi menjadi adiposit, osteoblast, kondrosit, neuronal, miosit, beta pancreas dalam biakan sel.
3. Sel dalam keadaan viable dan mampu proliferasi

4.2.2.1. Kriteria Eksklusi

hUC-MSC yang:

1. hUC-MSC passage lebih dari 10
2. hUC-MSC yang tidak adherent

4.2.2.1. Kriteria Drop out

1. Terjadi kontaminasi dan kematian sel hUC-MSC lebih dari 50%

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel Penelitian

4.3.1.1. Variabel Bebas

Konsentrasi glukosa dalam medium kultur hUC-MSC.

4.3.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi gen MLKL dan ekspresi gen RIPK1.

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. Variabel Bebas

- *Human umbilical cord Mesenchymal Stem Cells* (hUC-MSC) adalah sel yang mengekspresikan marker spesifik CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺ dan negatif marker Lin⁻ pada pemeriksaan *flowcytometry*, memiliki bentuk menyerupai sel fibroblast (*fibroblast-shaped*), dapat melekat pada permukaan plastik dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel dewasa.
- Konsentrasi Glukosa medium adalah jumlah glukosa yang ada dalam medium kultur sel. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi medium K (5,5 mM), P1 (11 mM), P2 (16,5 mM), P3 (22 mM), dan P4 (27,5 mM). Skala: interval.

4.3.2.1. Variabel Terikat

- Ekspresi gen MLKL adalah ekspresi MLKL akan diukur menggunakan teknik qRT-PCR pada hari ketujuh inkubasi setelah perlakuan. Skala: rasio.
- Ekspresi gen RIPK1 adalah ekspresi RIPK1 akan diukur menggunakan teknik qRT-PCR pada hari ketujuh inkubasi setelah perlakuan. Skala: rasio.

4.4. Bahan dan Materi Penelitian

4.4.1. Bahan

- *Mesenchymal Stem Cells*
- DMSO 1% dalam HCl 0,1 N
- Aquades
- SDS 10% dalam 0,1 N HCl
- Etanol 96%
- Media DMEM
- FBS 10%
- Penisilin-Streptomisin
- PBS (Phosphate Buffer Salin)
- Trypsin-EDTA (Trypsin 0,25%)
- KAPA sybr fast PCR kit
- Primer PCR
- Extraction RNA kit
- CDNA synthesis kit

4.4.2. Alat Penelitian

- 96-well plate (Iwaki)
- Mikropipet 200 μ L, 1000 μ L
- Blue tip dan yellow tip
- Nerraca analitik (Santorius)
- Waterbath (Heidolp)
- Mikroskop
- Inkubator CO₂ (Binder)
- Flowcytometer
- Biological Savety Cabinet
- Oven
- Autoclaf
- Alat-alat gelas (Pyrex)
- Tissue culture flask
- Laminar air flow (LAF) (Isocide TM)
- Canonical Tube
- Silika gel GF 254
- Pipa kapiler

4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja

4.6.1. Perolehan Ethical Clearence

Ethical clearance penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.6.2. Prosedur Isolasi Human Umbilical Cord- *Mesenchymal Stem Cells*

Seluruh proses dilakukan di dalam biosafety cabinet class 2, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilisasi tinggi

1. Umbilical cord dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0,9%
2. Dengan menggunakan pinset, umbilical cord diletakkan de petri dish, umbilical cord dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. Umbilical cord dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan didiamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask
4. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
5. Eksplan diinkubasidi dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂
6. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
7. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
8. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.6.3. Validasi HUC-MSCs CD90, CD105, CD73 dan Lin dengan *flowcytometry*

- Lepaskan sel dari flask dengan menggunakan BDTM accutaseTM cell detachment solution (cat No. 561527) atau larutan detachment solution yang lain. Cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel/ml di dalam BD PharmingenTM Stai *Buffer* (cat. No. 554656) atau Phospat *Buffer* Salin (PBS) *buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

- Siapkan tabung falkon 5 ml yang berisi reagen *flowcytometry* (Tabel 2)

Tabel 2. Reagen rang digunakan dalam *flowcytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD105	5 μ l
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD90	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD73	5 μ l
4	APC <i>mouse anti-human</i> Lin	5 μ l
5	Kosong hMSC <i>positive isotype kontrol cocktail</i>	20 μ l
6	hMSC negatif <i>isotype kontrol cocktail</i>	20 μ l
7	hMSC <i>positive cocktail</i> PE hMSC negatif <i>cocktail</i>	20 μ l 20 μ l

- Ulangi tabung 5 sampai 7 setiap penambahan sampel yang dianalisis.
- Ambil 100 μ l sampel ke dalam masing-masing tabung.
- Vortex dan tapping.
- Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap
- Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain buffer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS)
- Baca di *flowcytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk set-up cytometry (sebagai kompensasi).



4.6.4. Pemberian perlakuan hUC-MSCs yang diberikan medium *high glucose*.

Setelah hUC-MSC konfluens, hUC-MSC dipindahkan ke 24-well plate, dengan total jumlah sel yang ditanam sebanyak 5×10^4 sel dengan konfigurasi sebagai berikut:

- Pada sumuran pertama yaitu kelompok kontrol, diberikan sel punca sebanyak 5×10^4 sel. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
- Pada sumuran kedua yaitu kelompok P1, diberikan sel punca sebanyak 5×10^4 sel pada bagian bawah sumuran dan medium. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
- Pada sumuran ketiga yaitu kelompok P2, diberikan sel punca sebanyak 5×10^4 sel pada bagian bawah sumuran dan medium. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
- Pada sumuran keempat yaitu kelompok P3, diberikan sel punca sebanyak 5×10^4 sel pada bagian bawah sumuran dan medium. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
- Pada sumuran kelima yaitu kelompok P4, diberikan sel punca sebanyak 5×10^4 sel pada bagian bawah sumuran dan medium. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur kemudian diinkubasi selama 4 hari dalam kondisi normal.

4.6.5. Uji ekspresi gen RIPK1 dengan qRT-PCR

Total RNA diekstraksi dari sel yang diberi perlakuan dan kontrol dengan menggunakan reagen *TRIzol* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc) sesuai dengan protokol pabrik. Selanjutnya RNA ditranskripsikan secara terbalik menjadi cDNA. 25 µl volume reaksi yang terdiri dari 12,5 µl PCR buffer 2x untuk KOD FX (PCR amplification enzyme), 5 µl 2 mM dNTPs, 2 µl primer, 0,1 µl KOD, 2,4 µl air dan 1 µl DNA. Ditambahkan sekuens primer *Human RIPK1*:

Forward: TTACATGGAAAAGGCGTGATACA dan

Reverse: AGGTCTGCGATCTTAATGTGGA.

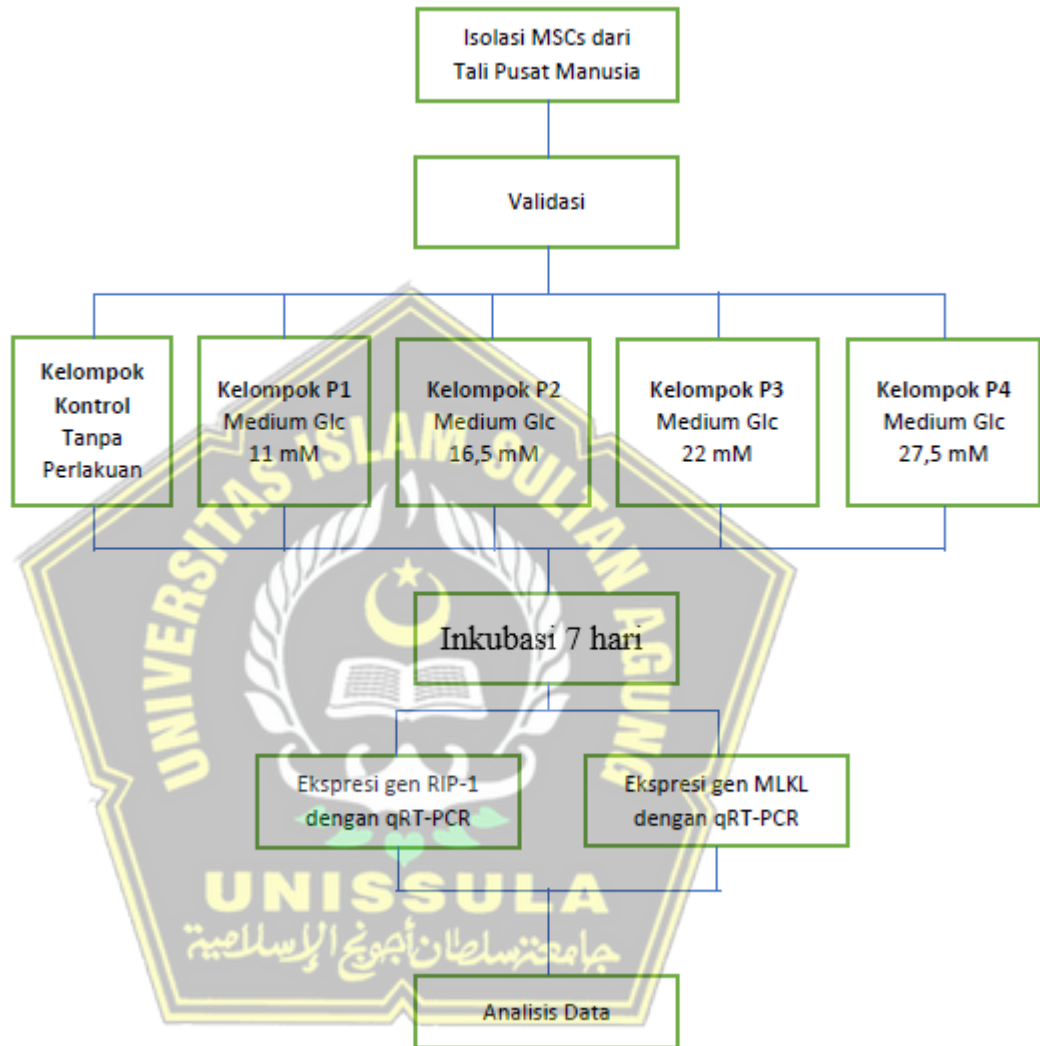
Kondisi standar untuk PCR adalah sebagai berikut: 95°C selama 2 menit, diikuti 40 siklus pada 95°C selama 30 detik, 62°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Metode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ digunakan untuk menunjukkan hubungan antara ekspresi gen target pada kelompok eksperimen dan ekspresi gen target pada kelompok

kontrol. Urutan primer gen RIPK1 yang digunakan forward primer dan reverse primer. Efek perlakuan direpresentasikan sebagai relatif quantity terhadap kontrol stimulasi. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga.

4.6.6. Uji ekspresi MLKL dengan qRT-PCR

Total RNA diekstraksi dari sel yang diberi perlakuan dan kontrol dengan menggunakan reagen TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc) sesuai dengan protokol pabrik. Selanjutnya RNA ditranskripsikan secara terbalik menjadi cDNA. 25µl volume reaksi yang terdiri dari 12,5 µl PCR *buffer* 2x untuk KOD FX (PCR *amplification enzyme*), 5 µl 2 mM dNTPs, 2 µl primer, 0,1 µl KOD, 2,4 µl air dan 1 µl DNA. Ditambahkan sekuens primer *Human* MLKL, Forward: AGGAGGCTAATGGGGAGATAGA dan Reverse: TGGCTTGCTGTTAGAAACCTG. Kondisi standar untuk PCR adalah sebagai berikut: 95°C selama 2 menit, diikuti 40 siklus pada 95°C selama 30 detik, 62°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Metode 2- $\Delta\Delta C_t$ digunakan untuk menunjukkan hubungan antara ekspresi gen target pada kelompok eksperimen dan ekspresi gen target pada kelompok kontrol. Urutan primer gen MLKL yang digunakan forward primer dan reverse primer. Efek perlakuan direpresentasikan sebagai relatif quantity terhadap kontrol stimulasi. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga.

4.6.7. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur penelitian

4.7. Teknik Pengumpulan Data Penelitian

Hasil qRT-PCR untuk ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada seluruh kelompok dikumpulkan dan ditabulasi dalam sebuah table untuk dilakukan analisis lebih lanjut.

4.8. Analisis Data

4.8.1. Analisis Data

Data yang sudah diproses, kemudian dilakukan analisis deskriptif untuk mengetahui gambaran variabel dependen, variabel independen serta variabel antara. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan Shapiro Wilk untuk mengetahui sebaran distribusi data. Jika sebaran data normal maka dilakukan uji beda parametrik dengan menggunakan *one way* ANOVA bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata untuk lebih dari dua kelompok sampel yang tidak berhubungan. Apabila sebaran data tidak normal dilakukan normalisasi data dengan transformasi logaritma, apabila data berdistribusi normal maka uji beda dilakukan dengan menggunakan *one way* ANOVA. Apabila setelah transformasi sebaran data masih tidak normal maka kami gunakan uji Kruskal Wallis, apabila sebaran data normal dan homogen kami lakukan analisis lanjutan dengan uji post Hoc LSD. Apabila sebaran data normal namun tidak homogen maka analisis lanjutan dilakukan dengan uji post hoc Tukey. Nilai p dianggap signifikan apabila $p < 0,05$. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS versi 23.

4.9 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

4.9.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* and Cancer Research Laboratory Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.9.2. Waktu Penelitian

Penelitian, pengumpulan data dan penyusunan laporan dilakukan pada Bulan Juni –Juli 2024.

4.10.Ethical Clearance

Ethical clearence penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan nomor sertifikat: 497/XI/2024/Komisi Bioetik.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan peningkatan ekspresi RIPK1 dan MLKL sebagai penanda molekuler utama nekroptosis dengan menggunakan qRT-PCR, pada MSC dengan konsentrasi glukosa tinggi dalam medium kultur. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan pada Januari sampai Juni 2025 di Laboratorium SCCR Semarang. Desain penelitian yang digunakan adalah post test only kontrol group dengan replikasi sebanyak 5 kali. Subyek penelitian menggunakan hUC-MSC yang dibiakkan dalam lima kelompok: K (kontrol, medium glukosa 5,5 mM), P1 (Perlakuan 1, medium glukosa 11 mM), P2 (Perlakuan 2, medium glukosa 16,5 mM), P3 (Perlakuan 3, medium glukosa 22 mM), dan P4 (Perlakuan 4, medium glukosa 27,5 mM) selama dua puluh empat jam. Ekspresi gen RIPK1 dan MLKL dari hUC-MSC diukur dengan menggunakan qRT-PCR. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk pembahasan data deskriptif untuk nilai variabel penelitian dan data analisis untuk hasil akhir.

5.1 Hasil Penelitian

Validasi

Kriteria MSC ditentukan oleh *Internasional Society for Cell and Gen Therapy cometee* dimana MSC harus memiliki kemampuan melekat pada permukaan plastik dan secara *in vitro* mampu berdiferensiasi menjadi adiposit, kondrosit, dan osteoblast.

Morfologi Stem Cell

Sel *Mesenchymal Stem Cells* yang dibiakkan dalam medium DMEM dan diamati menggunakan mikroskop *inverter*.



Gambar 5. UC-MSC Passage 7 dengan konfluensi 80%, dengan pembesaran 40x.

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

Uji diferensiasi adipogenik

Sel *Mesenchymal Stem Cell* dibiakkan dalam medium induksi adipogenik dengan inkubasi selama 20 hari dan diamati menggunakan mikroskop *inverter*. Sel yang menyerupai mesenkim yang melekat tumbuh sebagai sel berbentuk bintang

kemudian berkembang menjadi sel fibroblastoid multi-polar. Setelah dilakukan induksi diferensiasi adipogenik, bentuk sel berubah menyerupai adiposit.

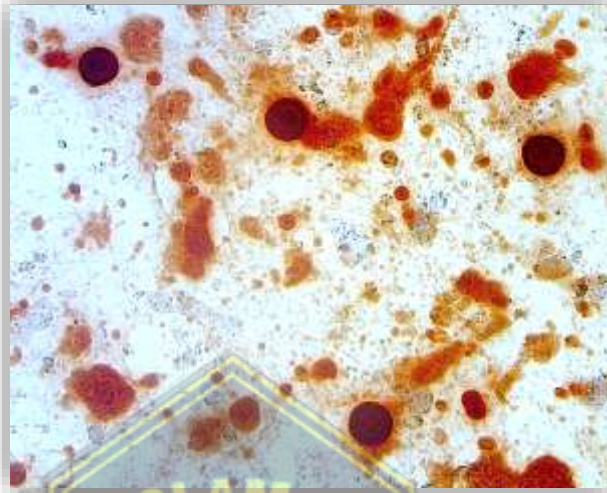


Gambar 6. hUC-MSC diferensiasi adipogenik, dengan pembesaran 400x.

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

Uji diferensiasi

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



Gambar 7. hUC-MSV diferensiasi *osteogenik* dengan pembesaran 400x
Tampak MSCs berdiferensiasi *osteogenik* ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarid Red*.



Gambar 8. Hasil analisis flowcytometry sel hUC-MSV yang memiliki ekspresi CD90, CD44, CD105 dan CD73 yang tinggi serta ekspresi Lin yang rendah.

Validasi MSC ditunjukkan dengan nilai positif pada CD90 dan CD44, CD105 dan CD 73 sedangkan negatif pada Lin. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi CD90 sebanyak 98,92%, CD44 sebanyak 99,98%, CD105 sebanyak 96,26% dan mengekspresikan CD73 sebanyak 100%, serta Lin sebanyak 0,08% (Gambar 8).

Ekspresi gen RIPK1 dan MLKL

Seluruh sampel hUC-MSC yang telah dikumpulkan, kemudian dilakukan proses isolasi RNA total dengan menggunakan kit reagen *TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc)*. Selanjutnya dilakukan sintesa cDNA dan kuantifikasi ekspresi gen RIPK1 dan MLKL dengan metode two step qRT-PCR.

Ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada hUC-MSC diukur menggunakan metode qRT-PCR dan dihitung menggunakan rumus Livak untuk mendapatkan nilai *Relative quantification* (Rq). Tingkat ekspresi relatif RIPK1 dan MLKL didapatkan setelah ekspresinya dibandingkan / dinormalisasi dengan ekspresi dari suatu reference gene yaitu GADPH.

Gen referensi GADPH digunakan sebagai kontrol normalisasi dalam penelitian ini karena ekspresinya yang stabil di berbagai kondisi hUC-MSC. Menetapkan nilai referensi yang akurat untuk UCMSC sangat penting untuk memahami signifikansi klinis peningkatan dan penurunan ekspresi relatif gen (50).

Tabel 3 menunjukkan hasil ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok P1 memiliki *fold change* terendah,

sementara kelompok P4 menunjukkan *fold change* atau kelipatan tingkat ekspresi yang tertinggi.

Tabel 3. Hasil analisis deskriptif ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada semua kelompok.

Kelompok (n)	RIPK1		MLKL	
	Rerata ($\pm$ SD)	95%CI	Rerata ($\pm$ SD)	95%CI
K (6)	0,217 ($\pm$ 0,078)	0,135-0,299	0,250 ($\pm$ 0,194)	0,047-0,453
P1 (6)	0,518 ($\pm$ 0,283)	0,220-0,816	0,452 ($\pm$ 0,253)	0,186-0,717
P2 (6)	0,795 ($\pm$ 0,648)	0,114-1,476	0,517 ($\pm$ 0,175)	0,333-0,700
P3 (6)	1,023 ($\pm$ 0,907)	0,071-1,976	0,565 ($\pm$ 0,293)	0,153-0,977
P4 (6)	1,223 ($\pm$ 0,838)	0,344-2,103	0,700 ($\pm$ 0,356)	0,326-1,074

Hasil Tes normalitas data ekspresi gen RIPK1 dengan Shapiro-Wilk menunjukkan data terdistribusi tidak normal dan data tidak homogen sehingga analisis dilanjut menggunakan uji non-parametrik Kruskal Wallis untuk membandingkan semua kelompok dan Uji non-parametrik Mann Whitney untuk membandingkan antar kelompok.

Sedangkan hasil tes normalitas data ekspresi gen MLKL dengan Shapiro-Wilk menunjukkan data terdistribusi normal sehingga analisis dilanjut menggunakan uji *one way ANOVA* dan uji Post Hoc.

Tabel 4. Hasil analisis statistik ekspresi gen RIPK1 dan MLKL antar kelompok

Ekspresi gen	Kelompok					p-value
	K	P1	P2	P3	P4	
	Rerata ($\pm$ SD)	Rerata ($\pm$ SD)	Rerata ($\pm$ SD)	Rerata ($\pm$ SD)	Rerata ($\pm$ SD)	
RIPK1	0,217 ($\pm$ 0,078)	0,518 ($\pm$ 0,283)	0,795 ($\pm$ 0,648)	1,023 ($\pm$ 0,907)	1,223 ($\pm$ 0,838)	0,02* 0,01** 0,02***
MLKL	0,250 ($\pm$ 0,194)	0,452 ($\pm$ 0,253)	0,517 ($\pm$ 0,175)	0,565 ($\pm$ 0,293)	0,700 ($\pm$ 0,356)	0,50* 0,17** 0,13****

Keterangan :

*Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = terdistribusi normal, $p < 0,05$ = tidak terdistribusi normal)

** Uji Levene's ($p > 0,05$ = homogeny, $p < 0,05$ = tidak homogen)

*** Uji Kruscal Wallis ($p > 0,05$ = tidak berbeda bermakna, $p < 0,05$ = berbeda bermakna)

**** Uji One way ANOVA ($p > 0,05$ = tidak berbeda bermakna, $p < 0,05$ = berbeda bermakna)

Tabel 4 menunjukkan hasil analisis statistik ekspresi gen RIPK1 dan MLKL antar kelompok konsentrasi glukosa. Terdapat peningkatan yang progresif ekspresi gen RIPK1 seiring peningkatan konsentrasi glukosa dari kelompok kontrol (K = 5,5 mM) hingga kelompok perlakuan tertinggi (P4 = 27,5 mM). Nilai rerata ekspresi RIPK1 meningkat secara bertahap pada kelompok K (5,5 mM) $0,217 \pm 0,078$, P1(11 mM) $0,518 \pm 0,283$, P2 (16,5 mM) $0,795 \pm 0,648$, P3 (22 mM) $1,023 \pm 0,907$ dan P4 (27,5 mM) $1,223 \pm 0,838$. Uji normalitas Shapiro-Wilk dan homogenitas Levene menunjukkan bahwa data RIPK1 tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, sehingga digunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis, yang menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p = 0,02$). Signifikansi juga diperkuat oleh uji Levene ($p = 0,01$) dan Kruskal-Wallis ($p = 0,02$), menandakan bahwa glukosa tinggi secara nyata meningkatkan ekspresi RIPK1 pada hUC-MSC.

Sementara itu, ekspresi gen MLKL juga menunjukkan tren peningkatan dari K ke P4. Nilai rata-rata kelompok K (5,5 mM) $0,250 \pm 0,194$, P1(11 mM) $0,452 \pm 0,253$, P2 (16,5 mM) $0,517 \pm 0,175$, P3 (22 mM) $0,565 \pm 0,293$ dan P4 (27,5 mM) $0,700 \pm 0,356$. Uji normalitas Shapiro-Wilk dan homogenitas Levene menunjukkan bahwa data MLKL terdistribusi normal dan homogen, sehingga digunakan uji parametrik *One Way* ANOVA. Namun, uji statistik *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa data MLKL menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna secara statistik, dengan nilai $p = 0,13$.



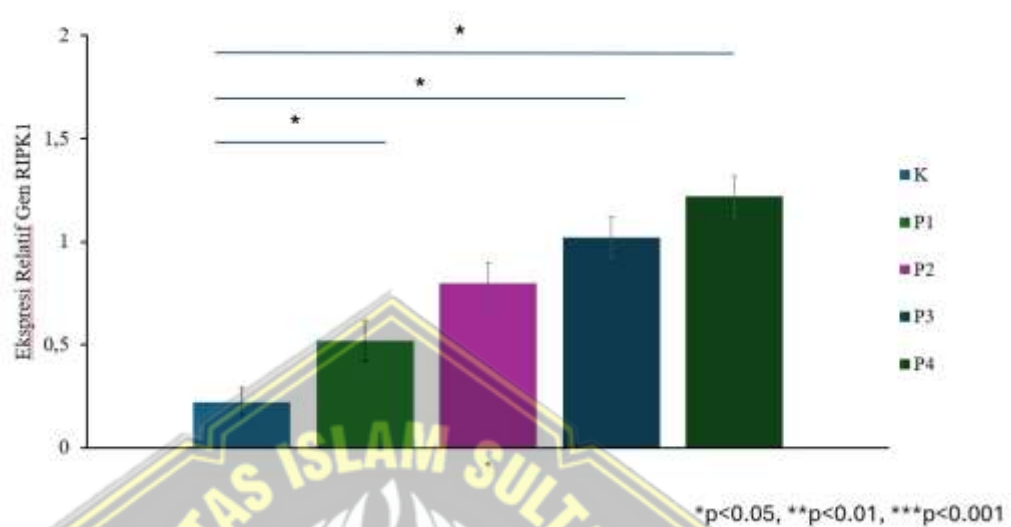
Tabel 5. Hasil analisis statistik ekspresi gen RIPK1 dan MLKL

Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig
RIPK1 (Uji Mann Whitney)	K	P1	0,03*
		P2	0,08
		P3	0,00*
		P4	0,00*
	P1	P2	0,42
		P3	0,42
		P4	0,15
		P3	0,75
	P2	P4	0,42
		P4	0,75
	P3	P4	0,75
		P4	0,75
MLKL (Uji Post Hoc Tamhane)	K	P1	0,24
		P2	0,12
		P3	0,07
		P4	0,01*
	P1	P2	0,67
		P3	0,50
		P4	0,15
		P3	0,77
	P2	P4	0,28
		P4	0,42
	P3	P4	0,42
		P4	0,42

Keterangan: *) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan. K: kelompok kontrol, medium glukosa 5, 5 mM; P1: Perlakuan 1, medium glukosa 11 mM; P2: Perlakuan 2, medium glukosa 16,5 mM; P3: Perlakuan 3, medium glukosa 22 mM; dan P4: Perlakuan 4, medium glukosa 27,5 mM.

Tabel 5 menunjukkan analisis statistik ekspresi gen RIPK1 dan MLKL antar kelompok glukosa menggunakan uji Mann-Whitney (untuk RIPK1) dan uji Post Hoc Tamhane (untuk MLKL), meskipun Uji Post Hoc Tamhane ini oleh beberapa peneliti tidak dilakukan karena hasil Uji beda dengan One Way ANOVA tidak berbeda bermakna secara statistic.

Efek konsentrasi glukosa tinggi terhadap ekspresi gen RIPK1

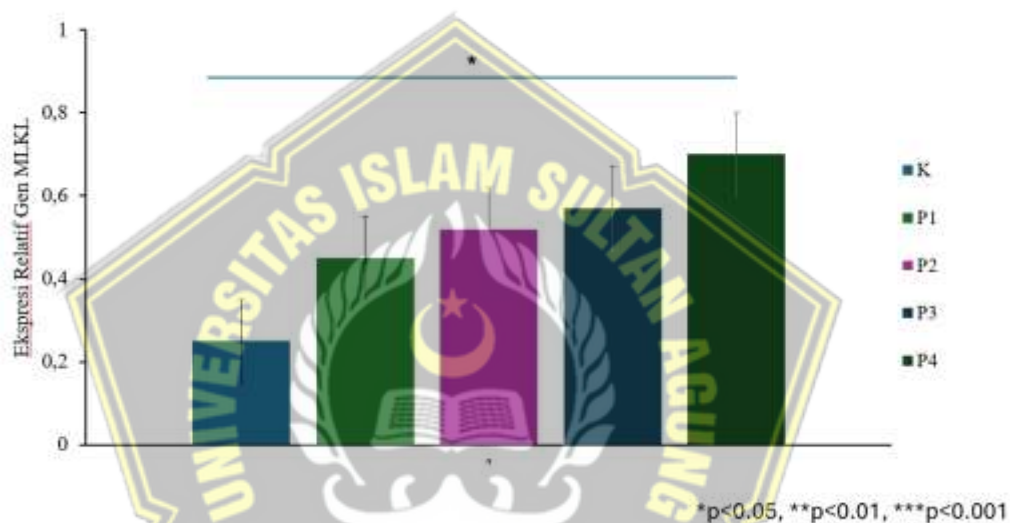


Gambar 9. Rerata Ekspresi gen RIPK1 pada kultur hUC-MSC pada semua kelompok. K (5,5 mM), P1 (11 mM), P2 (16,5 mM), P3 (22 mM), dan P4 (27,5 mM).

Tabel 5 dan gambar 9 menunjukkan ekspresi gen RIPK1. Uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara beberapa pasangan kelompok. Secara spesifik, Kelompok K (5,5 mM) vs P1 (11 mM) menunjukkan perbedaan signifikan ($p = 0,03$) dan kelompok K (5,5 mM) vs P3 (22 mM) dan K (5,5 mM) vs P4 (27,5 mM) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p = 0,00$). Sementara itu, perbandingan K (5,5 mM) vs P2 (11 mM) tidak signifikan ($p = 0,08$), meskipun secara deskriptif terdapat peningkatan nilai ekspresi. Hal ini mengindikasikan bahwa aktivasi awal RIPK1 sudah mulai meningkat pada glukosa 16,5 mM (P2), namun belum mencapai ambang signifikansi statistik, kemungkinan akibat variasi biologis atau ukuran sampel yang terbatas. Perbandingan antar kelompok perlakuan (P1–P4)

tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, mengindikasikan bahwa setelah ambang aktivasi RIPK1 tercapai, tidak terdapat lonjakan perubahan yang sangat mencolok di antara dosis glukosa tinggi berikutnya.

Efek konsentrasi glukosa tinggi terhadap ekspresi gen MLKL



Gambar 10. Rerata Ekspresi gen MLKL pada kultur hUC-MSC pada semua kelompok, K (5,5 mM), P1 (11 mM), P2 (16,5 mM), P3 (22 mM), dan P4 (27,5 mM).

Ekspresi gen MLKL yang dianalisis menggunakan uji Post Hoc Tamhane (sesuai Tabel 5 dan Gambar 10) menunjukkan bahwa hanya perbandingan K (5,5 mM) vs P4 (27,5 mM) yang menunjukkan perbedaan signifikan ($p = 0,01$), menandakan bahwa ekspresi MLKL sebagai eksekutor nekroptosis baru berbeda nyata pada paparan glukosa yang sangat tinggi. Seluruh perbandingan lainnya, termasuk K vs P1–P3 dan antar kelompok perlakuan (P1–P4), tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p >$

0,05). Temuan ini menunjukkan bahwa ekspresi MLKL meningkat secara bertahap, namun signifikansi statistik baru tercapai pada kadar glukosa ekstrem, yang diduga sebagai titik transisi di mana jalur necroptosis mencapai fase eksekusi.

5.2 Pembahasan

Ekspresi RIPK1 pada hUC-MSC di Media Glukosa Tinggi

Pada penelitian ini, ekspresi gen RIPK1 pada sel punca mesenkimal tali pusat manusia (hUC-MSC) meningkat seiring kenaikan konsentrasi glukosa medium. Bahkan pada paparan glukosa 11 mM (sekitar dua kali lipat glukosa normal 5,5 mM), level mRNA RIPK1 sudah naik secara signifikan dibanding kontrol normoglikemik. Kenaikan ini berlanjut pada konsentrasi lebih tinggi (16,5 mM hingga 27,5 mM), menunjukkan tren dose-dependent di mana setiap peningkatan glukosa memicu ekspresi RIPK1 yang lebih tinggi. Analisis statistik (Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney berpasangan) mengonfirmasi bahwa perbedaan ekspresi RIPK1 antar kelompok sangat bermakna ($p < 0,05$) untuk hampir semua perbandingan kelompok konsentrasi glukosa. Temuan ini menandakan bahwa lingkungan hiperglikemik segera mengaktifkan jalur molekuler yang melibatkan RIPK1 pada MSC.

Peningkatan ekspresi RIPK1 mengindikasikan aktivasi awal jalur nekroptosis, yakni bentuk kematian sel terprogram yang bersifat nekrotik. RIPK1 merupakan inisiator penting nekroptosis; ketika diaktifkan (misalnya oleh sinyal stres seperti TNF- α tanpa inhibisi caspase-8), RIPK1 akan merekrut dan membentuk kompleks “necrosome” bersama RIPK3 dan MLKL. Kenaikan transkripsi RIPK1 pada MSC

dalam glukosa tinggi bisa berarti sel mengalami stres glukotoksisitas yang memicu sinyal kematian terprogram tersebut (33). Menariknya, data menunjukkan ekspresi RIPK1 naik signifikan pada kadar glukosa yang relatif moderat (11 mM), mendahului peningkatan MLKL (lihat pembahasan MLKL di bawah). Hal ini dapat diartikan bahwa sel MSC di lingkungan glukosa tinggi mulai “priming” nekroptosis sejak dini – mempersiapkan komponen hulunya (RIPK1) – meskipun eksekusi penuh kematian sel (ditandai aktivasi MLKL) mungkin baru terjadi pada stres yang lebih berat. Fenomena serupa dilaporkan pada kultur sel imun; paparan glukosa sangat tinggi dapat memicu ekspresi RIPK1/RIPK3/MLKL secara simultan, yang pada gilirannya meningkatkan kerentanan terhadap nekroptosis. Dengan demikian, peningkatan RIPK1 pada MSC menandai aktivasi jalur nekroptosis sejak tahap hulu sebagai respon terhadap hiperglikemia.

Selain sebagai pemicu nekroptosis, kenaikan RIPK1 juga berpotensi memengaruhi jalur lain. RIPK1 diketahui punya dua peran: *kinase activity*-nya memicu kematian (nekroptosis/apoptosis), namun domain *scaffold*-nya justru bisa mendukung sinyal pro-survival (NF- κ B) ketika kondisi sel normal. Dalam konteks glukosa tinggi, ekspresi RIPK1 yang lebih tinggi mungkin merefleksikan upaya sel menyeimbangkan sinyal pro-kehidupan vs pro-kematian. Namun, karena di sini disertai peningkatan MLKL (meski pada level glukosa tertinggi), ini lebih condong menegaskan arah pro-kematian (nekroptosis)(17). Secara keseluruhan, temuan ekspresi RIPK1 ini konsisten dengan hipotesis bahwa medium konsentrasi glukosa tinggi dalam kultur hUC-MSC meningkatkan ekspresi protein RIPK1.

Ekspresi MLKL pada hUC-MSC di Media Glukosa Tinggi

Gen MLKL (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase) adalah eksekutor akhir nekroptosis yang menyebabkan lisis membran sel saat teraktivasi fosforilasi oleh RIPK3. Hasil qRT-PCR menunjukkan ekspresi MLKL pada hUC-MSC cenderung stabil pada paparan glukosa 11–22 mM, kemudian meningkat signifikan pada glukosa tertinggi 27,5 mM. Uji ANOVA dan *post-hoc* LSD mengonfirmasi perbedaan bermakna antara kelompok kontrol (5,5 mM) dan glukosa 27,5 mM ($p < 0,05$), sementara perbedaan MLKL pada glukosa $< 27,5$ mM terhadap kontrol tidak signifikan secara statistik. Artinya, level glukosa tinggi ekstrim dibutuhkan untuk memicu kenaikan ekspresi MLKL yang nyata. Pola ini sejalan dengan peran MLKL sebagai protein efektor: MLKL baru diekspresikan (atau distabilkan) lebih tinggi saat sinyal kematian mencapai fase eksekusi.

Peningkatan ekspresi MLKL pada 27,5 mM menegaskan aktivasi jalur nekroptosis penuh pada kondisi hiperglikemia berat. Kombinasi peningkatan RIPK1 (sejak glukosa sedang) dan peningkatan MLKL (pada glukosa sangat tinggi) mencerminkan aktivasi sekuensial: RIPK1 naik lebih awal, memicu rangkaian necrosome, dan akhirnya MLKL teraktivasi pada ambang stres tertentu, menyebabkan lisis sel. Ini konsisten dengan literatur yang menyebut hiperglikemia mendorong *shifting* jalur kematian sel dari apoptosis menuju nekroptosis. Dengan MLKL meningkat signifikan hanya pada glukosa tertinggi, dapat diinterpretasi bahwa MSC

mungkin menoleransi glukosa tinggi sampai titik tertentu dengan mengaktifkan mekanisme pro-damai (misal, autophagy – dibahas kemudian – atau mekanisme kompensasi lain). Namun pada ambang ~ 27 mM, stress oksidatif dan sinyal kematian menumpuk sehingga *fail-safe* rusak dan terpiculah eksekusi nekroptosis (ditandai lonjakan MLKL).

Dari sudut pandang fungsional, MLKL yang meningkat mengimplikasikan poros nekroptosis benar-benar berjalan. MLKL akan beroligomerisasi dan menuju membran plasma maupun organel, membuat pori yang menghancurkan integritas membran. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa pada kondisi hiperglikemia, MLKL tidak hanya beraksi di membran plasma tapi juga ditranslokasi ke mitokondria, berkontribusi pada hilangnya potensi membran mitokondria dan pelepasan faktor pro-kematian. Jadi, peningkatan MLKL pada MSC kita dapat berkaitan dengan disfungsi mitokondria yang parah akibat glukosa tinggi, sehingga sel memasuki fase point of no return kematian nekrotik.

Menariknya, data kita menunjukkan MLKL baru naik signifikan pada 27,5 mM. Kadar ini jauh melebihi glukosa fisiologis normal (5,5 mM) dan merepresentasikan kondisi patologis (setara ~ 500 mg/dL). Ini mencerminkan situasi ekstrim seperti diabetes tak terkontrol. Di konteks klinis, hal ini relevan karena komplikasi diabetik berat biasanya muncul saat glukosa kronis sangat tinggi. Temuan ini segaris dengan penelitian pada kardiomyosit neonatal tikus: glukosa 25 mM (tinggi) meningkatkan drastis protein MLKL terfosforilasi (aktif) dibanding kontrol osmolaritas(51). Juga, pada model tikus diabetes (streptozotosin dan model genetik),

jantung menunjukkan peningkatan MLKL teraktivasi. Dengan demikian, MLKL sebagai penanda nekroptosis tampak diinduksi kuat oleh paparan glukosa tinggi berkepanjangan, baik pada MSC kita maupun pada sel/jaringan lain di kondisi diabetes (8).

Secara keseluruhan, hasil ekspresi MLKL dan RIPK1 tersebut menunjukkan bahwa paparan glukosa tinggi dapat mengaktivasi jalur kematian nekroptosis pada hUC-MSC secara bertahap. RIPK1 sebagai inisiator naik lebih dini (hiperglikemia sedang), dan MLKL sebagai eksekutor puncaknya naik signifikan pada hiperglikemia berat.

Hiperglikemia tidak hanya mengaktifkan nekroptosis secara terisolasi, tetapi juga mempengaruhi jalur-jalur molekuler lain yang saling berhubungan antara lain jalur molekuler ROS, PI3K/Akt/mTOR, TGF- β 1/PKC, dan AMPK/mitofagi.

Perbandingan dengan Literatur (2015–2025) pada MSC dan Sel Lain (Ginjal, Jantung, Saraf)

Hasil penelitian kita mengenai ekspresi RIPK1/MLKL pada MSC di hiperglikemia sejalan dengan temuan-temuan dalam 10 tahun terakhir mengenai mekanisme nekroptosis pada berbagai jenis sel yang relevan dengan komplikasi diabetes. Berikut perbandingan temuan ini dengan literatur terkini, baik pada sel punca mesenkimal (MSC) sendiri maupun pada organ target diabetes seperti ginjal, jantung, dan sistem saraf.

MSC dan Sel Punca Mesenkimal Lain

Studi mengenai efek hiperglikemia pada MSC menunjukkan tema umum: hiperglikemia merusak viabilitas dan fungsi regeneratif MSC. Penelitian Chang *et al.* (2015) telah dibahas sebelumnya, di mana BMSC terpapar glukosa 25 mM mengalami penuaan dini terkait autofagi dan stres oksidatif. Selain itu, hiperglikemia kronis mendorong MSC menuju apoptosis dan senescence melalui berbagai mekanisme. Wu *et al.* (2016) melaporkan glukosa tinggi (11–22 mM, 14 hari) secara signifikan mempercepat penuaan MSC (ditunjukkan dengan penanda p16^{INK4a}, β -galactosidase) dan mengganggu kemampuan proliferasinya. Terdapat peningkatan aktivitas Akt awalnya, namun jangka panjang justru terjadi kelelahan sinyal Akt dan peningkatan tanda p53/p21 (jalur penuaan). Sementara itu, Hsiao *et al.* menemukan bahwa penggunaan metformin dalam kultur MSC hiperglikemik (sebagai simulasi kontrol glikemik ketat) justru dapat memicu apoptosis MSC via axis AMPK-mTOR. Ini paradoks: metformin biasanya melindungi sel, tapi jika glukosa diturunkan drastis, MSC yang sudah beradaptasi pada gula tinggi bisa mengalami *shock* metabolik. Artinya, fluktuasi glukosa juga berbahaya (misal pada terapi insulin intensif, perlu diwaspadai efek ke MSC endogen).

Meski spesifik nekroptosis pada MSC jarang dilaporkan, implikasi tidak langsung bisa diambil. Nekroptosis kemungkinan menyumbang sebagian kematian MSC di hiperglikemia di samping apoptosis. Hal ini karena: (a) MSC secara umum resisten terhadap apoptosis dibanding sel diferensiasi, sehingga bila mati kemungkinan melalui jalur alternatif (nekroptosis atau pyroptosis); (b) lingkungan hiperglikemia

diabetik kaya faktor inflamasi (TNF- α , IL-1 β) yang dapat memicu nekroptosis, apalagi jika MSC mengalami inhibisi caspase-8 misalnya oleh ROS tinggi. Penelitian terbaru pada *dental pulp stem cells* menunjukkan bahwa transplantasi ke tikus diabetes memperbaiki neuropati dalam jangka panjang, menandakan MSC masih bisa berfungsi di lingkungan diabetes, tetapi tingkat keberhasilannya mungkin lebih rendah dibanding normal. Ada hipotesis bahwa kurangnya *survival* MSC yang ditransplantasi pada pasien diabetes disebabkan oleh tingginya kematian sel (mungkin nekroptosis) segera setelah infus akibat “serangan” hiperglikemia dan inflamasi pasien. Oleh sebab itu, berbagai upaya modifikasi MSC tengah diteliti: misalnya overekspresi gen antioksidan, pre-kondisi dengan hipoksia, atau melengkapi medium dengan faktor trophik, agar MSC lebih tahan. Ini relevan dengan temuan kita bahwa target molecular RIPK1/MLKL bisa menjadi pertimbangan: MSC yang kekurangan atau terinhibisi RIPK1/MLKL mungkin lebih tahan di lingkungan hiperglikemia. Namun, hal ini butuh kehati-hatian karena nekroptosis juga punya peran fisiologis (contoh: membantu remodeling jaringan).

Intinya, literatur dekade terakhir menegaskan hiperglikemia berdampak buruk bagi kesehatan MSC, mempercepat penuaan dan kematian sel, di mana mekanisme nekroptosis diduga terlibat meski belum dilaporkan eksplisit. Hasil penelitian kita merupakan salah satu bukti pertama (setidaknya pada hUC-MSC) yang mengonfirmasi keterlibatan jalur nekroptosis (RIPK1-MLKL) dalam efek glukosa tinggi. Temuan ini melengkapi pengetahuan sebelumnya yang lebih menyoroti apoptosis dan senescence.

Dengan adanya data ini, terbuka peluang baru untuk meningkatkan fungsi MSC di kondisi diabetik lewat intervensi penekan nekroptosis.

Sel Ginjal (Diabetic Kidney Disease)

Ginjal adalah organ kunci yang terdampak pada diabetes, dengan diabetic kidney disease (DKD) sebagai komplikasi mikroangiopati utama. Salah satu penyebab progresifnya DKD adalah hilangnya sel-sel tubulus dan glomerulus akibat glukotoksisitas dan inflamasi kronis. Bukti terbaru kuat mengindikasikan nekroptosis sebagai mekanisme kematian sel dalam DKD. Guo *et al.* (2023) melaporkan bahwa hiperglikemia menginduksi kerusakan ginjal melalui aktivasi nekroptosis baik *in vivo* (pada tikus diabetes STZ/HFD) maupun *in vitro* (pada sel tubulus ginjal NRK-52E yang dipapar glukosa tinggi). Pada model tersebut, glukosa tinggi menyebabkan peningkatan aktivasi RIPK1/RIPK3/MLKL di jaringan ginjal, dengan ditemukannya tanda-tanda nekroptosis pada tubulus disertai reaksi inflamasi (pelepasan sitokin). Menariknya, ketika jalur ini diblok dengan Necrostatin-1 (Nec-1, inhibitor RIPK1) atau dengan antioksidan NAC, ginjal tikus terlindungi: terjadi penurunan kematian sel tubulus, berkurangnya sitokin proinflamasi, dan perbaikan fungsi filtrasi. Ini bukti langsung bahwa nekroptosis berkontribusi pada patogenesis DKD dan merupakan target terapeutik potensial. Penulis menyimpulkan RIPK1 adalah target terapi menjanjikan untuk mencegah progresi penyakit ginjal diabetik.

Hasil penelitian kami yang menunjukkan aktivasi RIPK1/MLKL oleh glukosa konsentrasi tinggi mendukung temuan di atas dalam konteks sel punca. Meskipun

hUC-MSC berbeda dari sel tubulus ginjal, mekanisme dasar hiperglikemia yang memicu nekroptosis tampaknya konservatif lintas jenis sel. Pada ginjal, kemungkinan nekroptosis terutama dipicu oleh stres metabolik dan inflamasi lokal. Hiperglikemia meningkatkan ROS ginjal, mengaktifkan PKC, serta memicu kelebihan produksi AGE (advanced glycation end-products) yang mengikat RAGE receptor menyalakan sinyal inflamasi NF- κ B. Kombinasi TNF- α tinggi dan ROS bisa melumpuhkan aktivitas caspase-8, sehingga memudahkan aktivasi RIPK1/RIPK3 (efek sinergis). Apalagi, sel epitel tubulus kental berekspresikan tinggi RIPK3, sehingga rentan nekroptosis. Dalam konteks MSC, sel kita juga mengalami ROS tinggi dan (mungkin) sedikit TNF dari jejak serum atau sekresi autokrin, cukup untuk menendang jalur nekroptosis.

Literatur lain menegaskan hal senada yaitu nekroptosis ditemukan di glomerulus dan interstisium ginjal penderita diabetes. Misalnya, pada biopsi ginjal diabetik manusia terdeteksi peningkatan ekspresi RIPK3 dan MLKL dibanding ginjal normal, walaupun bukti fosforilasi MLKL pada pasien masih terbatas (mungkin karena waktu pengambilan sampel yang telat). Namun, model hewan konsisten menunjukkan pensinyalan nekroptosis aktif. Bahkan, inhibitor spesifik RIPK3 (GSK'872) dan MLKL (NSA compound) sedang diuji pada model tikus DKD dan memperlihatkan pengurangan albuminuria dan lesi ginjal.

Dengan demikian, dalam kurun 2015–2025, nekroptosis telah muncul sebagai mekanisme penting dalam DKD. Studi kita memperluas pemahaman ini ke tipe sel MSC, memperlihatkan bahwa hiperglikemia dapat memicu program nekroptosis bahkan di sel punca mesenkimal, bukan hanya di sel ginjal yang telah berdiferensiasi.

Ini relevan untuk upaya terapi sel punca bagi penyakit ginjal: lingkungan hiperglikemik ginjal mungkin mengganggu kelangsungan hidup MSC yang ditransplantasikan via induksi nekroptosis. Oleh karenanya, strategi proteksi MSC (misal dengan Nec-1 atau NAC) dapat dipertimbangkan saat menerapkan terapi sel di pasien diabetes, supaya sel-sel donor tidak musnah oleh kondisi hiperglikemik pasien.

Sel Jantung (Kardiomiosit dan Jantung Diabetik)

Komplikasi jantung pada diabetes (seperti kardiomiopati diabetik dan peningkatan risiko gagal jantung) juga berkaitan dengan kematian sel otot jantung. Sementara apoptosis telah lama diinvestigasi, belakangan necroptosis jantung pada diabetes mendapat perhatian. Penelitian Zhang *et al.* (2022) menunjukkan bahwa pada model tikus diabetes T1DM (STZ-induced, serta model genetik Akita), tingkat MLKL terfosforilasi (aktif) dan RIPK3 teraktivasi meningkat signifikan dalam jaringan jantung dibanding kontrol nondiabetik. Hal serupa terbukti pada isolat kardiomiosit dewasa yang di *in vitro* diberi medium glukosa 25 mM: terjadi peningkatan protein p-RIPK3 dan p-MLKL dibanding sel dengan manitol normal (kontrol osmolaritas). Ini menegaskan bahwa hiperglikemia menginduksi aktivasi nekroptosis pada otot jantung, konsisten dengan hasil kita pada MSC.

Lebih menarik lagi, studi tersebut dan lanjutan-lanjutannya menguji intervensi genetik dan farmakologis pada nekroptosis jantung. Ketika MLKL dihapus (knockout) pada tikus diabetes, hasilnya protektif: tikus $MLKL^{(-/-)}$ yang diberi STZ menunjukkan fungsi jantung yang lebih terjaga, lebih sedikit nekrosis sel jantung

(evaluasi Evans blue), kadar troponin I serum lebih rendah, dan berkurangnya fibrosis miokard dibanding tikus wild-type diabetik. Dengan kata lain, menghilangkan MLKL mampu mengurangi kerusakan jantung diabetik (tanpa memengaruhi kadar gula atau berat badan, artinya efeknya langsung pada jaringan jantung). Pendekatan knockdown MLKL melalui *shRNA* juga memperlihatkan pengurangan nekrosis kardiomyosit dan cedera jantung pada tikus Akita diabetik. Semua ini membuktikan peran kausal nekroptosis dalam kerusakan jantung diabetes: RIPK3-MLKL aktif menyebabkan hilangnya sel jantung dan disfungsi kontraktile.

Di samping manipulasi gen, penelitian jantung diabetik juga menguji obat antidiabetes modern. Ditemukan bahwa empagliflozin (SGLT2 inhibitor) dan metformin (biguanid) keduanya punya efek menekan nekroptosis pada sel jantung di kondisi hiperglikemia. Empagliflozin dosis farmakologis mengurangi level p-RIPK3 dan p-MLKL pada kardiomyosit yang dipapar glukosa tinggi, dan hal ini diiringi penurunan LDH (kerusakan sel) serta apoptosis/nekrosis total. Metformin menunjukkan efek serupa. Efek perlindungan jantung dari kedua obat ini yang terlihat di klinis (empagliflozin diketahui menurunkan risiko gagal jantung, metformin meningkatkan outcome kardiovaskular) mungkin sebagian melalui reduksi necroptotic cell death di jantung. Selain itu, aktivasi AMPK oleh metformin sesuai dengan mekanisme anti-necroptosis yang sudah dijelaskan sebelumnya.

Temuan kita pada MSC konsisten dengan pola di jantung: glukosa tinggi mengaktifkan RIPK1/RIPK3/MLKL. Bedanya, di MSC kita mengukur ekspresi gen (transkrip), sedangkan di jantung biasanya diukur fosforilasi protein (aktivasi pasca-

translasi). Namun keduanya merefleksikan peningkatan aktivitas jalur. Implikasi penting dari literatur jantung adalah bukti bahwa inhibisi nekroptosis = perlindungan organ. Seperti disebutkan oleh Zhang *et al.*: “*inhibisi kematian kardiomyosit dapat menjadi strategi efektif menurunkan komplikasi jantung pada diabetes*”. Untuk konteks MSC, ini berarti jika nekroptosis MSC dihambat, mungkin fungsi regeneratif MSC dapat dipertahankan lebih baik di jantung diabetik. Bisa dibayangkan, pada terapi sel untuk pasien dengan gagal jantung diabetik, kombinasi pemberian inhibitor RIPK1 (seperti Nec-1s) bersama MSC dapat meningkatkan retensi dan efektivitas sel di miokard yang hiperglikemik/terinflamasi.

Secara keseluruhan, literatur 2015–2025 pada jantung mengukuhkan nekroptosis sebagai target terapi baru pada komplikasi kardial diabetes. Hasil riset kita mendukung konsep ini di level sel punca: jika MSC sendiri rentan nekroptosis di gula tinggi, maka intervensi terhadap jalur ini akan bermanfaat ganda – melindungi sel punca yang ditransplantasi dan sekaligus melindungi sel jantung pasien. Ini membuka peluang menggabungkan terapi sel dengan obat anti-nekroptosis untuk penyakit jantung diabetik di masa depan.

Sel Saraf (Retina, Saraf Tepi, dan Sistem Saraf Pusat)

Diabetes juga menyebabkan komplikasi neurologis, antara lain *diabetic retinopathy (DR)* pada mata dan *diabetic neuropathy* pada saraf tepi. Mekanisme kerusakan neuron dan sel glia pada kondisi ini juga melibatkan nekroptosis.

Pada retina, khususnya sel ganglion retina (RGC) yang penting untuk penglihatan, hiperglikemia diketahui menyebabkan degenerasi. Zhang *et al.* (2021) meneliti ekspresi RIPK1/RIPK3 pada kultur RGC dengan glukosa tinggi (7,5–35 mM). Hasilnya, ekspresi RIPK1 dan RIPK3 meningkat tajam setelah 12 jam paparan D-glukosa 19,5 mM. Penambahan Necrostatin-1 (inhibitor RIPK1) pada medium 19,5 mM berhasil menurunkan ekspresi RIPK1/RIPK3 kembali serta mengurangi kematian nekrotik pada RGC (ditandai peningkatan Nissl bodies sel saraf yang survive). Ini menandakan hiperglikemia dapat langsung menginduksi nekroptosis neuron retina, dan inhibisi RIPK1 efektif melindungi neuron dari *necrotic cell death*. Temuan ini sangat selaras dengan hasil kita: glukosa tinggi memicu jalur RIPK1-RIPK (pada RGC terlihat hingga RIPK3; mereka tidak mengukur MLKL, tapi kemungkinan MLKL juga terlibat eksekusi kematian RGC). Artinya, baik sel punca maupun neuron mature merespons hiperglikemia dengan aktivasi mekanisme kematian serupa.

Pada saraf perifer, terutama *Schwann cell* yang melindungi akson dengan mielin, nekroptosis ternyata berperan dalam *diabetic peripheral neuropathy (DPN)*. Penelitian terbaru oleh Pan *et al.* (PNAS 2022) menunjukkan bahwa aktivasi MLKL di sel Schwann menyebabkan kerusakan mielin saraf tepi pada diabetes. Pada model tikus diabetes, ditemukan peningkatan MLKL (terutama bentuk aktif) di saraf dan otot (indikator kerusakan neuromuskular). Lebih meyakinkan, penghambatan MLKL (baik genetik maupun farmakologis) mencegah kerusakan mielin dan disfungsi saraf. Studi tersebut menyimpulkan MLKL adalah target yang dapat-obati (*druggable target*) baru untuk menangani neuropati diabetik. Sinyal nekroptosis di saraf kemungkinan dipicu

oleh hiperglikemia ditambah faktor-faktor seperti iskemia mikrovaskular dan inflamasi. *Schwann cells* yang mengalami nekroptosis akan melepaskan komponen mielin yang rusak, memicu reaksi inflamasi dan memperburuk neuropati. Hal ini sejalan dengan dideteksinya peningkatan sitokin proinflamasi dan aktivasi *microglia* pada saraf diabetik yang bersamaan dengan nekroptosis.

Keterkaitan ke studi kami, meski MSC bukan neuron atau sel glia, MSC kadang digunakan untuk terapi neuropati (karena dapat membantu regenerasi saraf melalui faktor pertumbuhan). Bila MSC sendiri rentan nekroptosis di lingkungan hiperglikemia neuropati (yang kaya gula dan inflamasi), efektivitasnya turun. Maka, sekali lagi, melindungi MSC dari nekroptosis (contoh: dengan inhibitor MLKL yang tengah dikembangkan) bisa berguna. Menariknya, di bidang neuroregenerasi, kini juga ada konsep memanipulasi nekroptosis untuk *nerve repair*. Sebuah penelitian bahkan menyebut MLKL punya peran “bersahabat” dalam regenerasi saraf jika diaktifkan parsial, namun konteksnya berbeda (bukan pada diabetes). Pada diabetes, data jelas menunjukkan efek merusak dominan.

Selain retina dan saraf perifer, otak pun terdampak jika terjadi diabetes yang tidak terkontrol, terutama dalam kejadian stroke pada pasien diabetes. Seperti disinggung sebelumnya, LaRocca *et al.* melaporkan bahwa kondisi hiperglikemia memperburuk cedera otak iskemik neonatus dengan menggeser kematian sel menuju nekroptosis. Dalam model hipoksia-iskemia otak dengan hiperglikemia, didapati kerusakan neuron lebih luas dibanding normoglikemia, dan hal itu dikaitkan dengan aktivasi RIPK1/ROS (diblok sebagian oleh Nec-1 dan antioksidan). Jadi, pada sistem

saraf pusat pun, hiperglikemia mengaktifkan necrosome dan meningkatkan kerusakan jaringan.

Secara keseluruhan, literatur satu dekade ini menempatkan nekroptosis sebagai benang merah di berbagai komplikasi saraf akibat diabetes: RIPK1/RIPK3/MLKL naik di neuron retina, sel glia perifer, hingga neuron otak, berkontribusi pada neurodegenerasi diabetik. Hasil penelitian ini memperkuat hal tersebut secara fundamental – menunjukkan bahwa sel progenitor manusia pun tidak luput dari efek nekroptosis yang induksi konsentrasi glukosa tinggi. Ini menunjukkan bahwa baik sel matang maupun sel punca sama-sama perlu perlindungan di kondisi hiperglikemia.

Implikasi klinis dari hasil penelitian ini adalah potensi terapi neuroprotektif dengan menarget nekroptosis. Misal, untuk retinopati diabetik, penggunaan Necrostatin-1 atau inhibitor RIPK3 mungkin mencegah hilangnya sel ganglion retina sehingga mencegah progresi kebutaan (tentu butuh formulasi tepat agar masuk retina). Untuk neuropati, penelitian PNAS tadi membuka ide bahwa inhibitor MLKL dapat melindungi mielin – sesuatu yang sangat menarik karena saat ini terapi neuropati terbatas pada simptomatik nyeri. Jika kita bisa *melindungi struktur saraf*-nya dengan menekan nekroptosis, itu revolusioner. Demikian pula, dalam konteks transplantasi MSC untuk stroke/neuropati, merancang MSC yang tahan nekroptosis akan meningkatkan keberhasilan terapi sel.

Implikasi Klinis dan Rekomendasi Ilmiah

Temuan bahwa konsentrasi glukosa tinggi medium menginduksi ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada hUC-MSC yang menandakan aktivasi jalur nekroptosis, memiliki beberapa implikasi klinis penting:

- **Kegagalan Terapi Regeneratif pada Diabetes:** Pada pasien diabetes, terutama yang glukosanya tidak terkontrol, sel-sel endogen untuk perbaikan (seperti MSC di sumsum tulang atau sirkulasi) kemungkinan mengalami stres nekroptosis. Ini bisa menjelaskan mengapa penyembuhan luka pada diabetesi buruk dan fungsi regeneratif menurun – *stem cell niche* mereka berada dalam lingkungan hiperglikemik-inflamasi yang membuat sel punca mudah mati atau senesens. Oleh karena itu, kontrol gula darah yang ketat sejak dini sangat penting untuk melindungi populasi sel punca endogen dan mencegah komplikasi. Implikasi lain, bila akan melakukan terapi sel (transplantasi MSC atau sel induk lainnya) pada pasien diabetes, kondisi glikemik pasien harus dioptimalkan terlebih dahulu. Gula darah yang terlalu tinggi dapat membunuh sel donor via mekanisme nekroptosis sebelum sempat bekerja. Beberapa klinisi menganjurkan pemberian insulin intensif sekitar waktu terapi sel untuk memastikan lingkungan lebih ramah sel.
- **Target Baru untuk Obat Komplikasi Diabetik:** Jalur RIPK1/RIPK3/MLKL muncul sebagai target farmakologis baru. Sejumlah inhibitor spesifik telah dikembangkan di riset (contoh: Necrostatin-1 derivate untuk RIPK1, GSK'872 untuk RIPK3, NSA untuk MLKL). Meskipun belum ada yang diapprove untuk klinik, studi pre-klinik sangat menjanjikan. Misalnya, *Necrostatin-1* terbukti melindungi ginjal tikus diabetes, *inhibitor MLKL* mencegah neuropati pada model hewan, dan defisiensi MLKL melindungi jantung diabetik. Oleh sebab itu, pengembangan obat penekan nekroptosis layak dipercepat sebagai terapi komplikasi diabetes. Terutama untuk *diabetic kidney disease* tahap awal, di mana apoptosis mungkin belum dominan, menghambat nekroptosis bisa mencegah progresi ke gagal ginjal. Juga, pada *diabetic cardiomyopathy*, menghambat RIPK3/MLKL bisa mengurangi hilangnya kardiomiosit sehingga mencegah gagal jantung.
- **Repurposing Obat yang Ada:** Sisi baiknya, beberapa obat diabetes yang sudah ada ternyata memiliki efek anti-necroptosis. Metformin dan SGLT2 inhibitor (empagliflozin) sebagaimana dibahas, dapat menghambat aktivasi RIPK3/MLKL pada sel jantung. Mekanisme ini bisa berkontribusi pada manfaat kardioprotektif dan renoprotektif yang terlihat pada uji klinis (misal, empagliflozin menurunkan progresi nefropati dan risiko rawat inap gagal jantung). Antioksidan seperti NAC juga memperlihatkan efek perlindungan multi-organ dengan menekan ROS-necroptosis. Jadi, rekomendasi ilmiah dari sini: kombinasi terapi antidiabetes dengan antioksidan atau agen peningkat AMPK patut dieksplorasi. Contohnya, apakah menambahkan NAC atau *sulforaphane* (inducer Nrf2) ke terapi standar bisa lebih melindungi ginjal/jantung? Atau bisakah dosis metformin dititras agar cukup menekan nekroptosis di organ target tanpa memicu efek samping? Pertanyaan-pertanyaan ini membuka lahan penelitian translational.
- **Strategi Proteksi MSC dan Terapi Sel:** Bagi ilmuwan dan klinisi di bidang pengobatan regeneratif, temuan ini menggarisbawahi perlunya strategi melindungi MSC dari paparan hiperglikemia. Beberapa rekomendasi: (1) Pre-conditioning MSC – sebelum sel ditransplantasi ke pasien diabetes, sel dapat dipreparasi dalam kultur glukosa tinggi secara bertahap agar beradaptasi (seperti “mengeraskan” sel), atau diberi pretreatment Nec-1 atau antioksidan. Mungkin pula pre-conditioning dengan hipoksia bermanfaat karena hipoksia mengaktifkan HIF-1 α dan sedikit AMPK yang bisa membantu sel menghadapi stres gula tinggi. (2) Rekayasa Genetik MSC – memodifikasi MSC untuk overekspresi gen anti-apoptosis/anti-necroptosis (misal *Bcl-2*, *FLIP*, atau dominan negatif MLKL). Studi telah ada yang menunjukkan MSC

overekspresi *Bcl-2* lebih tahan di transplantasi diabetes. Mungkinkah overekspresi *caspase-8* (untuk mengarahkan ke apoptosis terkontrol daripada nekroptosis) atau *dominant-negative RIPK1* akan meningkatkan kelangsungan MSC? Ini patut diteliti dalam model hewan. (3) Penggunaan co-treatment – misal, bersama MSC diberikan inhibitor RIPK1 sistemik dosis rendah ke pasien untuk fase awal pasca-transplantasi, hingga MSC berhasil menanam diri. Tentu, keamanannya perlu dipastikan, tapi jika window-nya singkat (beberapa hari) mungkin risiko minimal.

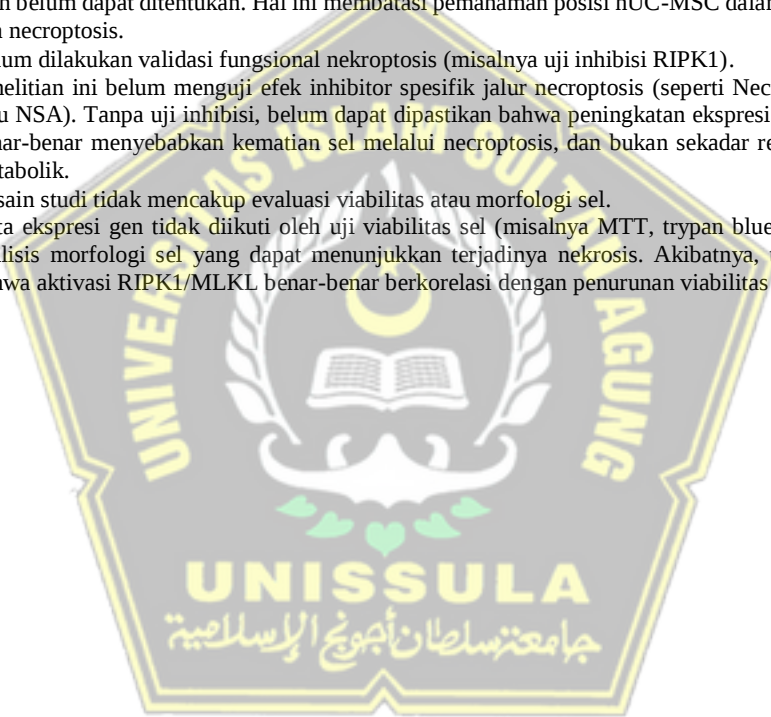
- **Pemantauan Biomarker Nekroptosis:** Implikasi lain untuk klinis adalah potensi **biomarker**. Saat ini, marker kerusakan organ diabetes fokus pada HbA1c, albuminuria, retinal imaging. Mungkin di masa depan, sirkulasi protein MLKL terfosforilasi atau fragmennya bisa dijadikan indikator kerusakan awal organ. Misal, jika pada pasien diabetes terdeteksi peningkatan sirkuler p-MLKL atau kompleks RIPK1 di mononuklir darah, itu peringatan dini bahwa proses nekroinflamasi aktif. Ini masih spekulatif, karena butuh assay sensitif. Namun, ada laporan nekroptosis menghasilkan fragmen spesifik atau microparticle yang bisa diukur. Penelitian ke arah itu bisa membuka cara memantau efektivitas terapi penekan nekroptosis.



5.3 Kelemahan Penelitian

Penelitian ini mempunyai kelemahan:

- Penelitian terbatas pada level ekspresi gen (mRNA) saja.
Studi ini hanya menganalisis ekspresi gen RIPK1 dan MLKL pada level transkripsi menggunakan qRT-PCR. Padahal, aktivasi necroptosis secara fungsional ditentukan oleh level protein dan fosforilasi (misalnya p-RIPK1, p-RIPK3, p-MLKL). Tanpa konfirmasi protein, sulit menyimpulkan bahwa nekroptosis benar-benar berlangsung, karena ekspresi mRNA belum tentu mencerminkan aktivitas biologisnya.
- Tidak mencakup pemeriksaan gen kunci lainnya (contoh: RIPK3, caspase-8)
Jalur necroptosis klasik melibatkan kompleks RIPK1–RIPK3–MLKL, dan biasanya terjadi bila aktivitas caspase-8 terhambat. Karena RIPK3 dan caspase-8 tidak dianalisis, maka gambaran aktivasi jalur secara utuh belum dapat ditentukan. Hal ini membatasi pemahaman posisi hUC-MSC dalam spektrum apoptosis dan necroptosis.
- Belum dilakukan validasi fungsional nekroptosis (misalnya uji inhibisi RIPK1).
Penelitian ini belum menguji efek inhibitor spesifik jalur necroptosis (seperti Necrostatin-1, GSK'872, atau NSA). Tanpa uji inhibisi, belum dapat dipastikan bahwa peningkatan ekspresi gen yang ditemukan benar-benar menyebabkan kematian sel melalui necroptosis, dan bukan sekadar respons terhadap stres metabolik.
- Desain studi tidak mencakup evaluasi viabilitas atau morfologi sel.
Data ekspresi gen tidak diikuti oleh uji viabilitas sel (misalnya MTT, trypan blue), LDH release, atau analisis morfologi sel yang dapat menunjukkan terjadinya nekrosis. Akibatnya, tidak ada konfirmasi bahwa aktivasi RIPK1/MLKL benar-benar berkorelasi dengan penurunan viabilitas hUC-MSC.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa:

1. Ekspresi gen RIPK1 dalam kultur hUC-MSC dengan medium konsentrasi glukosa tinggi (11; 16,5; 22; dan 27,5 mM) meningkat signifikan secara statistik.
2. Ekspresi gen RIPK1 dalam kultur hUC-MSC dengan medium konsentrasi glukosa tinggi (11; 16,5; 22; dan 27,5 mM) meningkat namun tidak signifikan secara statistik.

6.1 Saran

Berdasarkan hasil dan keterbatasan studi ini, berikut beberapa saran yang kami ajukan:

- Validasi Protein:
Perlu dilakukan uji ekspresi protein dan fosforilasi (misalnya Western blot atau immunocytochemistry) untuk RIPK1, RIPK3, dan MLKL guna membuktikan aktivasi necroptosis tidak hanya pada level mRNA tetapi juga secara fungsional.
- Pemeriksaan gen kunci lainnya
Perlu dilakukan penelitian dengan memeriksa gen kunci lain (contoh: RIPK3, caspase-8). Jalur necroptosis klasik melibatkan kompleks RIPK1–RIPK3–MLKL, dan biasanya terjadi bila aktivitas caspase-8 terhambat. Karena RIPK3 dan caspase-8 tidak dianalisis, maka gambaran aktivasi jalur secara utuh belum dapat ditentukan. Hal ini membatasi pemahaman posisi hUC-MSC dalam spektrum apoptosis dan necroptosis.
- Inhibitor Spesifik:
Perlu digunakan inhibitor spesifik jalur necroptosis seperti Necrostatin-1 (RIPK1), GSK'872 (RIPK3), atau NSA (MLKL) untuk membuktikan kausalitas hubungan glukosa tinggi dengan kematian MSC melalui necroptosis.
- Desain studi dengan mengevaluasi viabilitas atau morfologi sel.
Data ekspresi gen diikuti dengan uji viabilitas sel (misalnya MTT, trypan blue), LDH release, atau analisis morfologi sel yang dapat menunjukkan terjadinya nekrosis. Sehingga ada konfirmasi aktivasi RIPK1/MLKL benar-benar berkorelasi dengan penurunan viabilitas hUC-MSC.

DAFTAR PUSTAKA

1. Weng Z, Wang Y, Ouchi T, Liu H, Qiao X, Wu C, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem Cells Transl Med*. 2022 Apr 29;11(4):356–71.
2. Meng F, Xu R, Wang S, Xu Z, Zhang C, Li Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19 : a phase 1 clinical trial. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;(July).
3. Song S, Ding Y, Dai G liang, Zhang Y, Xu M ting, Shen J ru, et al. Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy via necroptosis enhancement and NLRP3 activation. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020;(August).
4. Thomi G, Surbek D, Haesler V, Joerger-messerli M. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia- mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. 2019;1–16.
5. Weng Z, Wang Y, Ouchi T, Liu H, Qiao X, Wu C, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem cells translational medicine*. 2022 Apr;11(4):356–71.
6. Han Y, Sun T, Han Y, Lin L, Liu C, Liu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells implantation accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats via the Wnt signaling pathway. *European Journal of Medical Research*. 2019;1–9.
7. Hildebrand JM, Lo B, Tomei S, Mattei V, Young SN, Fitzgibbon C, et al. A family harboring an MLKL loss of function variant implicates impaired necroptosis in diabetes. *Cell Death and Disease*. 2021;
8. Qiao S, Hong L, Zhu Y, Zha J, Wang A, Qiu J, et al. RIPK1-RIPK3 mediates myocardial fibrosis in type 2 diabetes mellitus by impairing autophagic flux of cardiac fibroblasts. 2022;(March 2021):1–11.
9. Yi W, Ouyang Q. Experimental research Adiponectin improves diabetic nephropathy by inhibiting necrotic apoptosis. 2019;
10. McCaig WD, Patel PS, Sosunov SA, Shakerley NL, Smiraglia TA, Craft MM, et al. Hyperglycemia potentiates a shift from apoptosis to RIP1-dependent necroptosis. *Cell death discovery*. 2018;4:55.

11. Murali K, Mohandas S, Ramkumar K. Dysfunctions, molecular mechanisms, and therapeutic strategies of pancreatic β -cells in diabetes. *Apoptosis*. 2023 Jun 5;28:1–19.
12. Zafarvahedian E, Roohi A, Sepand MR, Ostad SN, Ghahremani MH. Effect of metformin and celecoxib on cytotoxicity and release of GDF-15 from human mesenchymal stem cells in high glucose condition. *Cell Biochemistry & Function*. 2017 Oct;35(7):407–13.
13. Nosrati S, Gheisari M, Zare S, Dara M, Zolghadri S, Razeghian-Jahromi I. The impact of diabetic glucose concentration on viability and cardiac differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*. 2024 Jun;88:102361.
14. Lee SY, Li IH, Tsai WC, Ho MH, Li CH. The investigation of effects, signal pathways, and applications of high glucose on dental pulp stem cells. *Journal of Dental Sciences*. 2025 Jul;20(3):1731–8.
15. Khasawneh RR, Abu-El-Rub E, Almahasneh FA, Alzu'bi A, Zegallai HM, Almazari RA, et al. Addressing the impact of high glucose microenvironment on the immunosuppressive characteristics of human mesenchymal stem cells. *IUBMB Life*. 2024 May;76(5):286–95.
16. Abu-El-Rub E, Almahasneh F, Khasawneh RR, Alzu'bi A, Ghorab D, Almazari R, et al. Human mesenchymal stem cells exhibit altered mitochondrial dynamics and poor survival in high glucose microenvironment. *World J Stem Cells*. 2023 Dec 26;15(12):1093–103.
17. Wang., Liang, Hao., Yuan Y. Regulation of RIP1-Mediated necroptosis via necrostatin-1 in periodontitis.. *Journal of Periodontal Research*. 2023;
18. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis : a regulated inflammatory mode of cell death. 2018;1–9.
19. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis , pyroptosis and apoptosis : an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*. 2021;(October 2020).
20. Hu X, Wang Z, Kong C, Wang Y, Zhu W, Wang W, et al. Necroptosis: A new target for prevention of osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13(October):1–10.
21. Huang D, Zheng X, Wang ZA, Chen X, He WT, Zhang Y, et al. The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process. *Molecular and cellular biology*. 2017 Mar;37(5).

22. Ye K, Chen Z. The double-edged functions of necroptosis. 2023;(February).
23. Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkermann A, Ma D. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death and Disease*. 2015;6(11).
24. Seo J, Nam YW, Kim S, Oh DB, Song J. Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Experimental & Molecular Medicine*. 2021;53(6):1007–17.
25. Liu S, Liu H, Johnston A, Hanna-Addams S, Reynoso E, Xiang Y, et al. MLKL forms disulfide bond-dependent amyloid-like polymers to induce necroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Sep 5;114(36):E7450–9.
26. Garcia LR, Tenev T, Newman R, Haich RO, Lippard G, John SW, et al. Ubiquitylation of MLKL at lysine 219 positively regulates necroptosis-induced tissue injury and pathogen clearance. *Nature Communications*. 2021;12(1).
27. Jacobsen A V., Lowes KN, Tanzer MC, Lucet IS, Hildebrand JM, Petrie EJ, et al. HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death. *Cell Death and Disease*. 2016;7:e2051.
28. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell transplantation*. 2015;24(3):339–47.
29. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World journal of stem cells*. 2014 Apr;6(2):195–202.
30. Chung H, Lee S woo, Hyun M, Kim SY, Cho HG. Curcumin Blocks High Glucose-Induced Podocyte Injury via RIPK3-Dependent Pathway. 2022;10(May):1–12.
31. Lin J, Li X, Lin YAN, Huang Z, Wu WEN. Exogenous sodium hydrosulfide protects against high glucose - induced injury and inflammation in human umbilical vein endothelial cells by inhibiting necroptosis via the p38 MAPK signaling pathway. 2021;
32. Weng L, Tang W shuai, Wang X, Gong Y, Jiang W, Li Y, et al. Surplus fatty acid synthesis increases oxidative stress in adipocytes and induces lipodystrophy. 2024;1–16.
33. Guo M, Chen Q, Huang Y, Wu Q, Zeng Y, Tan X, et al. High Glucose-Induced Kidney Injury via Activation of Necroptosis in Diabetic Kidney Disease. 2023;2023.

34. Yang S, Xu M, Meng G, Lu Y. SIRT3 deficiency delays diabetic skin wound healing via oxidative stress and necroptosis enhancement. 2020;(November 2019):4415–27.
35. Hou Y, Ding W, Wu P, Liu C, Ding L, Liu J, et al. Adipose - derived stem cells alleviate liver injury induced by type 1 diabetes mellitus by inhibiting mitochondrial stress and attenuating inflammation. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;1–16.
36. Kang J, Song Y, Zhang Z, Wang S, Lu Y, Liu X. Identification of Key microRNAs in Diabetes Mellitus Erectile Dysfunction Rats with Stem Cell Therapy by Bioinformatic Analysis of Deep Sequencing Data. 2022;40(154):663–77.
37. Lyu A ra, Kim T hwan, Shin S ae, Kim E hyub, Yu Y, Gajbhiye A, et al. Hearing Impairment in a Mouse Model of Diabetes Is Associated with Mitochondrial Dysfunction , Synaptopathy , and Activation of the Intrinsic Apoptosis Pathway. 2021;1–15.
38. Chu X, Wu S, Raju R. NLRX1 Regulation Following Acute Mitochondrial Injury. 2019;10(October).
39. González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *IJMS*. 2023 May 27;24(11):9352.
40. Son SM. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pathogenesis of Vascular Complications of Diabetes. *Diabetes Metab J*. 2012;36(3):190.
41. Sun L, Xiao Y, San W, Chen Y, Meng G. Dihydromyricetin regulates RIPK3-CaMKII to prevent necroptosis in high glucose-stimulated cardiomyocytes. *Heliyon*. 2024 Apr;10(7):e28921.
42. Mo Y, Mo L, Zhang Y, Zhang Y, Yuan J, Zhang Q. High glucose enhances the activation of NLRP3 inflammasome by ambient fine particulate matter in alveolar macrophages. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 2023 Nov 2 [cited 2025 Jul 16];20(1). Available from: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-023-00552-8>
43. Yang Y, Jiang K, Liu X, Qin M, Xiang Y. CaMKII in Regulation of Cell Death During Myocardial Reperfusion Injury. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2025 Jul 16];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.668129/full>

44. Huang R, Dai Q, Yang R, Duan Y, Zhao Q, Haybaeck J, et al. A Review: PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Its Regulated Eukaryotic Translation Initiation Factors May Be a Potential Therapeutic Target in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Apr 28 [cited 2025 Jul 16];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.817916/full>
45. Cao T, Ni R, Ding W, Ji X, Li L, Liao G, et al. MLKL-mediated necroptosis is a target for cardiac protection in mouse models of type-1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Aug 27;21(1):165.
46. Sousa ESA, Queiroz LAD, Guimarães JPT, Pantoja KC, Barros RS, Epiphanyo S, et al. The influence of high glucose conditions on macrophages and its effect on the autophagy pathway. *Front Immunol* [Internet]. 2023 Apr 12 [cited 2025 Jul 16];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1130662/full>
47. Lee SB, Kim JJ, Han SA, Fan Y, Guo LS, Aziz K, et al. The AMPK–Parkin axis negatively regulates necroptosis and tumorigenesis by inhibiting the necrosome. *Nat Cell Biol*. 2019 Aug;21(8):940–51.
48. Xie Y, Zhao G, Lei X, Cui N, Wang H. Advances in the regulatory mechanisms of mTOR in necroptosis. *Front Immunol* [Internet]. 2023 Dec 18 [cited 2025 Jul 16];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1297408/full>
49. Al-Qarakhli AMA, Yusop N, Waddington RJ, Moseley R. Effects of high glucose conditions on the expansion and differentiation capabilities of mesenchymal stromal cells derived from rat endosteal niche. *BMC Molecular and Cell Biology*. 2019;20(1):51.
50. Shi Y, Yang X, Wang S, Wu Y, Zheng L, Tang Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cell-derived exosomes protect against MCD-induced NASH in a mouse model. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Nov 12;13(1):517.
51. Zhang T, Shen Y, Zhu R, Shan W, Li Y, Yan M, et al. Benzo [a] pyrene exposure promotes RIP1-mediated necroptotic death of osteocytes and the JNK/IL-18 pathway activation via generation of reactive oxygen species. *Toxicology* [Internet]. 2022; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X22001561>