

**PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL*
STEM CELLS (EH-MSCs) TERHADAP KADAR
TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALPHA DAN EKSPRESI
*GLUCOSE TRANSPORTER TYPE 4***

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Galur Wistar Model Diabetes
Melitus Tipe 2)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Magister Ilmu Biomedik

**As'ad Suyudi
MBK 2423010431**

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

TESIS
**PENGARUH EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS (EH-MSCs) TERHADAP KADAR
TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALPHA DAN
EKSPRESI TRANSPORTER GLUKOSA 4**
(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Wistar Model Diabetes Melitus
Tipe 2)

Disusun Oleh:

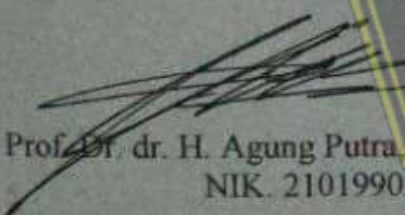
As'ad Suyudi
MBK.24.23.010431

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada
Tanggal 12 Agustus 2025
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui

Pembimbing I,

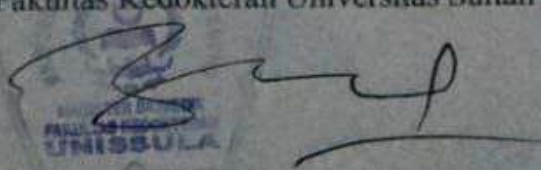
Pembimbing II,


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


Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes
NIK. 220198045

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung


Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS
NIK : 210113160

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil karya saya sendiri dan belum pernah diajukan dalam bentuk apapun kepada suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh telah dijelaskan dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 12 Agustus 2025
Yang Menyatakan,

As'ad Suyudi
MBK. 2423010431



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : As'ad Suyudi
Tempat / tanggal lahir : Pati, 08 Juni 1985
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

SDN 1 Baleadi Sukolilo : Lulus Tahun 1997
SMP N 1 Sukolilo : Lulus Tahun 2000
SMA Muhammadiyah 2 Surakarta : Lulus Tahun 2003
S1 Fakultas kedokteran Unissula Semarang : Lulus Tahun 2008
Profesi Dokter Unissula Semarang : Lulus Tahun 2010
Magister Ilmu Biomedis FK Unissula : 2024 - Sekarang

C. Riwayat keluarga

Nama Istri : dr. Vina Nurdiana Wahdah
Nama Anak : M. Khalis A'ufa Suyudi
M. Khalid Atharauf Suyudi

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan yang Maha Esa, atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga Tesis dengan judul “**Pengaruh Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) Terhadap Kadar Tumor Nekrosis Faktor Alpha dan Ekspresi Glucose Transporter Type 4**” ini dapat diselesaikan.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini, dengan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH.,M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta selaku dosen penguji I.

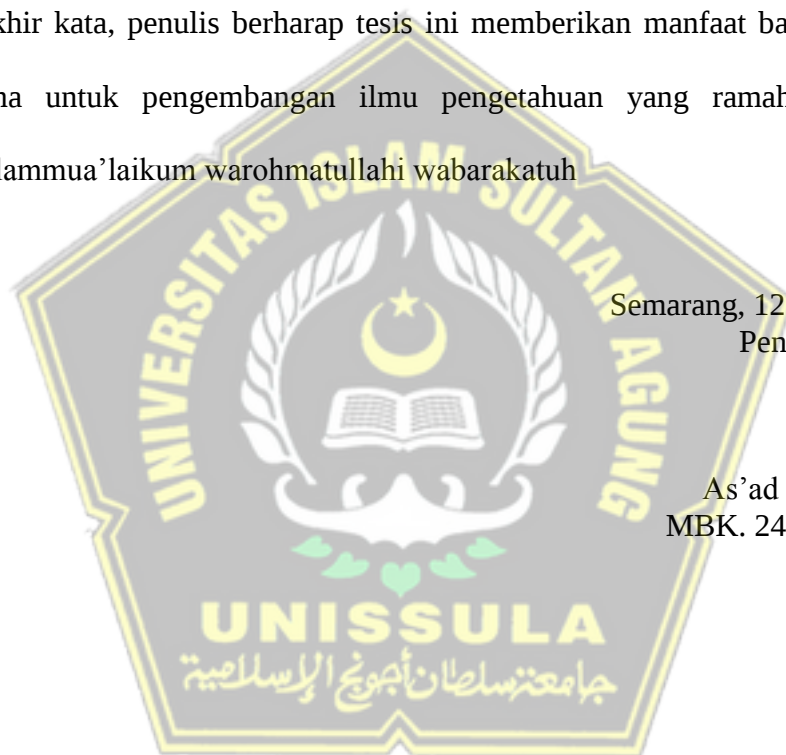
4. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi. Med atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluahkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.
5. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing kedua, yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo Mkes selaku penguji II yang banyak memberikan masukan dalam pelaksanaan penulisan tesis.
7. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku penguji III yang telah memberikan banyak saran saran dalam penyelesaian tesis.
8. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang bermanfaat.
9. Arif Nurudin, M.T selaku Rektor Universitas Muhammadiyah Cirebon yang telah menmbri dukungan selama pendidikan di Program Studi Magister Ilmu Biomedik UNISSULA.
10. Orang tua Tercinta, Bapak H. Sudi, S.pd, Ibu Hj. Masikah., Bapak Alm Prof. DR. H. Khaerul Wahidin M.Ag, Ibu DR. Hj Nurlela M.Ag. Istri tercinta dr Vina Nurdiana Wahdah dan Anak- Anak (M.Khalis A'ufa Suyudi & M.Khalid Atharauf Suyudi) yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa, sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, pengetahuan, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan. Wassalammua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Semarang, 12 Agustus 2025
Penulis,

As'ad Suyudi
MBK. 2423010431



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2.....	9
2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	9
2.2.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2	9
2.2 Tumor Necrosis Factor (TNF- α).....	13
2.3 <i>Glucose Transporter Type 4 (GLUT4)</i>	16
2.4 <i>Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells</i>	18
2.4.1 Definisi <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	18
2.4.2 Pengaruh <i>Hypoxia</i> Terhadap Fungsi MSCs dan <i>Exosomes</i>	20
2.5 Mekanisme TNF- α dan GLUT4 dalam Diabetes mellitus tipe 2.....	21
2.5.1 Mekanisme TNF- α dalam Diabetes mellitus tipe 2	21
2.5.2 Mekanisme GLUT-4 dalam Diabetes mellitus tipe 2	22

2.6	Pengaruh <i>EH-MSCs</i> Terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi GLUT4 ..	23
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....		26
3.1	Kerangka Teori	26
3.2	Kerangka Konsep.....	30
3.3	Hipotesis	30
BAB IV METODE PENELITIAN		31
4.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	31
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian	32
4.2.1.	Populasi Penelitian.....	32
4.2.2.	Sampel Penelitian.....	32
4.2.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	33
4.2.4.	Kriteria Inklusi	34
4.2.5.	Kriteria Eksklusi	34
4.2.6.	Kriteria Drop Out.....	34
4.3	Variabel dan Definisi Operasional.....	35
4.4	Bahan Penelitian	37
4.5	Alat Penelitian.....	37
4.6	Prosedur Penelitian	38
4.6.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	38
4.6.2.	Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	39
4.6.3.	Uji Validasi MSCs	39
4.6.4.	Isolasi <i>EH-MSCs</i>	40
4.6.5.	Teknik Pengumpulan Sampel	41
4.6.6.	Analisis Kadar GLUT4 dan Ekspresi $\text{TNF-}\alpha$	42
4.7	Analisis Data.....	43
4.8	Alur Penelitian	45
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		46
5.1	Hasil Penelitian	46
5.1.1	Isolasi <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)</i>	46

5.1.2	Validasi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus Galur Wistar Model Diabetes Melitus Tipe 2.....	49
5.1.3	Interpretasi Kadar <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (TNF- α) .	52
5.1.4	Interpretasi Ekspresi <i>Glucose Transporter Type 4</i> (GLUT4)	53
5.2	Pembahasan Hasil Penelitian	55
5.3	Keterbatasan Penelitian	58
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		60
6.1	Kesimpulan.....	60
6.2	Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA		62
LAMPIRAN		70



DAFTAR SINGKATAN

Akt2	: Protein Kinase B
EH-MSCs	: Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells
FFA	: Free Fatty Acids
Gel-H-Exos	: Hypoxic exosomes-loaded HGM-QCS hydrogels
GLUT4	: Glucose Transporter Type 4
HbA1c	: Hemoglobin glikosilasi A1c
hADMSCs	: Human adipose-derived mesenchymal stem cells
HUC-MSCs	: Human umbilical cord mesenchymal stem cells
IDF	: International Diabetes Federation
IL-6	: Interleukin-6
IL-10	: Interleukin-10
IL-1 β	: Interleukin-1beta
IRS-1	: Insulin Receptor Substrate-1
LUBAC	: Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinases
MKL1	: Mixed Lineage Domain Kinase
miRNAs	: MicroRNAs
MSCs	: Mesenchymal Stem Cells
MSCs-CM	: Mesenchymal stem cells-conditioned media
MSC-Exos	: Mesenchymal stem cells derived exosomes
NF- $\kappa\beta$	: Nuclear faktor-kappa β
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
PFA	: Paraformaldehyde
PBS	: Phosphate-buffered saline
RIPK1	: Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase
ROS	: Reactive Oxygen Species
T2DM	: Type 2 Diabetes Mellitus
TNF- α	: Hypoxia-Inducible Factor-1 α
TNFR1	: Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRADD	: Tumor Necrosis Factor Receptor type 1-Associated DEATH domain
Th-17	: T-helper 17
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian	5
Tabel 5. 1 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji <i>Kruskal Wallis</i> pada Kadar TNF- α	52
Tabel 5. 2 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji Homogenitas pada Ekspresi GLUT4.....	54



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gangguan insulin pada diabetes. Inflamasi kronis disebabkan oleh peningkatan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α yang mencetuskan aktivasi jalur inflamasi seperti MAPK, NF- κ B, SMAD dan peningkatan ROS yang secara terus menerus akan berdampak pada progresivitas penyakit dan munculnya komplikasi serius. ²⁵	13
Gambar 2.2 Jalur pensinyalan TNF- α . TNF- α yang berikatan dengan TNFR1 mengaktifkan kompleks I α terdiri dari TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2, pro-Caspase-8, dan FADD sehingga mencetuskan jalur inflamasi, nekroptosis, dan apoptosis sel. ³⁶	15
Gambar 2.3 Gangguan GLUT-4 pada resistensi insulin mencegah GLUT-4 bertranslokasi menuju membran plasma untuk selanjutnya berperan dalam penyerapan glukosa. ⁴⁴	17
Gambar 2.4 Mekanisme kerja <i>exosomes</i> secara parakrin dalam berkomunikasi antar sel melibatkan aktivasi reseptor langsung pada sel resepien, modifikasi lingkungan ekstraselular, dan fusi membran dengan pelepasan konten. ⁵⁶	19
Gambar 2.5 <i>EH-MSCs</i> melepaskan banyak sitokin penting seperti VEGF, SDF-1 dan sitokin lainnya. ⁶²	21
Gambar 3.1 Kerangka Teori	29
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	30
Gambar 4.1 Alur Rancangan Penelitian	31
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	45
Gambar 5. 1 (A)Validasi dengan pembesaran mikroskopik 40x di dapatkan morfologi sel MSC berbentuk spindle-like setelah pasase ke-4 MSC (B) Droplet Lipid terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x. (C) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x.....	47
Gambar 5. 2 Validasi MSCs dengan Analisis <i>flow cytometry</i> ekspresi <i>surface marker</i> CD90 (98,70%), CD29 (99.9%), CD45 (0.40%) dan CD31 (3,92%)	48
Gambar 5. 3 Validasi EH-MSCs terhadap ekspresi marker 28,2%, CD63 28,2%, CD9 9.1%.....	49
Gambar 5. 4 Validasi Diabetes. (A) Histopatologi jaringan pankreas dengan pewarnaan H&E pembesaran mikroskopik 400x pada tikus sehat menunjukkan pulau Langerhans yang normal. Terlihat batas pulau yang jelas, inti sel berwarna ungu gelap dan sitoplasma sel yang terg granulasi berwarna merah muda, dan jaringan eksokrin di sekitarnya tampak padat dan teratur. (B) Histopatologi jaringan pankreas tikus diabetes pewarnaan H&E pembesaran mikroskopik 400x. Pulau Langerhans menunjukkan tanda tanda denegerasi berupa inti sel yang berwarna ungu tua terlihat lebih sedikit, sitoplasma yang berwarna merah muda, kehilangan granula sel, dan kontur pulau yang tidak beraturan.	51
Gambar 5. 5 Grafik Kadar TNF- α pada Semua Kelompok Penelitian.....	53
Gambar 5. 6 Grafik Ekspresi GLUT4 pada Semua Kelompok Penelitian	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Ethical Clearance	70
Lampiran 2. Jadwal pelaksanaan penelitian.....	71
Lampiran 3. Surat Keterangan Penelitian	72
Lampiran 4. Kegiatan Penelitian Prakondisi Pada Tikus Model Dm Tipe 2	73
Lampiran 5. Analisa Ekspresi GLUT4 Dengan RT-PCR	74
Lampiran 6. Analisa Kadar Tnf Alpha Dengan ELISA	75
Lampiran 7. Hasil Validasi GDS Tikus Model DM tipe 2	76
Lampiran 8. Hasil Analisis Statistik	78



ABSTRAK

Latar Belakang: *Type 2 Diabetes Mellitus 2 (T2DM)* merupakan gangguan metabolik kronis yang berdampak luas, termasuk risiko komplikasi serius serta tingkat morbiditas yang tinggi. Respon tubuh pada T2DM menunjukkan inflamasi berupa peningkatan $\text{TNF-}\alpha$ yang kemudian menurunkan ekspresi GLUT4 yang berperan dalam proses pengambilan glukosa. *Exosomes hypoxia mesenchymal stem cells (EH-MSCs)* memiliki *MicroRNAs (miRNAs)* yang memiliki kemampuan dalam regulasi cedera sel β pankreas dan resistensi insulin, dalam hal ini tidak hanya menurunkan inflamasi sistemik tetapi juga memperbaiki kerusakan sel. Penelitian ini akan mempelajari lebih lanjut mengenai pengaruh *EH-MSCs* terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi GLUT4 dalam menekan inflamasi pada T2DM

Tujuan: Mengetahui pengaruh *EH-MSCs* terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi GLUT4 pada tikus wistar model diabetes melitus tipe 2 dibandingkan dengan kontrol.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Besar sampel 28 ekor tikus Wistar model T2DM yang terbagi dalam 4 kelompok (K1-K4). Kelompok kontrol negatif (K1) NaCl 0.9% 300 μ L iv, kelompok kontrol positif (K2) metformin 300 mg/kgBB PO, kelompok perlakuan 1 (K3) *EH-MSCs* 250 μ L iv, dan kelompok perlakuan 2 (K4) *EH-MSCs* 500 μ L iv. kadar $\text{TNF-}\alpha$ diperiksa menggunakan ELISA dan ekspresi GLUT4 diperiksa menggunakan qRT-PCR setelah 28 hari perlakuan.

Hasil: Rerata kadar $\text{TNF-}\alpha$ terendah didapatkan pada kelompok K4 (119.82 $\pm$ 12.75). Sedangkan rerata ekspresi GLUT4 tertinggi didapatkan pada kelompok K3 (0.82 $\pm$ 0.88). Hasil uji statistik *Mann Whitney* menunjukkan tidak terdapat perbedaan rerata kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan ($p > 0.05$). Uji statistik *One Way Anova* pada ekspresi GLUT4 menunjukkan tidak terdapat perbedaan rerata ekspresi GLUT4 pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan ($p > 0.05$).

Kesimpulan: Pemberian *EH-MSCs* dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi GLUT4 secara bermakna pada tikus model diabetes mellitus tipe 2.

Kata Kunci: *EH-MSCs, Exosomes, Hypoxia, TNF- α , GLUT4*

ABSTRACT

Background: Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder with widespread impact, including a high risk of serious complications and elevated morbidity rates. The body's response in T2DM shows inflammation characterized by increased TNF- α , which subsequently decreases the expression of GLUT4, a key player in glucose uptake. Exosomes from hypoxia mesenchymal stem cells (EH-MSCs) contain microRNAs (miRNAs) that can regulate cell injury in the pancreas and insulin resistance. These exosomes not only reduce systemic inflammation but also help repair cell damage. This study further investigates the effect of EH-MSCs on TNF- α levels and GLUT4 expression in suppressing inflammation in T2DM.

Objective: To determine the effect of EH-MSCs on TNF- α levels and GLUT4 expression in Wistar rats with a type 2 diabetes mellitus model compared to controls.

Methods: This was an in vivo experimental study using a Post Test Only Control Group Design. A total of 28 Wistar rats with a T2DM model were divided into four groups (K1-K4). Negative control group (K1): NaCl 0.9% 300 μ L intravenously. Positive control group (K2): Metformin 300 mg/kg body weight orally. Treatment group 1 (K3): EH-MSCs 250 μ L intravenously Treatment group 2 (K4): EH-MSCs 500 μ L intravenously. TNF- α levels were measured using ELISA, and GLUT4 expression was assessed using qRT-PCR after 28 days of treatment.

Results: The lowest mean TNF- α level was found in group K4 (119.82 ± 12.75). The highest mean GLUT4 expression was found in group K3 (0.82 ± 0.88). The Mann-Whitney statistical test showed no significant difference in mean TNF- α levels between the control and treatment groups ($p > 0.05$). The One Way Anova statistical test for GLUT4 expression also showed no significant difference in mean GLUT4 expression between the control and treatment groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Administration of EH-MSCs at doses of 250 μ L and 500 μ L did not significantly affect the reduction of TNF- α levels or the expression of GLUT4 in Wistar rats with a type 2 diabetes mellitus model.

Keywords: EH-MSCs, Exosomes, Hypoxia, TNF- α , GLUT4

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Type 2 Diabetes Mellitus 2 (T2DM) merupakan gangguan metabolik kronis yang berdampak luas, termasuk risiko komplikasi serius seperti penyakit kardiovaskular, nefropati, dan neuropati, serta tingkat morbiditas yang tinggi.¹ Pada T2DM terjadi peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang memicu stres oksidatif.² Stres oksidatif ini dapat mencetuskan jalur sinyal inflamasi dalam tubuh yang ditandai dengan peningkatan *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) dan mengganggu regulasi insulin melalui *Glucose Transporter Type 4* (GLUT4) yang berperan penting dalam pengambilan glukosa oleh sel.^{3,4} Saat ini, T2DM ditangani dengan perubahan gaya hidup dan obat anti-hiperglikemia oral seperti metformin, sulfonilurea, dan inhibitor DPP-4.^{5,6} Insulin juga digunakan untuk mengendalikan glukosa darah, terutama pada pasien dengan defisiensi insulin berat.^{5,6} Namun, terapi ini tidak dapat memperbaiki kerusakan sel maupun organ yang telah ditimbulkan dari inflamasi kronis pada T2DM sehingga berlanjut pada berkurangnya respon tubuh terhadap pengambilan glukosa (resistensi insulin) dan komplikasi serius.^{5,6}

Secara global, prevalensi T2DM terus meningkat. Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF), pada tahun 2021 terdapat 537 juta penderita T2DM, dengan proyeksi peningkatan hingga 783 juta pada tahun 2045.⁷ Di Indonesia, prevalensi T2DM juga menunjukkan tren serupa,

meningkat dari 6,9% pada tahun 2013 menjadi 8,5% pada tahun 2018 menurut data Riskesdas.^{4,8} Prevalensi T2DM di Indonesia diproyeksikan meningkat dari 9,19% pada tahun 2020 (18,69 juta kasus) menjadi 16,09% pada tahun 2045 (40,7 juta kasus), sementara angka kematian akibat T2DM dan komplikasinya diperkirakan melonjak 117% selama periode yang sama.⁹ Data tersebut mencerminkan beban besar yang dihadapi sistem kesehatan, baik secara global maupun nasional, serta pentingnya pendekatan inovatif untuk mengurangi prevalensi penderita dan angka komplikasi serta kematian akibat T2DM.

MSC-derived exosomes menjadi salah satu inovasi terapi yang banyak dikembangkan saat ini.¹⁰ *MSC-derived exosomes* memainkan peran penting dalam berbagai jalur interaksi sel-ke-sel yang terkait dengan berbagai fungsi fisiologis dan patologis.¹⁰ Penelitian yang telah dilakukan oleh Chen *et al* sebelumnya telah menjelaskan bahwa *exosomes* yang berasal dari *human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs)* dapat meningkatkan sensitivitas insulin dengan cara memediasi inflamasi dan cedera yang diakibatkan oleh hiperglikemik serta memiliki imunogenisitas yang rendah dibandingkan dengan *human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs)* dan *bone marrow-derived MSCs*.¹¹ Keamanan dan potensi *hUC-MSCs-derived exosomes* sebagai terapi terhadap T2DM terus berkembang hingga penelitian lain menunjukkan *hUC-MSCs-derived exosomes* yang diprakondisikan hipoksia dapat mempercepat proses angiogenesis dan

menekan inflamasi melalui polarisasi makrofag pada ulkus diabetes dibandingkan dengan normosik *hUC-MSCs-derived exosomes*.¹²

Respon tubuh pada T2DM menunjukkan peningkatan TNF- α dan sitokin pro-inflamasi lainnya seperti interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) yang kemudian inflamasi ini juga dapat menurunkan ekspresi GLUT4, yang banyak ditemukan pada adiposit dan otot, dalam proses pengambilan glukosa.¹³ *MSC-derived exosomes* memiliki *MicroRNAs (miRNAs)* yang dapat diterima oleh tubuh lalu berperan dalam regulasi cedera sel β pankreas dan resistensi insulin, dalam hal ini tidak hanya menurunkan inflamasi sistemik tetapi juga memperbaiki kerusakan sel.^{14,15} Hal ini didukung oleh Shalaby MS, *et al* dalam studinya yang membandingkan kelompok tikus dengan diabetes yang diberikan glimepiride, *MSC-derived exosomes* yang diinfuskan setiap hari dan *MSC-derived exosomes* yang disuntikkan langsung pada pankreas, hasil menunjukkan penurunan signifikan sitokin pro-inflamasi TNF- α , ekspresi mediator inflamasi *nuclear faktor-kappa β (NF- $\kappa\beta$)*, dan interleukin-1 β (IL-1 β) serta peningkatan signifikan pada sitokin anti-inflamasi IL-10 pada kelompok tikus yang diberi *MSC-derived exosome*.¹⁶

Besarnya potensi terapeutik *MSC-derived exosome* terutama *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* dalam pengelolaan T2DM perlu dipelajari lebih lanjut. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan mempelajari lebih lanjut mengenai pengaruh *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap kadar TNF- α dan ekspresi

GLUT4 dalam menekan inflamasi pada T2DM. Dengan harapan penelitian ini dapat menjadi dasar untuk pengembangan terapi pada penderita T2DM.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap kadar *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)* dan ekspresi *Glucose Transporter Type 4 (GLUT4)* pada tikus Wistar model Diabetes Melitus Tipe 2?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk Mengetahui pengaruh pemberian *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap kadar *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)* dan ekspresi *Glucose Transporter Type 4 (GLUT4)* pada tikus wistar model diabetes melitus tipe 2 dibandingkan dengan kontrol.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain:

1. Menganalisa kadar *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)* pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 setelah pemberian *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)*.
2. Menganalisa ekspresi *Glucose Transporter Type 4 (GLUT4)* pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 setelah pemberian *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)*.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1.	Chen Mt, Zhao Yt, Zhou Ly, Li M, Zhang Q, Han Q, et al. CURR MED SCI.2021;41: 87–93. ¹¹	<i>Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Enhance Insulin Sensitivity in Insulin Resistant Human Adipocytes</i>	Eksperi mental in vivo	<i>Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs)</i> memiliki imunogenisitas yang rendah dan dapat meningkatkan sensitivitas insulin lebih signifikan dibandingkan dengan MSCs lainnya.
2.	Cheng P, Xie X, Hu L, Zhou W, Mi B, Xiong Y, Xue H, et al. Bioact Mater. 2023 Nov 10;33:157-173. ¹²	<i>Hypoxia endothelial cells-derived exosomes facilitate diabetic wound healing through improving endothelial cells function and promoting M2 macrophages polarization</i>	Eksperi mental in vivo	<i>Hypoxic exosomes-loaded HGM-QCS hydrogels (Gel-H-Exos)</i> yang diganti pada hari ke 0,3,7,10 dan 14 dapat meningkatkan penyembuhan luka diabetes dengan memperbaiki fungsi sel endotel dan mendorong polarisasi makrofag M2 dibandingkan <i>normoxic exosomes-loaded HGM-QCS hydrogels (Gel-N-Exos)</i>
3.	Sazil BI, Lindarto D, Hasan R, Putra A, Pranoto A, Sembiring RJ, Ilyas S, Syafril S. Med Arch. 2023 APR; 77(2): 90-96. ¹⁷	<i>Secretome of Hypoxia Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease</i>	Experi mental in vivo	Injeksi <i>Secretome of Hypoxia Preconditioned Mesenchymal Stem Cells</i> pada hari ke 1,3,5,7,10 dan 14 menunjukkan peningkatan angiogenesis melalui peningkatan ekspresi VEGF dan CD31 secara signifikan. Pada jaringan otot tikus diabetes dengan <i>peripheral artery disease</i> .
4.	Shalaby MS, Abdel-Reheim ES, Almanaa TN, Alhaber LA, Nabil A, Ahmed OM, et al. Regenerative Therapy. 2025;28:1-11. ¹⁶	<i>Therapeutic effects of mesenchymal stem cell conditioned media on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats</i>	Experi mental in vivo	MSCs-CM yang disuntikkan langsung ke pankreas dalam dosis tunggal (0.5 mL) dan pemberian intravena (0.5 mL) rutin setiap hari selama 28 hari dibandingkan dengan obat antidiabetik standar, glimepiride pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin berpengaruh pada peningkatan yang signifikan pada kadar glukosa darah dan hemoglobin glikosilasi A1c (HbA1c), panel lipid, dan penanda terkait apoptosis pankreas. Selain itu,

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
				perawatan tersebut menghasilkan penekanan stres oksidatif dan peningkatan antioksidan.
5.	Khalil Y, Hussein R, El-Kholy W. Int. J. Adv. Res.2024;12(08): 1188-1199. ¹⁸	<i>Anti inflammatory and anti-apoptotic therapeutic effects of Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes on the Pancreas of Streptozotocin-diabetic Rats</i>	Eksperimental in vivo	Pemberian MSC-Exos dosis tunggal 500 µg/mL secara intravena pada tikus Wistar yang diinduksi diabetes menunjukkan efek anti-inflamasi, anti-apoptotik, dan regeneratif, yang membantu mengembalikan kadar glukosa dan insulin mendekati normal serta memperbaiki struktur pankreas.

Berdasarkan tabel 1.1, Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa *Exosomes* dari *hUC-MSCs* memiliki potensi terapi dan profil keamanan yang secara signifikan lebih baik dibandingkan *exosomes* dari sumber MSCs lainnya, sehingga pada penelitian ini mempelajari lebih lanjut *exosomes* dari *hUC-MSCs* yang diprakondisikan hipoksia untuk kasus T2DM.¹¹ *EH-MSCs* pada penelitian sebelumnya belum pernah diberikan secara sistemik intravena meskipun pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *EH-MSCs* dapat mempercepat angiogenesis dan modulasi inflamasi melalui polarisasi makrofag lebih baik dibandingkan dengan normosik *MSC-derived exosomes* sehingga penyembuhan luka lebih cepat karena inflamasi terkontrol pada kasus ulkus diabetes dan *peripheral artery disease*.^{12,17}

Penelitian oleh Shalaby MS, *et al* menunjukkan pemberian dosis tunggal 0.5 mL normosik *MSC-derived exosomes* pada pankreas dan sistemik intravena setiap hari selama 28 hari dapat memberikan perbaikan pada tikus model diabetes sedangkan pada penelitian oleh Khalil Y, *et al* menunjukkan pemberian normosik *MSC-derived exosomes* secara intravena dosis tunggal

(500 $\mu\text{g/mL}$) mampu menekan inflamasi pada tikus model diabetes salah satunya $\text{TNF-}\alpha$ yang diambil dari jaringan pankreas.^{16,18} Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini yang akan mempelajari pengaruh *EH-MSCs* yang diberikan secara intravena dengan variasi dosis dan waktu terhadap $\text{TNF-}\alpha$ dan GLUT4.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

1. Memperluas wawasan ilmiah tentang mekanisme kerja *EH-MSCs* dalam menekan peradangan dan memperbaiki cedera akibat hiperglikemia pada T2DM.
2. Menambah literatur ilmiah terkait inovasi terapi berbasis *EH-MSCs* khususnya pada pengelolaan penyakit diabetes mellitus tipe 2 (DMT2).
3. Memberikan landasan teoritis untuk penelitian lebih lanjut mengenai *EH-MSCs* sebagai potensi terapi non-invasif untuk T2DM.

1.5.2. Manfaat Praktis

1. Membantu pengembangan terapi klinis berbasis *EH-MSCs* untuk pengelolaan T2DM yang lebih aman, efektif, dan berkelanjutan.
2. Memberikan alternatif terapi yang lebih terarah dalam menurunkan resistensi insulin dan komplikasi DMT2 melalui modulasi inflamasi dan perbaikan dari kerusakan sel akibat hiperglikemik.

3. Mendukung aplikasi *EH-MSCs* dalam praktik klinis dengan bukti ilmiah yang kuat, sehingga dapat mempercepat penerapan terapi regeneratif berbasis stem cell untuk pasien T2DM.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2

2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus Tipe 2

Diabetes Mellitus Tipe 2 (T2DM) merupakan gangguan metabolik kronik yang ditandai oleh hiperglikemia persisten akibat resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin. Kondisi ini telah menjadi masalah kesehatan global dengan prevalensi yang terus meningkat, diperkirakan mempengaruhi sekitar 463 juta orang dewasa pada tahun 2019 dan diproyeksikan akan meningkat menjadi 643 juta pada tahun 2030.¹⁹

Diagnosis T2DM dapat ditegakkan melalui pemeriksaan glukosa plasma puasa ≥ 180 mg/dL, glukosa plasma 2 jam post-TTGO ≥ 200 mg/dL, HbA1c $\geq 6.5\%$, atau glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL dengan gejala klasik. Gejala klasik T2DM meliputi poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan.²⁰

2.2.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2

Patofisiologi T2DM melibatkan delapan kelainan yang dikenal sebagai "*ominous octet*" yaitu, (1) disfungsi sel beta pankreas, (2) peningkatan produksi glukosa hepar, (3) resistensi insulin pada otot skeletal, (4) peningkatan lipolisis pada jaringan adiposa, (5) defisiensi efek inkretin, (6) hiperglukagonemia dari sel alfa pankreas, (7)

peningkatan reabsorpsi glukosa di ginjal, dan (8) disfungsi neurotransmitter.^{19,21}

1. Disfungsi Sel Beta Pankreas

Disfungsi sel beta pankreas adalah salah satu komponen kunci dalam *ominous octet*. Sel beta bertanggung jawab untuk sekresi insulin, hormon yang mengatur kadar glukosa darah. Pada tahap awal perkembangan penyakit, sel beta pankreas berusaha mengkompensasi lonjakan glukosa darah (hiperglikemik) dengan meningkatkan sekresi insulin untuk mempertahankan homeostasis glukosa.²¹

Apabila kondisi hiperglikemik berlangsung secara terus menerus, akan terjadi penurunan kemampuan sel beta (*exhausted*) untuk memproduksi insulin secara adekuat. Penelitian menunjukkan bahwa individu dengan toleransi glukosa terganggu dapat kehilangan lebih dari 80% fungsi sel beta mereka sebelum diagnosis diabetes ditegakkan.³

2. Peningkatan Produksi Glukosa di Hepar

Hati berperan penting dalam regulasi glukosa darah melalui proses gluconeogenesis dan glikogenolisis. Pada T2DM, terjadi peningkatan produksi glukosa oleh hati meskipun kadar glukosa dalam darah tinggi. Hal ini disebabkan oleh resistensi insulin pada hepatosit.³

3. Resistensi Insulin pada Otot Skeletal

Resistensi insulin pada otot skeletal menyebabkan penurunan pengambilan glukosa, yang berkontribusi terhadap hiperglikemia kronis. Pada kondisi normal, insulin memfasilitasi translokasi GLUT4 ke membran sel otot, namun pada T2DM, proses ini terganggu sehingga mengakibatkan penurunan pengambilan glukosa oleh otot.³

4. Peningkatan Lipolisis pada Jaringan Adiposa

Ketika lemak disimpan di jaringan adiposa terpecah menjadi asam lemak bebas, terjadi peningkatan kadar asam lemak dalam sirkulasi, yang berpotensi mengganggu fungsi insulin dan memperburuk kondisi metabolik.²²

5. Defisiensi Efek Incretin

Incretin adalah hormon yang dilepaskan dari usus setelah makan dan berfungsi untuk meningkatkan sekresi insulin. Pada T2DM, efek incretin berkurang akibat resistensi terhadap GLP-1 dan GIP, sehingga mengurangi respons insulin setelah makan dan berkontribusi terhadap hiperglikemia postprandial.²³

6. Hiperglukagonemia dari Sel Alfa Pankreas

Sel alfa pankreas menghasilkan glukagon, hormon yang meningkatkan kadar glukosa darah dengan merangsang produksi glukosa oleh hati. Pada T2DM, terdapat peningkatan sekresi

glukagon meskipun kadar glukosa darah tinggi yang memperburuk hiperglikemia.³

7. Peningkatan Reabsorpsi Glukosa di Ginjal

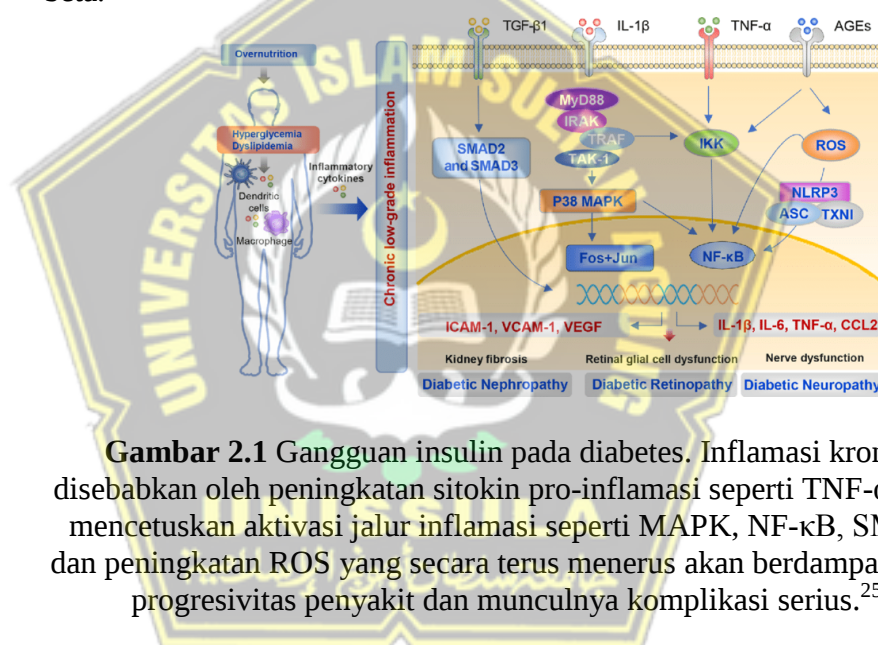
Ginjal berperan dalam homeostasis glukosa dengan menyaring dan mengabsorpsi kembali glukosa dari urin. Pada T2DM, terjadi peningkatan reabsorpsi glukosa di ginjal akibat upregulasi transporter SGLT-2, yang mencegah ekskresi glukosa melalui urin dan berkontribusi pada hiperglikemia.³

8. Disfungsi Neurotransmitter

Disfungsi neurotransmitter pada otak memainkan peran penting dalam patogenesis T2DM. Insulin berfungsi untuk menekan nafsu makan melalui pusat pengatur nafsu makan di otak. Namun, kurangnya asupan glukosa pada sel tubuh menyebabkan disfungsi neurotransmitter sehingga otak memberikan respon yang dapat menyebabkan peningkatan nafsu makan dan berat badan.³

Kondisi hiperglikemik kronis mencetuskan berbagai mekanisme pada tingkat molekuler termasuk gangguan pada jalur sinyal *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)/ phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Protein Kinase B (Akt2)*, peningkatan sitokin proinflamasi, dan akumulasi lipid sehingga terjadi resistensi insulin.²⁴ Kondisi hiperglikemia kronis juga mengaktifkan jalur stres oksidatif yang berkontribusi pada kerusakan sel beta pankreas.¹⁹

Pola makan yang berlebihan menjadi pencetus inflamasi kronis tingkat rendah yang berperan penting dalam patogenesis T2DM. Pada inflamasi kronis terjadi induksi infiltrasi makrofag dan hipoksia kronis, menyebabkan pelepasan faktor proinflamasi seperti IL-1 yang mengganggu jalur sinyal insulin.¹⁹ Aktivasi jalur NF- κ B oleh metabolit berlebih dan faktor inflamasi seperti TNF- α memperburuk resistensi insulin salah satunya dengan menurunkan GLUT4 dan disfungsi sel beta.²¹



Gambar 2.1 Gangguan insulin pada diabetes. Inflamasi kronis disebabkan oleh peningkatan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α yang mencetuskan aktivasi jalur inflamasi seperti MAPK, NF- κ B, SMAD dan peningkatan ROS yang secara terus menerus akan berdampak pada progresivitas penyakit dan munculnya komplikasi serius.²⁵

2.2 Tumor Necrosis Factor (TNF- α)

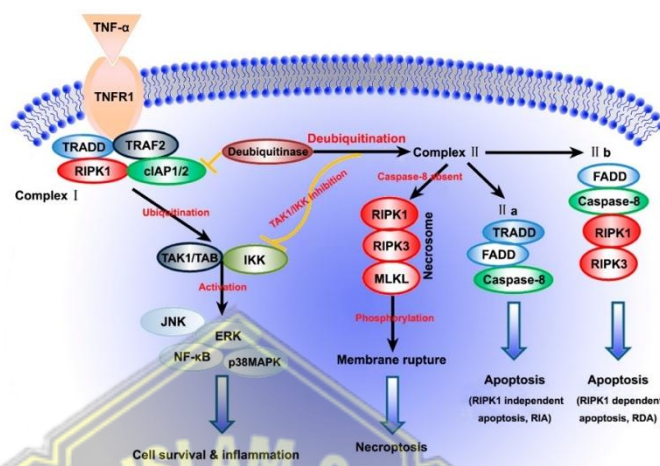
Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) merupakan sitokin proinflamasi yang memiliki peran sentral dalam pengaturan respons imun dan inflamasi.²⁶ Sitokin TNF- α dihasilkan oleh sel-sel sistem imun seperti makrofag dan sel T yang bertugas untuk memulai dan mempertahankan proses inflamasi yang diperlukan untuk melawan infeksi dan memperbaiki jaringan rusak.²⁷ Namun,

ketika produksi TNF- α tidak terkontrol, dapat terjadi peradangan kronis yang berkontribusi pada berbagai penyakit autoimun dan metabolik seperti T2DM.²⁷

Ikatan antara TNF- α dengan reseptornya, TNFR1, dapat memicu pembentukan kompleks pensinyalan yang berbeda, disebut sebagai kompleks I, IIa, IIb, dan IIc, yang menghasilkan respons seluler yang berbeda.^{28,29} Selama aktivasi kompleks I, TNFR1 yang teraktivasi berikatan dengan TRADD, diikuti oleh asosiasi dan interaksi berbagai komponen, termasuk *Reseptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1* (RIPK1), faktor terkait TNFR 2 atau 5 (TRAF2/5), *inhibitor cellular protein apoptosis 1* atau 2 (cIAP1/2), dan *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex* (LUBAC).³⁰ Jalur pensinyalan ini NF- κ B dan *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK). Hasil fungsional dari pensinyalan kompleks I dikenal sebagai induksi inflamasi, kelangsungan hidup dan proliferasi dan pertahanan kekebalan sel terhadap patogen.^{31,32}

Selain kompleks I yang tersusun di membran plasma, kompleks IIa, IIb, dan IIc tersusun di sitoplasma.³³ Aktivasi TNFR1 juga akan mengaktifkan kompleks IIa terdiri dari TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2, pro-Caspase-8, dan *Fas-Associated Protein With Death Domain* (FADD).²⁸ Kompleks IIb memiliki komposisi yang sama dengan kompleks IIa dengan penambahan RIPK3.²⁸ Pembentukan kompleks IIa dan IIb (juga dikenal sebagai apoptosom) yang mengaktifkan caspase-8 dan memicu apoptosis.^{29,34} Kompleks IIc (dikenal sebagai nekrosom), tersusun atas RIPK1 dan RIPK3, mengaktifkan

Mixed Lineage Domain Kinase (MLKL)-like protein melalui fosforilasi yang dimediasi RIPK3, yang menginduksi nekroptosis dan inflamasi.³⁵



Gambar 2.2 Jalur pensinyalan TNF- α . TNF- α yang berikatan dengan TNFR1 mengaktifkan kompleks Iia terdiri dari TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2, pro-Caspase-8, dan FADD sehingga mencetuskan jalur inflamasi, nekroptosis, dan apoptosis sel.³⁶

TNFR2 dapat diaktifkan sepenuhnya oleh TNF- α , terutama dalam interaksi antar sel. Tidak seperti TNFR1, TNFR2 tidak memiliki domain kematian sehingga tidak dapat menginduksi kematian sel terprogram secara langsung.³⁷ Selama perakitan, TNFR2 merekrut TRAF2 bersama dengan TRAF1, cIAP1, dan cIAP2, dan kompleks ini memungkinkan aktivasi hilir NF- κ B, MAPKs, dan AKT.³⁷ Secara fungsional, TNFR2 terutama terkait dengan bioaktivitas homeostatis, termasuk regenerasi jaringan, proliferasi sel, dan kelangsungan hidup sel.⁴⁷ Namun, jalur ini juga diketahui memicu respons inflamasi dan kekebalan sel terhadap patogen. Secara keseluruhan, TNFR sangat penting untuk menginduksi respons TNF- α sitotoksik dan proinflamasi, sementara TNFR2 sebagian besar dapat memediasi aktivasi, migrasi, atau proliferasi sel.³⁸ Secara fisiologis, TNF- α merupakan komponen penting untuk

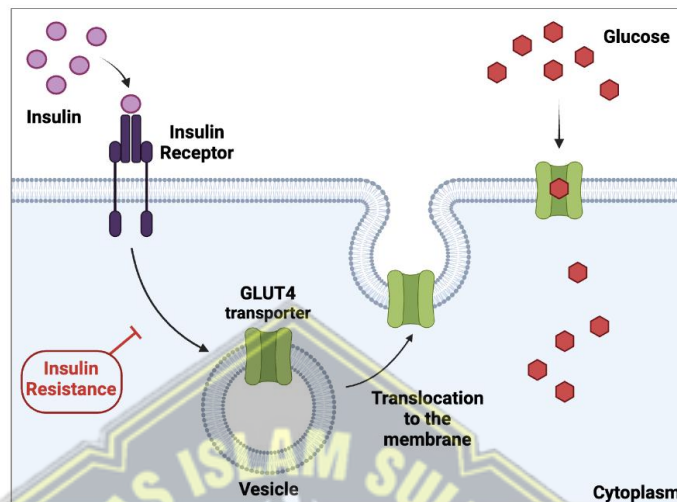
respon imun yang normal. TNF- α dapat mengaktifkan sistem kekebalan untuk mengatur; namun, produksi TNF α yang berlebihan dapat berbahaya dan menyebabkan penyakit.³⁹

2.3 *Glucose Transporter Type 4 (GLUT4)*

Glucose Transporter Type 4 (GLUT4), adalah protein penting yang memfasilitasi transportasi glukosa ke dalam sel, terutama di jaringan otot dan adiposa.⁴⁰ Peran GLUT-4 sangat krusial dalam menjaga homeostasis glukosa di dalam tubuh, terutama setelah makan ketika kadar glukosa darah meningkat.⁴⁰ Regulasi GLUT4 terutama dimediasi oleh insulin, yang disekresikan oleh pankreas sebagai respons terhadap peningkatan kadar glukosa darah.⁴¹ Ketika insulin mengikat reseptornya pada sel target, serangkaian peristiwa sinyal terjadi yang menyebabkan translokasi GLUT4 dari vesikel penyimpanan intraseluler ke membran plasma.⁴¹ Proses ini secara signifikan meningkatkan penyerapan glukosa ke dalam sel otot dan lemak, sehingga menurunkan kadar glukosa darah.⁴⁰

Ketika kehadiran insulin merangsang eksositosis vesikel ini, memungkinkan GLUT4 untuk menuju membran plasma.⁴² Translokasi ini adalah proses yang diatur dengan ketat yang melibatkan berbagai protein dan jalur sinyal, misalnya, GTPase kecil seperti protein-Rab memainkan peran penting dalam pengangkutan dan fusi GSV dengan membrane plasma.⁴² Sifat dinamis dari pengangkutan GLUT4 berarti bahwa ia dapat merespons

perubahan kadar insulin dengan cepat, menjadikannya komponen vital dalam regulasi glukosa selama keadaan makan dan puasa.⁴³



Gambar 2.3 Gangguan GLUT-4 pada resistensi insulin mencegah GLUT-4 bertranslokasi menuju membran plasma untuk selanjutnya berperan dalam penyerapan glukosa.⁴⁴

Peran GLUT4 tidak hanya terbatas pada perannya dalam penyerapan glukosa namun juga mempengaruhi kesehatan metabolik secara keseluruhan. Gangguan fungsi GLUT4 atau mekanisme pengangkutannya terlibat dalam resistensi insulin dan T2DM. Pada kondisi inflamasi kronis, jalur sinyal yang biasanya mempromosikan translokasi GLUT4 dapat terganggu, menyebabkan penurunan penyerapan glukosa dan hiperglikemia yang persisten.^{45,46} Hubungan ini menunjukkan bahwa GLUT4 tidak hanya berfungsi sebagai transporter tetapi juga sebagai target terapeutik potensial untuk meningkatkan sensitivitas insulin dan mengelola diabetes.⁴⁰

2.4 *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells*

2.4.1 Definisi *Mesenchymal Stem Cells*

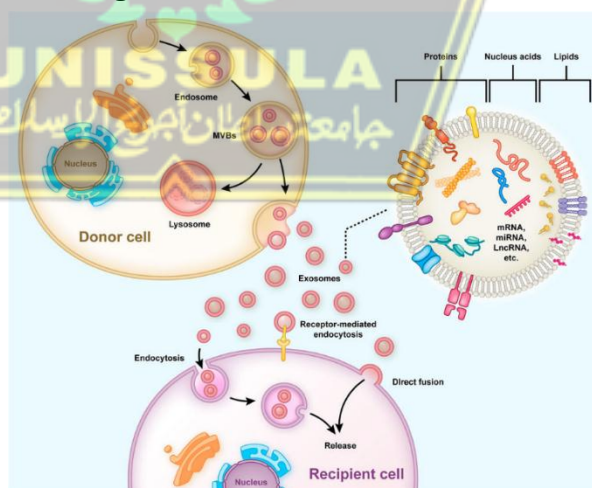
Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit.⁴⁷ MSCs dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, *bone marrow*, hingga *wharton jelly* dari tali pusat.⁴⁷ Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel *fibroblast* atau jarum.⁴⁸ Secara *fenotype*, MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat *osteogenic*.⁴⁹

Exosomes yang berasal dari MSCs merupakan vesikel berbentuk bulat dengan lapisan lipid ganda berukuran 40-100 nm.⁵⁰ Pembentukannya terjadi melalui proses kompleks yang melibatkan invaginasi membran plasma, pembentukan endosom awal, dan akhirnya pelepasan melalui fusi membran.^{51,52} Struktur nano ini mengandung berbagai komponen bioaktif, termasuk protein, asam nukleat, lipid, dan berbagai molekul pengatur yang memungkinkan komunikasi antar sel yang canggih.⁵³

Potensi terapeutik *exosomes* yang berasal dari MSCs mencakup berbagai aplikasi. Dalam penyembuhan luka, mereka meningkatkan

proliferasi fibroblas, mendorong pembentukan pembuluh darah baru, dan mengatur respons imun melalui transfer miRNAs spesifik.⁵² Pada pengobatan diabetes, *exosome* menunjukkan kemampuan untuk menghambat peradangan pulau Langerhans dan meningkatkan sensitivitas insulin.⁵⁴

Keunggulan *exosomes* yang berasal dari MSCs dibandingkan terapi sel langsung terletak pada stabilitas biologis yang lebih baik, imunogenisitas yang lebih rendah, dan kemampuan untuk melewati penghalang biologis.^{51,53} Mekanisme kerjanya melibatkan tiga jalur utama: aktivasi reseptor langsung pada sel target, modifikasi lingkungan ekstraselular, dan fusi membran dengan pelepasan konten berikutnya.⁵³ Melalui mekanisme ini, *exosome* yang berasal dari MSC dapat mempengaruhi berbagai proses seluler, termasuk perbaikan jaringan, imunomodulasi, dan regenerasi sel.⁵⁵



Gambar 2.4 Mekanisme kerja *exosomes* secara parakrin dalam berkomunikasi antar sel melibatkan aktivasi reseptor langsung pada sel resepien, modifikasi lingkungan ekstraselular, dan fusi membran dengan pelepasan konten.⁵⁶

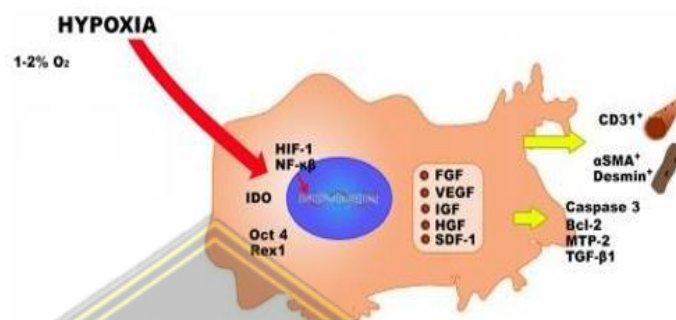
2.4.2 Pengaruh *Hypoxia* Terhadap Fungsi MSCs dan *Exosomes*

Hypoxia secara signifikan mempengaruhi berbagai aspek biologi MSCs, termasuk viabilitas sel, proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan metabolisme.⁵⁷ Ketika dikultur dalam kondisi *hypoxia* (biasanya 1-10% O₂), MSC menunjukkan aktivitas proliferasi yang meningkat dibandingkan dengan kondisi normoksia (21% O₂).⁵⁷ Peningkatan proliferasi ini kemungkinan disebabkan oleh aktivasi *Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha* (HIF-1 α), yang mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam kelangsungan hidup sel dan metabolisme.⁵⁸

Hypoxia merangsang aktivitas parakrin MSCs, menyebabkan peningkatan sekresi faktor pertumbuhan dan sitokin contohnya, MSCs yang diinduksi *hypoxia* dapat menghasilkan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) yang lebih tinggi, yang sangat penting untuk angiogenesis dan perbaikan jaringan.⁵⁹ Efek parakrin yang ditingkatkan ini berkontribusi pada potensi terapeutik MSCs yang dikondisikan *hypoxia* dalam berbagai model penyakit.

Exosomes yang berasal dari MSCs yang dikondisikan *hypoxia* (EH-MSCs) menunjukkan potensi terapeutik yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang berasal dari MSCs normoksia.⁶⁰ *Exosomes* tersebut mengandung tingkat faktor pro-angiogenik, protein anti-apoptosis, dan miRNA spesifik yang lebih tinggi yang berkontribusi pada perbaikan dan regenerasi jaringan.⁶¹ Beberapa penelitian telah

menunjukkan bahwa *EH-MSCs* lebih efektif dalam perbaikan jantung setelah infark miokard, meningkatkan penyembuhan luka, dan mendukung regenerasi tulang.⁵⁹



Gambar 2.5 *EH-MSCs* melepaskan banyak sitokin penting seperti VEGF, SDF-1 dan sitokin lainnya.⁶²

Hypoxia menginduksi ekspresi HIF-1 α dalam MSCs, yang pada gilirannya meningkatkan produksi berbagai faktor pelindung yang dikemas ke dalam *exosome* termasuk faktor angiogenik (VEGF, angiopoietin-1), protein kelangsungan hidup (P65, P50), dan protein anti-apoptosis (Bcl-xL, Bcl-2).⁶¹ Selain itu, *hypoxia* mengubah profil miRNA dari *exosomes* yang berasal dari MSCs, memperkaya mereka dengan miRNA yang mempromosikan perbaikan dan regenerasi jaringan.⁵⁹

2.5 Mekanisme TNF- α dan GLUT4 dalam Diabetes mellitus tipe 2

2.5.1 Mekanisme TNF- α dalam Diabetes mellitus tipe 2

TNF- α adalah sitokin pro-inflamasi yang memainkan peran penting dalam patogenesis T2DM. TNF- α dihasilkan dalam jumlah tinggi oleh jaringan adiposa dan telah terbukti mengganggu jalur sinyal

insulin.²⁶ Salah satu mekanisme utama adalah melalui fosforilasi serin pada IRS-1, yang menghambat aktivitas tirosin kinase dari reseptor insulin, sehingga mengurangi efektivitas sinyal insulin untuk mengatur pengambilan glukosa pada jaringan seperti otot rangka dan adiposa.²⁶ Selain itu, TNF- α meningkatkan ekspresi *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B), yang bertindak sebagai regulator negatif dari sinyal insulin dengan defosforilasi residu tirosin pada IRS-1 dan reseptor insulin.⁶³

Penelitian terdahulu menunjukkan peningkatan TNF- α pada resistensi insulin berawal dari peningkatan lipolisis, yang menghasilkan kadar *free fatty acid* (FFA) lebih tinggi dalam sirkulasi darah dimana FFA dapat mengaktifkan jalur inflamasi tambahan, seperti jalur MAPK dan NF- κ B.⁶⁴ Meskipun bukti eksperimental mendukung peran TNF- α dalam resistensi insulin, hasil klinis pada manusia masih bervariasi. Beberapa studi menunjukkan bahwa netralisasi TNF- α melalui penggunaan antibodi atau reseptor rekombinan tidak secara konsisten meningkatkan sensitivitas insulin pada pasien T2DM.⁶⁵ Meskipun TNF- α adalah target potensial untuk terapi, dibutuhkan pendekatan yang lebih holistik sehingga studi lebih lanjut diperlukan untuk memahami interaksi kompleks antara TNF- α dan jalur molekuler lainnya yang terlibat dalam resistensi insulin dan pengembangan DMT2.⁶⁶

2.5.2 Mekanisme GLUT-4 dalam Diabetes mellitus tipe 2

GLUT4 berperan penting dalam pengambilan glukosa yang bergantung pada insulin, terutama di jaringan otot rangka dan adiposa.

Pada kondisi hiperglikemik seperti yang sering terjadi pada diabetes mellitus tipe 2, transpor GLUT4 menuju membran plasma terganggu.^{6,67} Hal ini dapat disebabkan oleh gangguan dalam jalur sinyal insulin atau perubahan dalam mekanisme translokasi GLUT4, salah satunya adalah penurunan aktivitas PI3K atau Akt, mengurangi pengambilan glukosa oleh sel otot dan adiposa, dan berkontribusi pada hiperglikemia.^{6,67} Selain itu, penelitian menunjukkan bahwa ekspresi GLUT4 dapat berkurang pada jaringan adiposa individu dengan T2DM, yang memperburuk resistensi insulin.⁶⁸

Meski demikian, peningkatan ekspresi GLUT4 terbukti meningkatkan sensitivitas insulin. Studi pada model hewan menunjukkan bahwa overekspresi GLUT4 dapat mencegah perkembangan resistensi insulin yang diinduksi oleh diet tinggi lemak dengan meningkatkan pengambilan glukosa di jaringan target.⁶⁸ Oleh karena itu, GLUT4 tidak hanya berfungsi sebagai transporter glukosa utama tetapi juga sebagai regulator penting dalam menjaga sensitivitas insulin dan homeostasis metabolik secara keseluruhan.⁶⁹

2.6 Pengaruh *EH-MSCs* Terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi GLUT4

EH-MSCs dapat menjadi salah satu pendekatan terapeutik untuk mengatasi T2DM serta komplikasi terkait. Pada DMT1, *MSC-derived exosome* menunjukkan efek imunomodulasi yang signifikan dengan memulihkan keseimbangan antara sel T efektor autoimun dan sel T regulatori, yang penting untuk mengurangi kerusakan autoimun pada sel β pankreas.^{70,71}

Pada T2DM, *MSC-derived exosome* berperan dalam memodulasi inflamasi dan mencegah kerusakan sel lebih lanjut yang dapat mengakibatkan resistensi insulin pada jaringan sensitif seperti hati, otot, dan adiposa.^{70,71} *Exosomes* ini bekerja dengan memodulasi jalur inflamasi, seperti jalur MAPK dan NF- κ B.^{70,71} Selain itu, *MSC-derived exosome* juga dapat meningkatkan penyerapan glukosa dengan meningkatkan ekspresi GLUT4, memperbaiki fungsi sekresi insulin oleh sel β pankreas, serta mengurangi apoptosis sel β akibat stres metabolik.^{70,71} Sebagai contoh, *MSC-derived exosome* yang berasal dari darah umbilikus terbukti dapat meningkatkan regenerasi pankreas dan meningkatkan produksi insulin melalui jalur Ext13-Reg-cyclinD1.^{70,71} Jika ditinjau dari TNF- α , EH-MSCs diketahui memiliki sifat imunomodulator yang dapat menekan aktivitas inflamasi dengan menghambat produksi TNF- α .^{70,71}

Mekanisme ini terjadi melalui modulasi jalur sinyal inflamasi dan peningkatan aktivitas antiinflamasi dari sel target, memungkinkan terjadinya penurunan kadar TNF- α , yang pada akhirnya dapat mengurangi inflamasi sistemik dan meningkatkan kondisi fisiologis jaringan yang mengalami peradangan, terutama pada kondisi yang berkaitan dengan resistensi insulin dan gangguan metabolik.⁷²

Efek terapeutik *EH-MSCs* sebagian besar dikaitkan dengan muatan kompleksnya, termasuk protein, lipid, dan banyaknya kandungan miRNAs. *EH-MSCs* salah satunya memiliki miR-199a yang dapat berperan dalam menekan jalur inflamasi NF- κ B.^{73,74} Kandungan miR-21 pada EH-MSCs juga dinilai dapat mengaktifkan jalur PI3K/Akt yang berhubungan dengan

angiogenesis dan translokasi GLUT4 serta miR-126-3p dan miR-21-5p dalam EH-MSCs diketahui juga dapat mengaktifkan jalur PI3K/AKT dan memodulasi jalur inflamasi MAPK untuk meningkatkan metabolisme glukosa di jaringan otot dan hati pada pasien T2DM.^{70,73,74} Dalam metabolisme lipid, EH-MSCs mengandung miR-122 yang dapat meregulasi FFA sehingga berpengaruh pada progresivitas sensitivitas insulin.^{73,75}

EH-MSCs berperan dalam modulasi jalur molekuler yang terkait dengan regulasi GLUT4 dan TNF- α , terutama melalui jalur inflamasi. EH-MSCs meningkatkan kadar IL-10 dan mengaktifasi jalur JAK/STAT3, yang berujung pada peningkatan ekspresi SOCS3.^{76,77} SOCS3 ini berfungsi menghambat sinyal inflamasi yang dipicu oleh sel T-helper 17 (Th-17) dan makrofag tipe M1, sehingga menekan aktivasi NF- κ B. Akibatnya, produksi TNF- α , mediator inflamasi utama, dapat diminimalkan.⁷⁷

Selain itu, EH-MSCs berpotensi memengaruhi jalur metabolik melalui perbaikan aktivitas PI3K/AKT, yang terganggu pada T2DM akibat fosforilasi serin pada IRS-1.⁷⁸ Dengan mengurangi inflamasi yang dimediasi oleh Th-17 dan TNF- α , EH-MSCs secara tidak langsung mendukung aktivasi PI3K/AKT, sehingga ekspresi GLUT4 pada membran sel meningkat, membantu perbaikan homeostasis glukosa yang terganggu pada T2DM.⁷⁹

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Diabetes Mellitus Tipe 2 (T2DM) adalah gangguan metabolik yang ditandai oleh inflamasi kronis dan hiperglikemia yang selanjutnya terjadi resistensi insulin, gangguan sekresi insulin, atau kombinasi keduanya. Pada kondisi T2DM, terjadi peningkatan TNF- α dan penurunan ekspresi GLUT4 pada membran plasma.⁸⁰ Terjadinya lipolisis pada T2DM meningkatkan kadar *free fatty acid* (FFA) pada tubuh yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan sistem imun dengan memicu aktivasi sel *T-helper tipe 17* (Th-17) dan meningkatkan produksi ROS.⁸¹ Aktivasi Th-17 dan ROS memicu aktivasi makrofag M1 (pro-inflamasi) menyebabkan aktivasi jalur inflamasi NF- κ B yang kemudian merangsang pelepasan *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), serta TNF- α sebagai mediator inflamasi utama dan sitokin pro-inflamasi lainnya seperti IL-6, dan IL-1 β .^{81,82}

Inflamasi pada T2DM menyebabkan peningkatan fosforilasi serin pada IRS-1 dibandingkan fosforilasi tirosin, hal ini menyebabkan terjadi hambatan dalam aktivasi PI3K.⁸³ Fosforilasi serin pada IRS-1 terjadi akibat aktivasi beberapa enzim kinase, seperti JNK yang diaktifkan oleh stres oksidatif dan inflamasi kronis pada T2DM. Fosforilasi serin ini mengganggu interaksi IRS-1 dengan reseptor insulin, sehingga menghambat jalur PI3K/AKT.⁸³ Hambatan ini berdampak pada penurunan aktivitas jalur AKT,

yang berujung pada berkurangnya ekspresi GLUT-4, transporter glukosa utama. Akibatnya, terjadi gangguan homeostasis glukosa dalam tubuh.^{78,84}

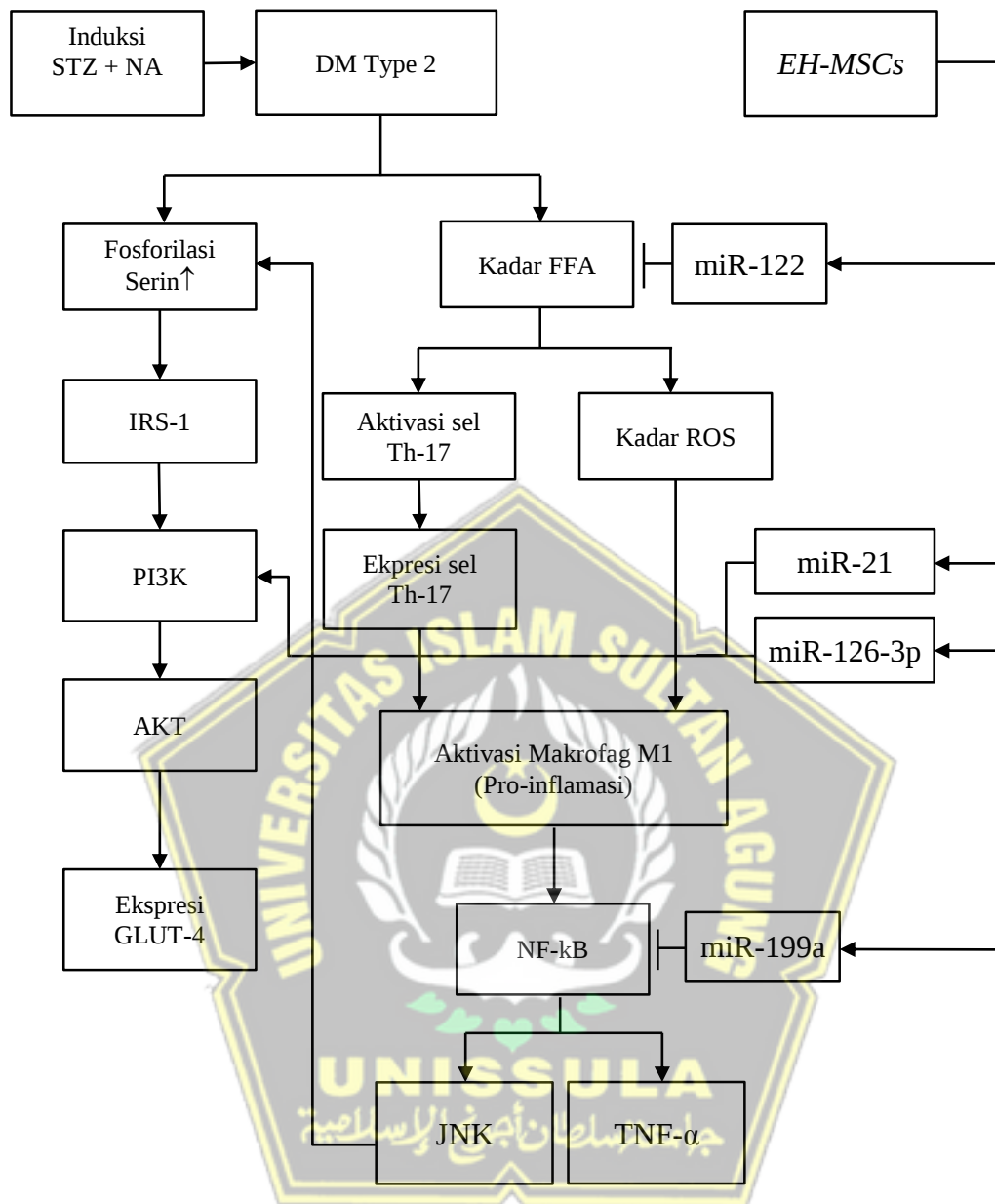
Kondisi ini menghambat makrofag M2 (anti-inflamasi) yang seharusnya berperan dalam menekan inflamasi dan perbaikan jaringan. Ketidakseimbangan ini menyebabkan peradangan kronis pada jaringan metabolik dan resistensi insulin.⁶⁶ Selain itu, inflamasi kronis dan stres oksidatif yang berkepanjangan juga merusak sel β pankreas, mengurangi viabilitas dan fungsi sekresi insulin. Aktivasi NF- κ B dan peningkatan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β memicu apoptosis sel β , sementara stres oksidatif menyebabkan disfungsi mitokondria, yang semakin memperburuk penurunan produksi insulin dan mempercepat progresi diabetes.⁷⁰

Berdasarkan pathogenesis tersebut, *EH-MSCs* diketahui dapat memberikan potensi terapetiknya karena memiliki berbagai miRNAs. *EH-MSCs* mengandung miR-199a yang berperan dalam menekan jalur inflamasi NF- κ B.^{73,74} Kandungan miR-21 dan miR-126-3p pada *EH-MSCs* dinilai dapat mengaktifkan jalur PI3K/Akt yang berhubungan dengan angiogenesis dan translokasi GLUT4 untuk meningkatkan metabolisme glukosa di jaringan otot dan hati pada pasien T2DM.^{70,73,74} Dalam metabolisme lipid, *EH-MSCs* mengandung miR-122 yang dapat meregulasi FFA.^{73,75}

Dengan demikian, interaksi antara peningkatan kadar FFA, ROS, dan inflamasi melalui jalur NF- κ B, serta mekanisme protektif melalui *EH-MSCs*, memberikan gambaran yang komprehensif mengenai patogenesis dan potensi

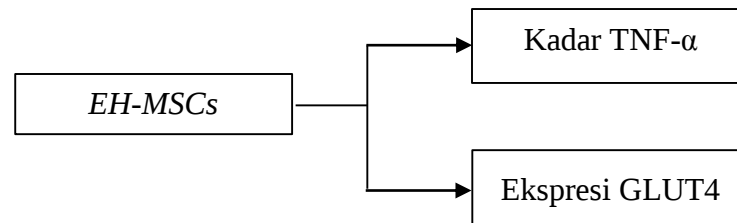
terapi pada T2DM.⁸⁵ ROS dan inflamasi yang berkelanjutan dapat menginduksi apoptosis sel β , mengurangi jumlah sel yang mampu memproduksi insulin, serta mengganggu homeostasis kalsium intraseluler, yang penting dalam regulasi sekresi insulin. Akibatnya, terjadi penurunan kapasitas adaptasi sel β terhadap peningkatan kebutuhan insulin, yang memperburuk progresivitas T2DM.^{86,87}





Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

3.3 Hipotesis

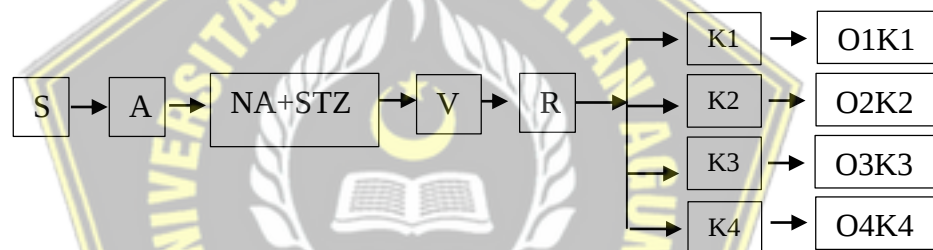
Terdapat pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* dengan dosis 250 μ g dan 500 μ g dalam menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan ekspresi GLUT 4 pada tikus galur Wistar model diabetes millitus type 2.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental in vivo dengan pendekatan *post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 1 (satu) Kelompok kontrol negatif (K1), 1 Kelompok kontrol positif (K2), dan 2 (dua) Kelompok perlakuan (K3 dan K4)



Gambar 4.1 Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S: Sampel

A: Aklimatisasi

R: Randomisasi

V: Validasi diabetes dengan pengukuran kadar darah >200 mg/dL

K1: Tikus diabetes dengan NaCl 0,9% intravena iv hari ke-15, 18, dan 21

K2: Tikus diabetes dengan metformin oral 300 mg/kgBB/hari 14 hari

K3: Tikus diabetes dengan *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L iv hari ke-15, 18, dan 21

K4: Tikus diabetes dengan *EH-MSCs* dengan dosis 500 µL iv hari ke-15, 18, dan 21

O1K1: Observasi kadar TNF-α dan ekspresi GLUT4 pada kelompok 1

O2K2: Observasi kadar TNF-α dan ekspresi GLUT4 pada kelompok 2

O3K3: Observasi kadar TNF-α dan ekspresi GLUT4 pada kelompok 3

O4K4: Observasi kadar TNF-α dan ekspresi GLUT4 pada kelompok 4

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berumur 8-10 minggu, dengan berat badan 200-250 gram.

4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel dipilih menggunakan teknik randomisasi sederhana setelah tikus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Jumlah sampel dihitung menggunakan rumus Federer's formula sebagai berikut,

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6 \text{ ekor}$$

Keterangan :

t: Jumlah kelompok perlakuan

n : besar sampel setiap kelompok perlakuan

Di mana n adalah jumlah tikus per kelompok, dan t adalah jumlah kelompok. Pada penelitian ini, digunakan 4 kelompok tikus, maka minimal 6 tikus per kelompok diperlukan. Ditambahkan 1 tikus untuk mengantisipasi adanya tikus mati selama percobaan sehingga total sampel adalah 28 tikus.

4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode randomisasi sederhana untuk memastikan setiap tikus memiliki peluang sama untuk dimasukkan ke dalam kelompok kontrol atas perlakuan. Proses pengambilan dapat dijabarkan sebagai berikut

1. Seleksi Awal

Tikus Wistar diperiksa untuk memastikan kondisi kesehatan seperti tidak sakit, aktif bergerak, dan berat badan sesuai kriteria inklusi. Pemeriksaan awal kadar glukosa darah dilakukan untuk memastikan kadar glukosa awal.

2. Aklimatisasi

Aklimatisasi tikus pada kondisi standar (suhu 22–24°C, siklus terang-gelap 12 jam, dan akses bebas ke makanan dan minuman). Adaptasi dilakukan pada kondisi standar minimal 7 hari.

3. Pembagian Kelompok

Tikus secara acak dibagi menjadi 4 kelompok:

- Kelompok 1: Kelompok kontrol positif
- Kelompok 2: kelompok kontrol negatif

- Kelompok 3: *EH-MSCs* 250 μ L perlakuan 1
- Kelompok 4: *EH-MSCs* 500 μ L perlakuan 2

4. Alokasi Sampel

Pengacakan dilakukan menggunakan metode seperti *random number generator* atau undian sederhana untuk memastikan distribusi sampel yang adil antara kedua kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 7 tikus.

4.2.4. Kriteria Inklusi

1. Tikus Wistar jantan berumur 8-10 minggu.
2. Berat badan antara 200-250 gram.
3. Sehat secara klinis (aktif, nafsu makan baik, bulu bersih, dan tidak menunjukkan tanda-tanda penyakit).

4.2.5. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang tidak menunjukkan kadar glukosa darah >200 mg/dL setelah proses induksi STZ-NA.

4.2.6. Kriteria Drop Out

1. Tikus menunjukkan gejala stres berat seperti penurunan berat badan yang signifikan dilihat dari penurunan $>20\%$ dari berat awal, kelemahan fisik secara ekstrem, atau inaktivitas yang mengganggu hasil penelitian.
2. Tikus mengalami infeksi, cedera, atau penyakit yang tidak terkait dengan perlakuan atau protokol penelitian.

3. Tikus mati selama periode penelitian, baik akibat efek perlakuan, prosedur, atau penyebab lain.
4. Tikus yang mengalami kesalahan dalam prosedur, seperti dosis *EH-MSCs* yang tidak sesuai, teknik injeksi yang gagal, atau pengambilan sampel jaringan yang tidak berhasil.

4.3 Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel Bebas (Independen)

EH-MSCs yang dikultur pada kondisi 5% O₂ dosis 250 µL dan 500 µL

4.3.2. Variabel Terikat (Dependen):

Variabel terikat pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kadar TNF- α : Diukur menggunakan sampel jaringan pankreas menggunakan metode ELISA untuk menilai tingkat inflamasi pada tikus DM tipe 2.
2. Ekspresi GLUT4: Diukur pada jaringan otot menggunakan metode RT-PCR untuk menilai tingkat regulasi gen GLUT4 yang berperan penting dalam pengambilan glukosa ke dalam sel otot.

4.3.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi pada penelitian ini adalah injeksi 65 mg STZ dan 230 mg NA dengan secara intraperitoneal dosis Tunggal.

4.3.4. Variabel Terkendali

Usia dan Berat Badan: Tikus berusia 8–10 minggu dengan berat badan 200–250 gram.

4.3.5. Definisi Operasional

1. Pemberian *EH-MSCs*

Proses pemberian vesikel ekstraseluler berukuran kecil yang dihasilkan oleh MSCs yang dikultur dalam kondisi *hypoxia*. *EH-MSCs* ni mengandung molekul bioaktif seperti protein, mRNA, dan microRNA yang memiliki potensi untuk memodulasi peradangan dan meningkatkan sensitivitas insulin. Dalam penelitian ini, *exosome* diberikan kepada tikus melalui rute injeksi intravena.

Skala: Rasio

2. Kadar TNF- α

Kadar TNF- α adalah tingkat konsentrasi *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) dalam jaringan pankreas, yang diukur sebagai indikator utama inflamasi. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam resistensi insulin dan patogenesis Diabetes Mellitus Tipe 2. Penurunan kadar TNF- α setelah pemberian *EH-MSCs* dihipotesiskan mencerminkan berkurangnya respon inflamasi. Dalam penelitian ini, kadar TNF- α diukur menggunakan teknik ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), yang merupakan metode standar untuk analisis sitokin.

Unit: Pikogram per mililiter (pg/mL).

Skala: Rasio

3. Ekspresi GLUT4

Ekspresi GLUT4 mengacu pada tingkat protein GLUT4 dalam jaringan yang memiliki peran penting dalam proses transport glukosa ke dalam sel. Dalam penelitian ini, peningkatan ekspresi GLUT4 setelah pemberian *EH-MSCs* dievaluasi untuk menilai efek perbaikan sensitivitas insulin. Ekspresi GLUT4 diukur melalui teknik RT-PCR.

Unit: Ct value

Skala: Rasio.

4.4 Bahan Penelitian

1. Tikus Wistar jantan usia 8–10 minggu, berat badan 200–250 gram.
2. Aquades
3. Streptozotocin (STZ)
4. Nicotinamide
5. Kit ELISA TNF- α
6. PCR Kit GLUT4
7. Buffer PBS
8. Ketamin
9. Acepromazine
10. Xylazine

4.5 Alat Penelitian

1. Kandang untuk pemeliharaan tikus, tempat makan dan minum.
2. Timbangan Digital

3. Tempat air minum tikus.
4. ELISA Reader untuk analisis kadar TNF- α
5. PCR machine untuk analisis GLUT4
6. Jarum Suntik
7. Tabung hemamtokrit.
8. *6mm biopsy punch*
9. Sentrifuge
10. Mikropipet 1
11. 1000 μ L mikropipet tip
12. Vial tube 1,5 mL
13. *Coated desk glass*
14. *Cover glass*

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Penelitian ini diawali dengan pengajuan permohonan persetujuan etik kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang. Langkah ini dilakukan setelah proposal penelitian memperoleh persetujuan dari pembimbing dan penguji. Permohonan persetujuan etik bertujuan untuk memastikan penelitian berjalan sesuai prinsip-prinsip etika, terutama terkait penggunaan hewan coba. Persetujuan etik juga menjamin bahwa perlakuan terhadap hewan percobaan dilakukan dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan, serta meminimalkan penderitaan yang tidak perlu.

4.6.2. Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2

1. STZ dan NA masing-masing dilarutkan dalam larutan saline steril (0,9% NaCl) atau buffer sitrat (pH 4,5) untuk menjaga stabilitas larutan.
2. Larutan dibuat segar dan digunakan segera untuk mencegah degradasi kimia STZ maupun NA.
3. Larutan STZ dan NA diberikan dalam volume kecil (1-2 mL) untuk memastikan penyebaran efektif.
4. Tikus Wistar sehat (8 minggu, berat 200-250 gram) diinjeksi secara intraperitoneal dengan NA dengan dosis 230 mg.
5. Setelah 15 menit, STZ diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 65 mg.
6. Penyuntikan NA-STZ dilakukan pada semua tikus pada kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 1, dan perlakuan 2.
7. Konfirmasi diabetes dilakukan 7 hari pasca-injeksi, kadar glukosa darah tikus diukur menggunakan glukometer. Tikus dengan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL dianggap berhasil diinduksi diabetes.

4.6.3. Uji Validasi MSCs

1. Lepaskan sel dari flask menggunakan *cells detachment solution*, cuci, dan lakukan resuspensi di dalam PBS buffer.

2. Ambil 100 μ L sampel, masukkan ke dalam tabung yang berisikan reagen *flowcytometry* dengan marker CD44+, CD29+, CD45-, dan CD31- sebagai marker evaluasi
3. Baca hasil *flowcytometri*
4. Lanjutkan pemeriksaan menggunakan diferensiasi adipogenik dan osteogenik. Tempatkan media kultur spesifik sesuai dengan *lineage*
 - i. Adipogenik: Kultur MSC dalam media adipogenik selama 14-21 hari, lalu pewarnaan dengan Oil-Red O.
 - ii. Osteogenik: Kultur MSC dalam media osteogenik selama 14-21 hari, lalu pewarnaan dengan Alizarin Red.
5. Adanya droplet lipid (adiposit) dan mineralisasi matriks (osteoblast) menunjukkan kemampuan diferensiasi

4.6.4. Isolasi EH-MSCs

1. Preparasi *Condition Medium* dengan cara medium kultur dari passage 4 dikumpulkan dan disentrifugasi pada 300×g selama 5 menit untuk menghilangkan sel-sel yang tersisa.
2. Supernatant kemudian disentrifugasi lagi pada 2000×g selama 30 menit untuk menghilangkan debris.
3. Supernatant hasil sentrifugasi difiltrasi menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF) dengan membran *sterile hollow fiber* berukuran 10, 50, dan 500 kD.

4. MSCs dengan konfluensi 80% ditambahkan medium kultur lengkap sebanyak 10 mL.
5. Flask yang berisi MSCs dimasukkan ke dalam *hypoxic chamber*. Gas nitrogen dialirkan melalui katup inlet, dan konsentrasi oksigen dalam *hypoxic chamber* diukur menggunakan oksigen-meter hingga mencapai 5% kadar oksigen. Flask diinkubasi dalam kondisi *hypoxia* selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Medium kultur dari flask diambil untuk diproses lebih lanjut menggunakan TFF untuk mendapatkan *exosomes* dari MSCs *hypoxia*.
7. Sel dicuci sebanyak 2 kali menggunakan *phosphate-buffered saline* (PBS) dan kemudian dire-suspensi dalam buffer pencucian (PBS atau *washing buffer* FBS) sebanyak 300-500 µL.
8. Suspensi sel diolah untuk analisis menggunakan *flowcytometry*, marker yang digunakan adalah CD63+, CD9+, dan CD81+.

4.6.5. Teknik Pengumpulan Sampel

1. Pada hari ke-28, tikus diterminasi menggunakan menggunakan *cocktail* dosis letal sebelum pengambilan jaringan dilakukan. Cocktail dibuat dengan mencampurkan Ketamin (50 mg/kgBB), Xylazine (10 mg/kgBB), dan Acepromazine (10 mg/kgBB), yang kemudian disuntikkan secara intramuskular untuk memastikan tikus tidak merasakan sakit selama proses terminasi.

2. Setelah tikus mati, sampel berupa jaringan pankreas dan otot diambil secara hati-hati untuk analisis kadar TNF- α dan GLUT4. Sampel jaringan tersebut kemudian disimpan dalam *cryotube* yang bebas RNase untuk menjaga integritas RNA dan disimpan dalam suhu -80°C dalam RNA *later*.

4.6.6. Analisis Kadar GLUT4 dan Ekspresi TNF- α

1. Analisa Ekspresi GLUT4 menggunakan RT-PCR

Ekstraksi RNA dilakukan dari jaringan kulit menggunakan reagen TRIzol® (Invitrogen Life Technologies), diikuti oleh sintesis cDNA menggunakan *ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA*. Proses ini dilakukan menggunakan *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR). Ekspresi GLUT4 dianalisis dengan teknik PCR-RFLP menggunakan *EnTurbo™ SYBR Color qPCR Super ROX* 10uL + NFW 7,4uL. Reaksi dilakukan dalam 48 wellplate dengan total volume 20uL terdiri dari (sybr green 10ul, sampel 1ul, primer F 0,8ul, primer R 0,8ul, NFW 7,4ul). Amplifikasi PCR dilaksanakan dengan siklus termal DNA menggunakan perangkat *Illumina Thermal Cycler*, yang memungkinkan deteksi akurat ekspresi gen target dalam analisis ini. Proses ini bertujuan untuk mengevaluasi peran GLUT4 dalam jaringan otot.

2. Analisa Kadar TNF- α menggunakan ELISA

Konsentrasi TNF- α diukur pada jaringan menggunakan metode ELISA. Molekul TNF- α spesifik diikat oleh antibodi primer

yang telah dilapiskan pada permukaan mikrotiter plate. Selanjutnya, antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim ditambahkan untuk membentuk kompleks dengan molekul TNF- α dan antibodi primer. Setelah proses inkubasi selesai, substrat enzim ditambahkan untuk menghasilkan reaksi warna, yang intensitasnya diukur menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi TNF- α dihitung berdasarkan kurva standar yang telah dibuat sebelumnya, dan hasilnya dinyatakan dalam satuan pg/mL.

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian di *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research* (SCCR Indonesia) Gunung Pati, Semarang, Jawa Tengah. Penelitian rencana akan mulai dilakukan pada April - Juni 2025 dianalisis dengan metode statistik sebagai berikut:

1. Uji Normalitas: Data diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk memastikan bahwa data berdistribusi normal.
2. Uji Homogenitas: Homogenitas data diuji dengan Levene's test.
3. Analisis Statistik: Perbandingan 4 kelompok
 - Jika data berdistribusi normal: Menggunakan uji ANOVA one-Way
 - Jika data tidak berdistribusi normal: Menggunakan Kruskal-Wallis Test (alternatif non-parametrik)
4. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan software statistik, dan nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan.

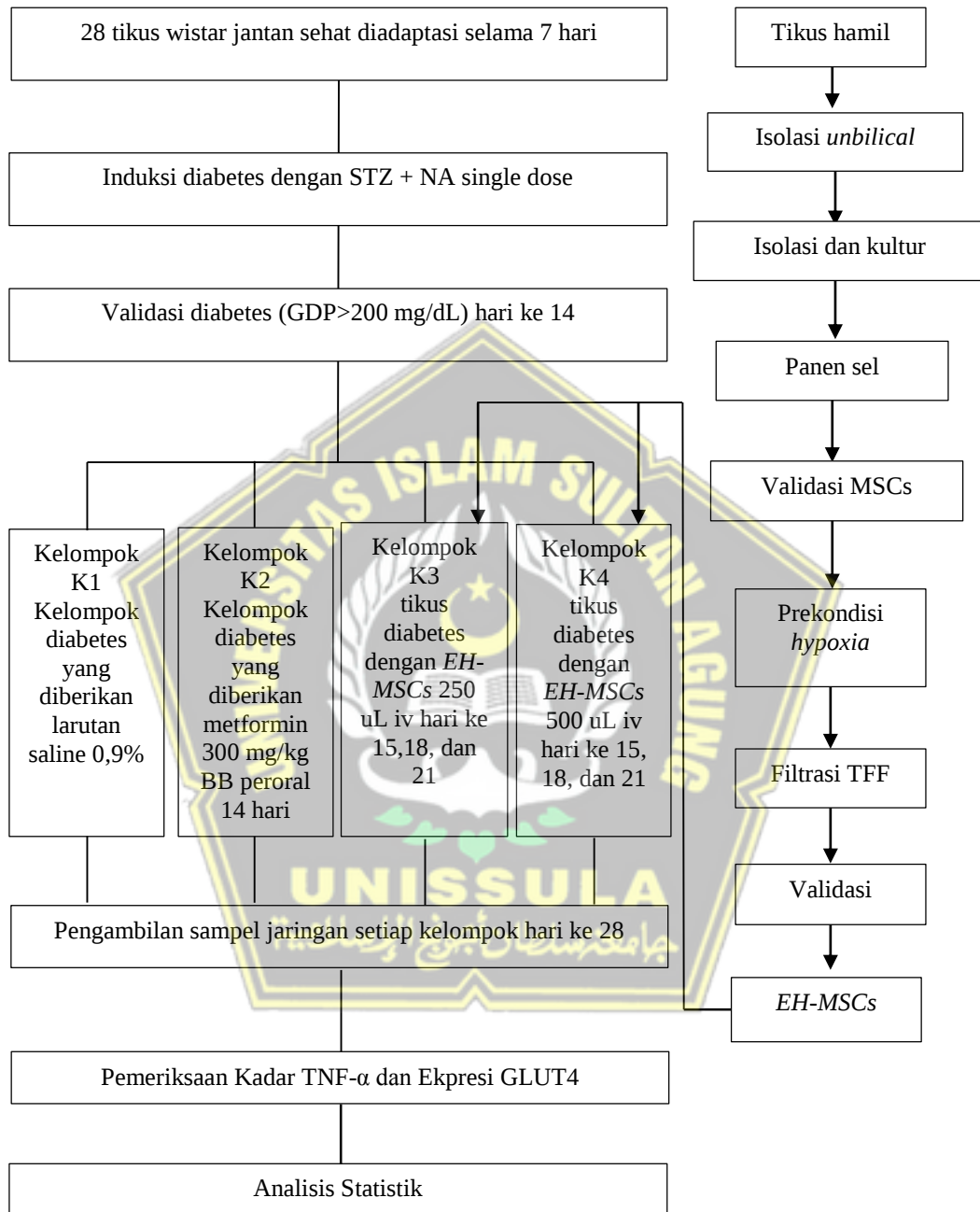
- Jika ANOVA one-Way signifikan, lanjutkan uji post hoc Tukey untuk menilai perbedaan spesifik antar kelompok
- Jika Kruskal-Wallis Test signifikan, lanjutkan uji post hoc Dunn's untuk membandingkan pasangan kelompok

5. Interpretasi Data: data dianalisis untuk menguji hipotesis penelitian:

- Apakah pemberian *EH-MSCs* dapat menurunkan kadar $\text{TNF-}\alpha$ secara signifikan dibandingkan kontrol.
- Apakah pemberian *EH-MSCs* dapat meningkatkan ekspresi GLUT4 secara signifikan dibandingkan kontrol.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh EH-MSCs terhadap kadar TNF- α dan ekspresi GLUT4 pada tikus wistar model diabetes melitus tipe 2 dibandingkan dengan kontrol. Studi eksperimental ini dilakukan secara in vivo dengan desain Post-test Only Control Group dilakukan selama bulan Mei-Juli 2025 di laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Semarang.

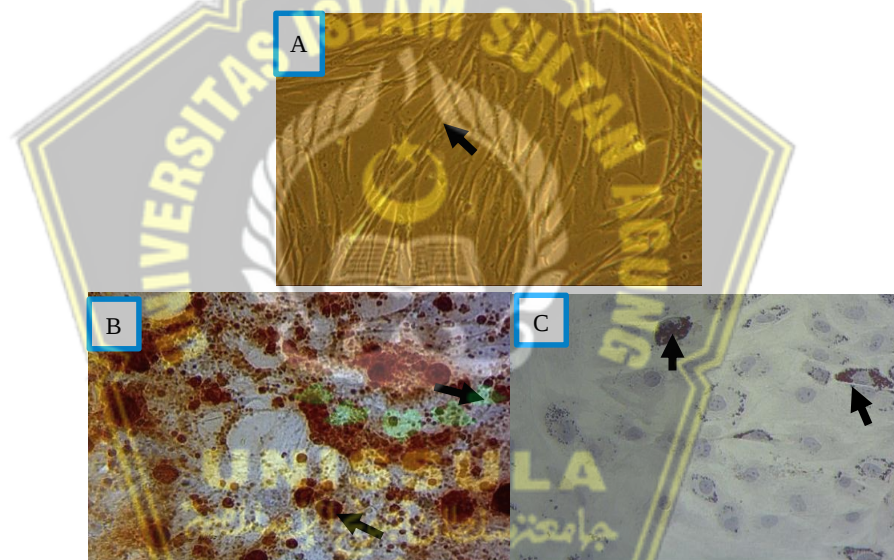
Penelitian dengan subjek tikus jantan sebanyak 28 ekor dengan model diabetes melitus tipe 2, Usia berkisar 2-3 bulan, dan berat badan 200-250 gram. Tikus Wistar diabetes mellitus tipe 2 kemudian randomisasi dan dibagi 4 kelompok, yaitu tikus diabetes dengan NaCl 0,9% 300 μ L iv pada hari ke 15, 18, dan 21, tikus diabetes dengan metformin oral 300 mg/kgBB/hari 14 hari, dan tikus diabetes dengan EH-MSCs dengan dosis 250 μ L iv hari ke-15, 18, dan 21, serta tikus diabetes dengan EH-MSCs dengan dosis 500 μ L iv hari ke-15, 18, dan 21. Hasil penelitian ini sebagai berikut.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Isolasi *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)*

Isolasi Mesenchymal stem cell (MSC) diperoleh dari tali pusat tikus Wistar sebagai sumber sel pada usia gestasi 21 hari. Proses isolasi dilakukan dengan teknik standar, diikuti dengan kultivasi sel dalam flask kultur yang mengandung media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Pada pasase kelima, morfologi sel diamati menggunakan mikroskop cahaya inversi. Hasil observasi morfologis

menunjukkan bahwa sel-sel tersebut memenuhi kriteria morfologi khas MSC, yaitu berbentuk fusiform (*spindle-like cell*) dan menunjukkan sifat adhesivitas yang tinggi terhadap permukaan flask kultur. Selain itu, sel-sel tersebut menunjukkan pola proliferasi yang homogen dengan distribusi ukuran dan orientasi sel yang konsisten, Sel tampak memanjang dengan ujung meruncing menyerupai gelendong (*spindle*). Morfologi ini juga mendukung fungsi multipotensi MSC dalam berdiferensiasi (Gambar 5.1 A).

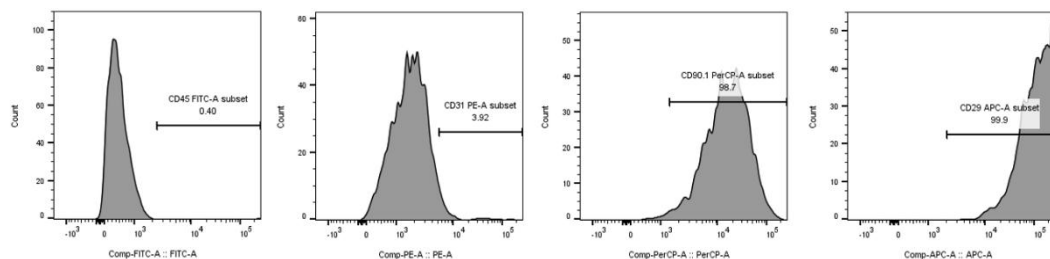


Gambar 5. 1 (A)Validasi dengan pembesaran mikroskopik 40x di dapatkan morfologi sel MSC berbentuk spindle-like setelah pasase ke-4 MSC (B) Droplet Lipid terlihat sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan Oil Red O muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x. (C) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x.

MSCs dikultur dalam medium khusus sehingga dapat berdiferensiasi menjadi osteosit yang ditunjukkan dengan sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alzarin Red* dan adiposit yang

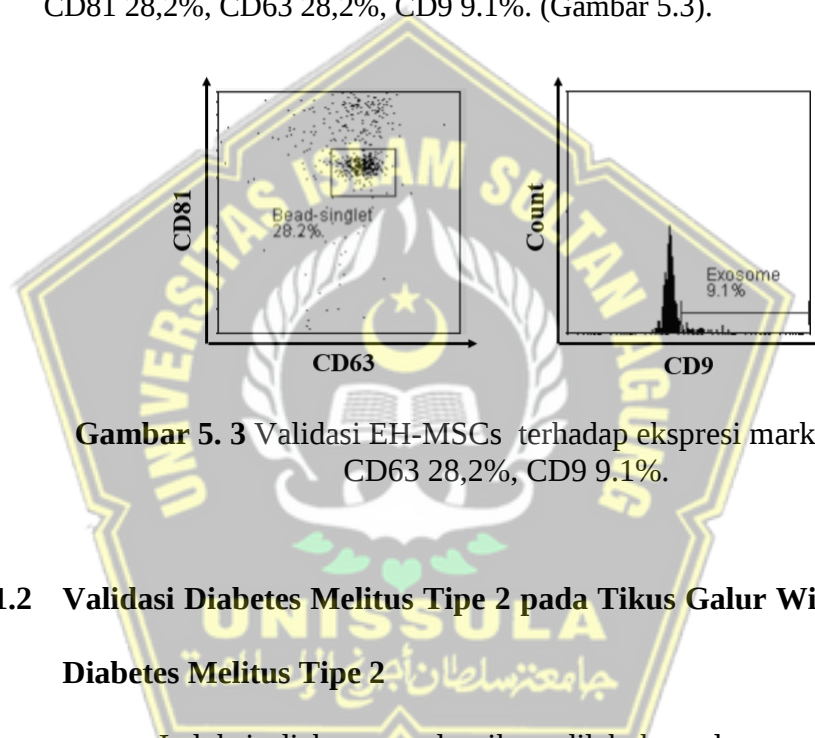
ditunjukkan dengan sel yang berisi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O*. Berdasarkan hasil pewarnaan, diketahui bahwa MSC mampu berdiferensiasi menjadi sel osteosit dan adipogenik (Gambar 5.1.B dan 5.1.C). Dengan hasil pengamatan ini, sel yang dihasilkan dari isolasi diidentifikasi sebagai MSCs karena memenuhi syarat dan karakteristik sel punca, yaitu kemampuan untuk mengalami diferensiasi menjadi jenis sel lain serta memiliki potensi multipotensi.

Marker sel MSCs kemudian divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry*. Metode ini digunakan untuk mengukur ekspresi marker permukaan sel yang spesifik, yang merupakan indikator kunci dalam identifikasi MSC. Analisis *flow cytometry* difokuskan pada deteksi ekspresi marker positif MSC, yaitu CD90 dan CD29, serta marker negatif MSC, yaitu CD45 dan CD31. Hasil analisis menunjukkan bahwa sel-sel yang dikultur secara dominan mengekspresikan CD90 (98,70%) dan CD29 (99,9%), yang merupakan marker positif MSC. Di sisi lain, ekspresi CD45 (0,40%) dan CD31 (3,92%), yang merupakan marker negatif MSC, ditemukan dalam proporsi yang sangat rendah (Gambar 5.2).



Gambar 5. 2 Validasi MSCs dengan Analisis *flow cytometry* ekspresi *surface marker* CD90 (98,70%), CD29 (99.9%), CD45 (0.40%) dan CD31 (3,92%)

Sel MSCs dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan kondisi hipoksia (konsentrasi oksigen 5%). Medium kultur MSCs yang mengandung *exosome* dilakukan filtrasi menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) hingga diperoleh molekul dengan ukuran 100-500 kDa yang mengandung *exosome* 0.75 ug/100 uL= 7.5 ug/mL. Validasi *EH-MSCs* dilakukan dengan *flowcytometry* dan didapatkan hasil ekspresi ekspresi CD81 28,2%, CD63 28,2%, CD9 9.1%. (Gambar 5.3).



Gambar 5. 3 Validasi EH-MSCs terhadap ekspresi marker 28,2%, CD63 28,2%, CD9 9.1%.

5.1.2 Validasi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus Galur Wistar Model Diabetes Melitus Tipe 2

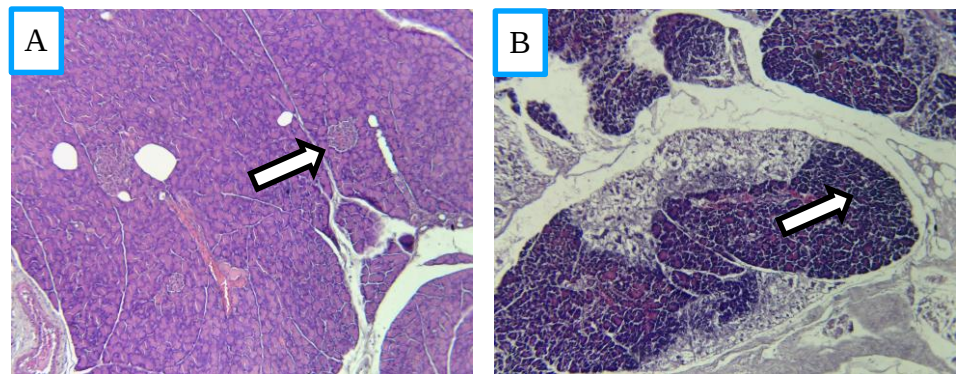
Induksi diabetes pada tikus dilakukan dengan injeksi NA dengan dosis 230 mg/kg berat badan secara intraperitoneal. Setelah 15 menit, STZ diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 65 mg/kg berat badan. Konfirmasi diabetes dilakukan 7 hari pasca-injeksi. Tikus dengan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL dianggap berhasil diinduksi diabetes. Pada penelitian ini validasi diabetes melitus dilakukan menggunakan pemeriksaan gula darah dengan glukometer dan

pemeriksaan Hematoxylin-Eosin. Gula darah tikus setelah induksi diabetes meningkat signifikan Tabel 5.1. Ini menunjukkan hiperglikemia berat pada tikus yang telah di induksi STZ dan NA telah terjadi hiperglikemia berat.

Tabel 5. 1 Rerata Kadar Gula Darah Tikus Galur Wistar Model Diabetes Melitus Tipe 2 per kelompok (mg/dL)

Kelompok	Sebelum	Validasi	Sesudah
K1	94	316	324
K2	100	394	354
K3	110	326	208
K4	107	494	338

Pemeriksaan GDS menunjukkan bahwa seluruh kelompok tikus yang diinduksi STZ+NA mengalami hiperglikemia pada saat validasi hari ke-14, menandakan model T2DM berhasil dibentuk. Pada kelompok kontrol negatif (K1), kadar GDS tetap tinggi hingga hari ke-28, sehingga merepresentasikan kondisi DM tanpa terapi. Kelompok kontrol positif (K2) yang mendapat metformin menunjukkan penurunan GDS, meskipun tidak seluruhnya mencapai nilai normal. Kelompok perlakuan dengan eksosom dosis 250 μ L (K3) memberikan efek penurunan GDS paling optimal hingga mendekati normoglikemia, sedangkan dosis 500 μ L (K4) juga menurunkan GDS namun tidak sebaik K3. Hasil ini menunjukkan bahwa eksosom berpotensi memperbaiki kontrol glukosa darah, dengan dosis 250 μ L tampak lebih efektif dibanding 500 μ L.



Gambar 5. 4 Validasi Diabetes. (A) Histopatologi jaringan pankreas dengan pewarnaan H&E pembesaran mikroskopik 100x pada tikus sehat menunjukkan pulau Langerhans yang normal. Terlihat batas pulau yang jelas, inti sel berwarna ungu gelap dan sitoplasma sel yang tergranulasi berwarna merah muda, dan jaringan eksokrin di sekitarnya tampak padat dan teratur. (B) Histopatologi jaringan pankreas tikus diabetes pewarnaan H&E pembesaran mikroskopik 400x. Pulau Langerhans menunjukkan tanda degradasi berupa inti sel yang berwarna ungu tua terlihat lebih sedikit, sitoplasma yang berwarna merah muda, kehilangan granula sel, dan kontur pulau yang tidak beraturan.

Validasi juga dilakukan dengan pemeriksaan Hematoxylin-Eosin yaitu teknik pewarnaan jaringan yang paling umum digunakan dalam histopatologi untuk melihat morfologi dan struktur jaringan dengan jelas serta untuk mengevaluasi kerusakan jaringan. Hematoxylin, yang bersifat basa, akan mewarnai bagian jaringan yang asam seperti *inti sel* (*nukleus*) menjadi biru atau ungu gelap, sedangkan eosin, yang bersifat asam, akan mewarnai bagian basa seperti *sitoplasma dan jaringan ikat* berwarna merah muda sampai merah. Histopatologi jaringan pankreas dengan pewarnaan HE pada tikus pasca induksi diabetes pada pembesaran mikroskopik 400x terlihat perubahan kepadatan dan morfologi sel mencerminkan kerusakan atau kehilangan sel beta pankreas yang khas pada kondisi diabetes mellitus tipe 2 (Gambar 5.4 A dan B).

Berdasarkan pengukuran gula darah dan pewarnaan HE, maka model diabetes mellitus tipe 2 pada penelitian ini dianggap berhasil. Validasi ini memberikan bukti bahwa metode induksi dengan menggunakan STZ dan NA telah menciptakan diabetes dengan karakteristik yang sesuai dengan diabetes mellitus tipe 2.

5.1.3 Interpretasi Kadar *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α)

Hasil analisis Pengaruh *EH-MSCs* terhadap kadar TNF- α pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 dianalisis pada hari ke-30 dengan nilai K1 122.18, K2 121.81, K3 123.86 dan K4 119.82 (Tabel 5.2).

Tabel 5. 2 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji *Kruskal Wallis* pada Kadar TNF- α

Variabel	Kelompok				Sig. (p)
	K1 n=6	K2 n=6	K3 n=6	K4 n=6	
Ekspresi TNF- α					
$\bar{x} \pm SD$	122.18 $\pm$ 2.84	121.81 $\pm$ 2.48	123.86 $\pm$ 1.67	119.82 $\pm$ 12.75	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.26*	0.62*	0.69*	<0.001	
<i>Kruskal Wallis</i>					0.448

* *Uji Saphiro Wilk* $P > 0,05$ Normal * *Kruskal Wallis* $P < 0.05$ Signifikan

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rerata kadar TNF- α tertinggi pada kelompok K3 yaitu sebesar 123.86. Kadar TNF- α terendah terdapat pada kelompok K4 sebesar 119 yaitu kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 500 μ L. Rerata kadar TNF- α pada semua kelompok dilakukan uji *shapiro wilk*. Sebaran normalitas data dalam masing-masing kelompok terhadap kadar TNF- α didapatkan sebaran data dalam keempat kelompok tersebut tidak normal Dimana ada salah satu kelompok yaitu kelompok K4 nilai p tidak

$> 0,05$. Sebaran data tidak normal dilanjutkan dengan uji non parametric *Kruskal wallis* untuk membandingkan empat kelompok penelitian. Uji *Kruskal wallis* didapatkan nilai p tidak $< 0,05$ dimana menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan.

Berdasarkan uji analisis didapatkan hasil bahwa *EH-MSCs* dengan dosis 250 μL dan 500 μL tidak berpengaruh terhadap kadar $\text{TNF-}\alpha$ secara signifikan. Namun ekspresi relative kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada masing-masing kelompok menunjukkan perbedaan seperti yang ditampilkan pada gambar 5.5



Gambar 5. 5 Grafik Kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada Semua Kelompok Penelitian

5.1.4 Interpretasi Ekspresi *Glucose Transporter Type 4 (GLUT4)*

Hasil pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi GLUT4 pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 dianalisis pada hari ke-28 menunjukkan ekspresi masing-masing K1 0.76, K2 0.82, K3 0.94 dan K4 0.75(Tabel 5.3).

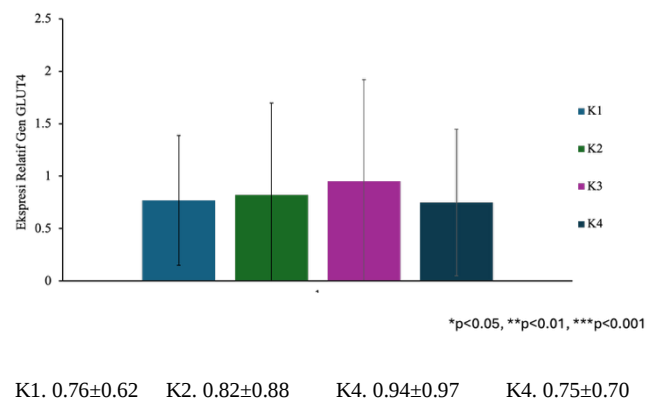
Tabel 5. 3 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji Homogenitas pada Ekspresi GLUT4

Variabel	Kelompok				Sig. (p)
	K1 n=6	K2 n=6	K3 n=6	K4 n=6	
Ekspresi GLUT4					
$\bar{X} \pm SD$	0.76 $\pm$ 0.62	0.82 $\pm$ 0.88	0.94 $\pm$ 0.97	0.75 $\pm$ 0.70	
Shapiro Wilk	0.63*	0.70*	0.11*	0.70*	
Levene Test					0.639*
One Way Anova					0.974

* Uji Saphiro Wilk $p > 0,05$ Normal, Levene Test $p > 0,05$ Homogen* Kruskal Wallis $p < 0.05$ Signifikan

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa rerata ekspresi GLUT4 tertinggi pada kelompok K3 yaitu kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 μ L sebesar 0.94. Ekspresi GLUT4 terendah terdapat pada kelompok K4 yaitu kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 500 μ L sebesar 0.75. Rerata ekspresi GLUT4 pada semua kelompok berdasarkan uji *shapiro wilk* dengan nilai $p > 0,05$ dan *levене test* dengan nilai $p > 0,05$ didapatkan data terdistribusi normal dan homogen. Sebaran data dilanjutkan dengan analisis data menggunakan uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai p tidak $< 0,05$ menunjukkan hasil data tidak terdapat perbedaan signifikan pada kelompok penelitian.

Berdasarkan data didapatkan hasil bahwa *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh dalam ekspresi GLUT4 secara signifikan meskipun nilai ekspresi GLUT pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 μ L lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya perbedaan seperti yang ditampilkan pada gambar 5.6.



Gambar 5. 6 Grafik Ekspresi GLUT4 pada Semua Kelompok Penelitian

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Pemberian metformin menurunkan GDS melalui aktivasi AMPK yang meningkatkan sensitivitas insulin dan ekspresi GLUT4^{88,89}. Eksosom dosis 250 μ L memberi penurunan GDS paling optimal karena kandungan miRNA dan faktor antiinflamasi yang memperbaiki respon insulin^{90,91}. Sedangkan pada dosis 500 μ L, efeknya lebih rendah, kemungkinan akibat saturasi dosis, peningkatan klirens di hati/limpa, atau pembentukan protein corona yang membatasi efektivitas.^{92–94}

Metformin bekerja terutama melalui penghambatan kompleks I pada rantai transpor elektron mitokondria, yang meningkatkan rasio AMP/ATP dan mengaktifkan AMP-activated protein kinase (AMPK).⁹⁵ Aktivasi AMPK kemudian memicu sejumlah jalur kunci dengan meningkatkan phosphorylasi dan aktivasi GLUT4 melalui mekanisme seperti AMPK-AS160-PKC (Rab4), serta jalur Cbl/CAP/Src, memfasilitasi translokasi GLUT4 ke membran sel, sehingga mempercepat pengambilan glukosa oleh otot (serta lemak) secara insulin-independen.⁹⁶

Lebih jauh, AMPK yang diaktifkan metformin juga menghambat jalur inflamasi NF- κ B, menekan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α —baik di makrofag maupun jaringan adiposa. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa metformin menurunkan ekspresi TNF- α , iNOS, dan COX-2 melalui penghambatan NF- κ B,⁹⁷ sedangkan studi lain menjelaskan bahwa aktivasi AMPK oleh metformin menghambat sinyal TNF- α /NF- κ B melalui berbagai mediator seperti PTEN, ATF-3, dan HDAC5/KLF2. Pada tikus obesitas, pemberian metformin menurunkan tingkat TNF- α dalam serum dan jaringan adiposa.^{97,98}

Hasil penelitian terhadap kadar TNF- α dan ekspresi GLUT4 pada Tikus Jantan Galur Wistar model diabetes mellitus tipe 2 yang diberikan injeksi EH-MSCs dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil analisis kadar TNF- α diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Meskipun rerata kadar TNF- α tertinggi tercatat pada kelompok K3 dan terendah pada kelompok K4. Mengindikasikan bahwa pemberian EH-MSCs maupun metformin belum mampu menurunkan kadar TNF- α secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa kondisi hiperglikemia kronis seperti pada model tikus diabetes tipe 2, lingkungan jaringan yang proinflamasi dan resistensi insulin sistemik dapat mengurangi efektivitas exosome. Hal ini disebabkan oleh stres oksidatif yang mengganggu interaksi antara exosome dengan sel target, sehingga efek antiinflamasi tidak tercapai secara maksimal.⁹⁹

Meskipun metformin dikenal memiliki efek antiinflamasi melalui aktivasi jalur AMPK, beberapa studi menunjukkan bahwa penurunan TNF- α yang signifikan hanya terjadi pada pemberian jangka panjang atau pada individu dengan inflamasi sistemik ringan.¹⁰⁰

Hasil penelitian ini juga menunjukkan tidak terdapat peningkatan ekspresi GLUT4 secara signifikan pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, meskipun pada analisa rerata menunjukkan bahwa K3 yaitu kelompok perlakuan *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L memiliki rerata ekspresi GLUT4 paling besar yang menandakan peningkatan ekspresi GLUT4 dibandingkan kelompok kontrol yang diberikan injeksi NaCl dan metformin per oral dan *EH-MSCs* dengan dosis 500 μ L. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian exosome MSC hipoksia maupun metformin belum mampu meningkatkan ekspresi GLUT4 secara signifikan pada tikus model diabetes melitus tipe 2. Ekspresi GLUT4 sangat dipengaruhi oleh aktivasi jalur insulin signaling, terutama melalui IRS-1/PI3K/Akt pathway. Pada kondisi resistensi insulin, sinyal ini terganggu sehingga translokasi maupun ekspresi GLUT4 ke permukaan sel menjadi terhambat meskipun ada stimulus terapi.¹⁰¹

Selain itu, distribusi sistemik exosome yang diberikan secara intravena tidak menjamin akumulasi pada jaringan target seperti otot rangka atau adiposa, tempat utama ekspresi GLUT4 terjadi. Tanpa adanya sistem penghantaran spesifik ke jaringan tersebut, efektivitas terapi berbasis exosome dapat berkurang secara substansial.¹⁰² Rute pemberian eksosom mesenkimal (MSC-Exos) dapat memengaruhi tingkat efektivitas terapinya. Pemilihan rute

tersebut umumnya disesuaikan dengan karakteristik dan jenis penyakit yang ditargetkan.¹⁰³

5.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang dapat mempengaruhi interpretasi hasil antara lain :

1. Variabilitas GDS antar hewan tinggi GDS

Nilai GDS awal (sebelum perlakuan) pada tikus menunjukkan perbedaan yang cukup besar antar individu dan kelompok. Kondisi ini dapat dipengaruhi oleh sensitivitas individual terhadap induksi STZ + nikotinamid, status metabolik dasar masing-masing hewan, serta faktor biologis lain seperti usia, berat badan, dan respon imun.¹⁰⁴ Akibatnya, meskipun perlakuan (metformin maupun eksosom) memperlihatkan tren penurunan GDS, hasil akhirnya menjadi kurang konsisten secara statistik karena tingginya deviasi standar.

Variabilitas ini juga diperburuk karena GDS tidak dijadikan kovariat dalam analisis, sehingga efek perlakuan sulit dipisahkan dari perbedaan biologis awal antar hewan. Dalam model hewan T2DM, variabilitas kadar glukosa darah memang telah dilaporkan cukup besar, khususnya pada model STZ + NA, karena sebagian tikus mengalami kerusakan sel β yang lebih berat dibanding lainnya, sementara sebagian masih mempertahankan fungsi pankreas parsial.¹⁰⁵

2. Pengukuran TNF- α dan GLUT4

Pengukuran hanya dilakukan pada hari ke-28, yaitu tujuh hari setelah dosis terakhir. Padahal, pada model STZ+NA, fase puncak inflamasi (kenaikan TNF- α) umumnya terjadi pada hari ke-3 hingga ke-14 pasca-induksi dan bertransisi ke fase kronik setelahnya.¹⁰⁵ Demikian juga, regulasi GLUT4 bersifat dinamis dan dapat meningkat lebih awal setelah aktivasi AMPK atau terapi eksosom.¹⁰⁶ Oleh karena itu, pengukuran tunggal di H28 berpotensi melewati fase puncak respon, sehingga perbedaan antar kelompok tampak kecil dan tidak signifikan meskipun arah perubahan sesuai dengan hipotesis.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian *EH-MSCs* dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar TNF- α secara bermakna pada tikus model diabetes mellitus tipe 2.
2. Pemberian *EH-MSCs* dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan ekspresi GLUT4 secara bermakna pada tikus model diabetes mellitus tipe 2.
3. Tidak terdapat perbedaan efektivitas yang signifikan antara pemberian *EH-MSCs* dosis 250 μ L dan dosis 500 μ L dalam memodulasi kadar TNF- α maupun ekspresi GLUT4 pada tikus model diabetes mellitus tipe 2 sehingga peningkatan dosis tidak memberikan manfaat tambahan yang bermakna.

6.2 Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Untuk meminimalkan variabilitas biologis antar hewan, sebaiknya ditetapkan kriteria inklusi berdasarkan GDS baseline, misalnya hanya memasukkan tikus dengan kadar GDS 200–400 mg/dL pada hari ke-14 pasca-induksi, sementara hewan dengan GDS <200 mg/dL (gagal induksi) atau >500 mg/dL (hiperglikemia ekstrem) dieksklusi. Strategi ini akan membuat populasi hewan lebih homogen dan mengurangi bias akibat

perbedaan respons individu terhadap induksi STZ + nikotinamid. Selain itu, nilai GDS awal dapat dijadikan kovariat dalam analisis statistik (misalnya dengan ANCOVA atau analisis Δ /perubahan dari baseline), sehingga efek perlakuan dapat dievaluasi lebih akurat tanpa tercampur pengaruh baseline yang berbeda-beda. Pendekatan tambahan yang juga direkomendasikan adalah melakukan stratified randomization atau blocking berdasarkan kuartil GDS baseline sebelum pembagian tikus ke dalam kelompok perlakuan, sehingga distribusi kadar glukosa awal lebih seimbang antar kelompok dan hasil yang diperoleh menjadi lebih valid.

2. Untuk pemberian metformin dan exosome dengan dosis 250 dan 500, sebaiknya pengukuran TNF- α dan GLUT4 juga dilakukan pada waktu-waktu yang sama (hari ke-3, ke-7, ke-14, dan ke-28) agar dapat secara jelas memantau efek dosis tersebut secara dinamis. Dengan melakukan pengukuran berulang, kita bisa mengevaluasi bagaimana masing-masing dosis metformin dan exosome memengaruhi fase inflamasi serta regulasi GLUT4 secara temporal. Hal ini penting untuk menentukan apakah dosis 250 dan 500 memiliki perbedaan efektivitas dalam menurunkan TNF- α dan meningkatkan ekspresi GLUT4, serta untuk mengidentifikasi waktu optimal di mana efek terapi paling signifikan muncul. Pendekatan ini juga membantu memahami hubungan dosis-respons dan memastikan bahwa dosis yang dipilih benar-benar memberikan manfaat terapeutik yang maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Farmaki P, Damaskos C, Garmpis N, Garmpi A, Savvanis S, Diamantis E. Complications of the Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Cardiol Rev* 2021;16(4):249–251.
2. Bahadoran Z, Mirmiran P, Kashfi K, Ghasemi A. Vascular nitric oxide resistance in type 2 diabetes. *Cell Death Dis* 2023;14(7):410.
3. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1(July):1–23.
4. Dinas Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar. *Diabetes Mellitus* 2013;87–90.
5. Ezzat Abd El-Raouf Mohamed M, Khalil Ahmed Y, Mohammed Ghamry E, Abd El-Hamid Khedr M. Study of Serum Tumor Necrosis Factor Alpha Level in Prediabetics and Type 2 Diabetic Egyptian Patients. *Al-Azhar Medical Journal* 2022;51(2):1193–1198.
6. Li M, Chi X, Wang Y, Setrerrahmane S, Xie W, Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):1–25.
7. Sun H, Saeedi P, Karuranga S. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2022;183:109119.
8. Oktora SI, Butar DB. Determinants of Diabetes Mellitus Prevalence in Indonesia. *Kemas* 2022;18(2):266–273.
9. Wahidin M, Achadi A, Besral B. Projection of diabetes morbidity and mortality till 2045 in Indonesia based on risk factors and NCD prevention and control programs. *Sci Rep* 2024;14(1):1–17.
10. Nikfarjam S, Rezaie J, Zolbanin NM, Jafari R. Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. *Journal of Translational Medicine* 2020 18:1 [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 May 21];18(1):1–21. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02622-3>
11. Chen M ting, Zhao Y ting, Zhou L yuan. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Enhance Insulin Sensitivity in Insulin Resistant Human Adipocytes. *Curr Med Sci* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 May 21];41(1):87–93. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11596-021-2323-4>
12. Cheng P, Xie X, Hu L. Hypoxia endothelial cells-derived exosomes facilitate diabetic wound healing through improving endothelial cell function and promoting M2 macrophages polarization. *Bioact Mater* [homepage on the Internet] 2023 [cited 2025 May 21];33:157. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10681882/>
13. Mabrouk A A-Z, Soha S M, Ahmed H I. Evaluation of Some Inflammatory Cytokines Levels as A Marker for Diabetes. *Int J Immunol Immunother* 2022;9(1):065.
14. Susanti Vinski D, Cinta Vinski Borneo N. Therapeutic of Mesenchymal Stem Cells in Diabetes. *Journal of World Science* 2023;2(11):1867–1884.

15. Gao S, Dong Y, Yan C, Yu T, Cao H. The role of exosomes and exosomal microRNA in diabetic cardiomyopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14:1327495.
16. Shalaby MS, Abdel-Reheim ES, Almanaa TN. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell conditioned media on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Regen Ther* [homepage on the Internet] 2025 [cited 2025 May 16];28:1–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352320424001962>
17. Sazli BI, Lindarto D, Hasan R. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease. 2023;
18. Khalil DY, Hussein RH, El-Kholy WM. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with Selenium or Nano Selenium as a Novel Therapeutic Paradigm for Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Rats. *Biology (Basel)* [homepage on the Internet] 2024 [cited 2025 May 16];13(4):253. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11048049/>
19. Lu X, Xie Q, Pan X. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9(1):262.
20. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Med J* 2012;27(4):269–273.
21. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2020;21(17):6275.
22. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444(7121):860–867.
23. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. *Mol Metab* 2021;46(October):101102.
24. Huang X, Liu G, Guo J, Su ZQ. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci* [homepage on the Internet] 2018 [cited 2025 May 30];14(11):1483–1496. Available from: <http://www.ijbs.com1483>
25. Kong M, Xie K, Lv M. Anti-inflammatory phytochemicals for the treatment of diabetes and its complications: Lessons learned and future promise. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 May 23];133. Available from: https://www.researchgate.net/publication/347271436_Anti-inflammatory_phytochemicals_for_the_treatment_of_diabetes_and_its_complications_Lessons_learned_and_future_promise
26. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem* 2018;119(1):105–110.
27. Popa C, Netea MG, Riel PLCM van, Meer JWM van der, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2007;48(4):751–762.
28. Lampropoulou IT, Stangou M, Sarafidis P. TNF- α pathway and T-cell immunity are activated early during the development of diabetic

- nephropathy in Type II Diabetes Mellitus. *Clinical Immunology* 2020;215(April).
29. Omote K, Gohda T, Murakoshi M. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A y mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2014;306(11):F1335–F1347.
 30. Hu J, Liu X, Chi J. Resveratrol Enhances Wound Healing in Type 1 Diabetes Mellitus by Promoting the Expression of Extracellular Vesicle-Carried MicroRNA-129 Derived from Mesenchymal Stem Cells. *J Proteome Res* 2022;21(2):313–324.
 31. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol* 2016;4.
 32. Lee DC, Choi H, Oh J-M. Urban particulate matter regulates tight junction proteins by inducing oxidative stress via the Akt signal pathway in human nasal epithelial cells. *Toxicol Lett* 2020;333:33–41.
 33. Hornsby PJ. Regulation of cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *Journal of Biological Chemistry* 1980;255(9):4020–4027.
 34. Pu X, Storr SJ, Zhang Y. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis* 2017;22(3):357–368.
 35. Matteo M, Cicinelli E, Neri M. Pro-inflammatory M1/Th1 type immune network and increased expression of TSG-6 in the eutopic endometrium from women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2017;218:99–105.
 36. Duan YW, Chen SX, Li QY, Zang Y. Neuroimmune Mechanisms Underlying Neuropathic Pain: The Potential Role of TNF- α -Necroptosis Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 7191 [homepage on the Internet] 2022 [cited 2025 May 23];23(13):7191. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/13/7191/htm>
 37. Bakshi HA, Quinn GA, Nasef MM. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via TNF- α /NF- κ B/VEGF Pathways. *Cells* 2022;11(9):1502.
 38. Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes* 2013;6(1):275.
 39. Lakshmanan J, Zhang B, Wright K. Tender coconut water suppresses hepatic inflammation by activating AKT and JNK signaling pathways in an in vitro model of sepsis. *J Funct Foods* 2020;64:103637.
 40. Huang S, Czech MP. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab* 2007;5(4):237–252.
 41. Gerwen J van, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans* [homepage on the Internet] 2023 [cited 2025 Jun 13];51(3):1057. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10317183/>

42. Sano H, Kane S, Sano E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry* [homepage on the Internet] 2003 [cited 2025 Jun 13];278(17):14599–14602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12637568/>
43. Leguisamo NM, Lehn AM, Machado UF. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11(1):1.
44. Singh R, Ashish A, Shah A, Shekhar Pandey S. Interaction between oxidative stress and diabetes: a mini-review. *J Diabetes Metab Disord Control* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 May 23];7(2):58–61. Available from: https://www.researchgate.net/publication/342533641_Interaction_between_oxidative_stress_and_diabetes_a_mini-review
45. Kahn SE, Cooper ME, Prato S Del. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *The Lancet* 2014;383(9922):1068–1083.
46. Gerwen J van, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 2023;51(3):1057–1069.
47. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells* 2019;12(2):218–226.
48. Ong WK, Chakraborty S, Sugii S. Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Biomolecules* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 Jun 13];11(7):918. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8301750/>
49. Mikłosz A, Nikitiuk BE, Chabowski A. Using adipose- derived mesenchymal stem cells to fight the metabolic complications of obesity: Where do we stand? *Obesity Reviews* 2022;23(5).
50. Riazifar M, Pone EJ, Lotval J, Zhao W. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [homepage on the Internet] 2017 [cited 2025 Jun 13];57:125–154. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27814025/>
51. Jiao YR, Chen KX, Tang X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells in diabetes and diabetic complications. *Cell Death Dis* 2024;15(4).
52. Hu JC, Zheng CX, Sui BD, Liu WJ, Jin Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. *World J Stem Cells* 2022;14(5):318–329.
53. Shi H, Yang Z, Cui J, Tao H, Ma R, Zhao Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a promising alternative in the therapy of preeclampsia. *Stem Cell Res Ther* 2024;15(1):1–12.
54. Harrell CR, Simovic Markovic B, Fellabaum C. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases. *Adv Exp Med Biol* 2018;1089:47–57.

55. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Front Cell Dev Biol* 2021;9(August).
56. Szatmári T, Balázs K, Csordás IB, Sáfrány G, Lumniczky K. Effect of radiotherapy on the DNA cargo and cellular uptake mechanisms of extracellular vesicles. *Strahlentherapie und Onkologie* [homepage on the Internet] 2023 [cited 2025 May 23];199(12):1191–1213. Available from: https://www.researchgate.net/publication/371784990_Effect_of_radiotherapy_on_the_DNA_cargo_and_cellular_uptake_mechanisms_of_extracellular_vesicles
57. Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Eng Part B Rev* 2022;28(5):966–977.
58. Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A. The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Adv Pharm Bull* 2015;5(2):141–149.
59. Zhuo H, Chen Y, Zhao G. Advances in application of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Front Cell Dev Biol* 2024;12(August):1–8.
60. Yang T, Li W, Peng A, Liu J, Wang Q. Exosomes Derived from Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells Attenuates Cisplatin-Induced Ototoxicity in a Mouse Model. *J Clin Med* [homepage on the Internet] 2022 [cited 2025 Jun 13];11(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36012982/>
61. Hu X, Yu SP, Fraser JL. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [homepage on the Internet] 2008 [cited 2025 Jun 13];135(4):799–808. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18374759/>
62. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* [homepage on the Internet] 2014 [cited 2025 May 23];12(1):1–14. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-014-0260-8>
63. Moller DE. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2000;11(6):212–217.
64. Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab* 2021;3(10):1302–1312.
65. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005;54(10):2939–2945.
66. Mohallem R, Aryal UK. Regulators of TNF α mediated insulin resistance elucidated by quantitative proteomics. *Sci Rep* 2020;10(1):1–15.

67. Herman R, Kravos NA, Jensterle M, Janež A, Dolžan V. Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport. *Int J Mol Sci* 2022;23(3).
68. Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, Josey MA, Olson AL. Moderate glut4 overexpression improves insulin sensitivity and fasting triglyceridemia in high-fat diet-fed transgenic mice. *Diabetes* 2013;62(7):2249–2258.
69. Gray SG. The Potential of Epigenetic Compounds in Treating Diabetes. In: *Epigenetics in Human Disease*. Elsevier, 2012; p. 331–367.
70. Xiong J, Hu H, Guo R, Wang H, Jiang H. Mesenchymal Stem Cell Exosomes as a New Strategy for the Treatment of Diabetes Complications. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12(April):1–10.
71. Yang M, Chen J, Chen L. The roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in diabetes mellitus and its related complications. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13(October):1–16.
72. Irawan RCS, Putra A, Setyo T, Ghaisani SS, Hidayah N. Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells decrease tumor necrosis factor- α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes mellitus model rats. *Universa Medicina* 2023;42(3):320–328.
73. Ferguson SW, Wang J, Lee CJ. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Scientific Reports* 2018 8:1 [homepage on the Internet] 2018 [cited 2025 May 22];8(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19581-x>
74. Qian X, Xu C, Fang S. Exosomal MicroRNAs Derived From Umbilical Mesenchymal Stem Cells Inhibit Hepatitis C Virus Infection. *Stem Cells Transl Med* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 May 22];5(9):1190–1203. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4996444/>
75. Gao S, Dong Y, Yan C, Yu T, Cao H. The role of exosomes and exosomal microRNA in diabetic cardiomyopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14:1327495.
76. Sui M, Li T, Lu H. SOCS3 inhibits the mesenchymal stromal cell secretory factor SDF-1-mediated improvement of islet function in non-obese diabetic mice. *Stem Cell Res Ther* 2023;14(1):1–13.
77. Jorgensen SB, O'Neill HM, Sylow L. Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. *Diabetes* 2013;62(1):56–64.
78. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean Journal of Internal Medicine* 2010;25(2):119–129.
79. Chen G, Fan XY, Zheng XP, Jin YL, Liu Y, Liu SC. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance via PTEN-mediated crosstalk between the PI3K/Akt and Erk/MAPKs signaling pathways in the skeletal muscles of db/db mice. *Stem Cell Res Ther* 2020;11(1):1–13.
80. Alzamil H. Elevated Serum TNF- α Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Associated with Glycemic Control and Insulin Resistance. *J Obes* 2020;2020:5–9.

81. Chang YC, Hee SW, Chuang LM. T helper 17 cells: A new actor on the stage of type 2 diabetes and aging? *J Diabetes Investig* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 May 23];12(6):909. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8169348/>
82. Liu X, Gong M, Wu N. Research progress on the relationship between free fatty acid profile and type 2 diabetes complicated by coronary heart disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2024;15:1503704.
83. Li M, Chi X, Wang Y, Setrerrahmane S, Xie W, Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 [homepage on the Internet] 2022 [cited 2025 May 23];7(1):1–25. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01073-0>
84. Song G, Huang Y, Xiong M. Alopentine Relieves Type 2 Diabetes Mellitus via Enhancing GLUT4 Expression and Translocation. *Front Pharmacol* 2021;11(January):1–15.
85. Lotfy A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther* 2023;14(1):1–18.
86. Liu X, Qu X, Chen Y. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Induce the Generation of Novel IL-10–Dependent Regulatory Dendritic Cells by SOCS3 Activation. *The Journal of Immunology* 2012;189(3):1182–1192.
87. Li B, Li C, Zhu M. Hypoxia-Induced Mesenchymal Stromal Cells Exhibit an Enhanced Therapeutic Effect on Radiation-Induced Lung Injury in Mice due to an Increased Proliferation Potential and Enhanced Antioxidant Ability. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2017;44(4):1295–1310.
88. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017;60(9):1577–1585.
89. Zhang C-S, Li M, Ma T, Zong Y, Cui J. Metformin activates AMPK through the lysosomal pathway. *Cell Metab* 2016;24(4):521–522.
90. Sun Y, Shi H, Yin S, Ji C, Zhang X. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction. *ACS Nano* 2018;12(8):7613–7628.
91. Liu J, Qiu X, Lv Y, Zheng C, Dong Y, Dou G. Exosomes secreted by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate insulin resistance and improve glucose homeostasis in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;529(4):912–7.
92. Gupta D, Zickler A, Andaloussi S El. Dosing extracellular vesicles. *J Control Release* 2021;335:236–48.
93. Hagey D, Åström I, Agholme L. The cellular response to extracellular vesicles is considerably driven by dose. *Sci Adv* 2023;9(34).
94. Heidarzadeh M, Zarebkohan A, Rahbarghazi R, Sokullu E. Protein corona and exosomes: new challenges and prospects. *Cell Communication and Signaling* 2023;21(1):64.
95. Lin H, Ao H, Guo G, Liu M. The role and mechanism of metformin in inflammatory diseases. *J Inflamm Res* 2023;5545–5564.

96. Lee JO, Lee SK, Kim JH, Kim N, You GY. Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(53):44121–44129.
97. Hyun B, Shin S, Lee A, Lee S, Song Y. Metformin down-regulates TNF- α secretion via suppression of scavenger receptors in macrophages. *Immune Netw* 2013;13(4):123–132.
98. Kristófi R, Eriksson JW. Metformin as an anti-inflammatory agent: a short review. *Journal of Endocrinology* 2021;251(2):R11–R22.
99. Hu W, Song X, Yu H, Sun J, Zhao Y. Therapeutic potentials of extracellular vesicles for the treatment of diabetes and diabetic complications. *Int J Mol Sci* 2020;21(14):5163.
100. Yang M, Chen J, Chen L. The roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in diabetes mellitus and its related complications. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:1027686.
101. Zhao C, Chen J, Cheng L, Yang G, Li J. MSC-derived exosomes improve glucose uptake and insulin sensitivity by regulating IRS-1 and GLUT4 in insulin-resistant skeletal muscle. *Biomolecules* 2020;10(6):909.
102. Kang J, Park H, Kim J, Lee YS. Mesenchymal stem cell-derived exosomes modulate insulin sensitivity and glucose metabolism in diabetic rats. *Stem Cell Rev Rep* 2022;18(5):1530–1542.
103. Xie S, Liu M, Kong Y, Yang Y, Chen R. Mesenchymal stromal/stem cell-derived exosomes as a potential therapeutic approach to osteoarthritis combined with type 2 diabetes mellitus. *Front Cell Dev Biol* 2025;13:1549096.
104. Yan L-J. The nicotinamide/streptozotocin rodent model of type 2 diabetes: renal pathophysiology and redox imbalance features. *Biomolecules* 2022;12(9):1225.
105. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI J* 2023;22:274.
106. Wang T, Sheng H, Shi Y. Current understanding of GLUT4 expression and regulation. *World J Diabetes* 2020;11(6):76–89.