

**PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS (EH-MSCs)* TERHADAP EKSPRESI
HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1A DAN *INDUCIBLE
NITRIC OXIDE SYNTHASE***

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

TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister Ilmu Biomedik**



Disusun Oleh:

**Heryani Rambe
MBK 2423010449**

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

TESIS

**PENGARUH EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS (EH-MSCs) TERHADAP EKSPRESI
HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1-ALPHA DAN
INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE**
(Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Wistar Model Diabetes Melitus
Tipe 2)

Disusun Oleh:

Heryani Ranibe
MBK 24.23.010449

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. Ir. 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 pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 30 Juli 2025

Yang menyatakan



dr. Heryani Rambe

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Heryani Rambe
Tempat / tanggal lahir : Palembang, 30 Januari 1987
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

TK Aisyah Palembang : Lulus tahun 1992
SDN 1 Palembang : Lulus tahun 1998
SMPN 1 Palembang : Lulus tahun 2001
SMAN 1 Palembang : Lulus tahun 2004
S1 FK Universitas Yarsi : Lulus tahun 2008
Profesi Dokter Universitas Yarsi : Lulus tahun 2011
Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2024 – sekarang)

C. Riwayat keluarga

Nama Suami : dr. Rangga Kusuma Maulana, SpB-KBD
Nama Anak : Raya Adha Ilyasa
Gani Mikail Hassan
Rabbani Maulana Turkis

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan izin-NYA, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal tesis yang berjudul “**PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP EKSPRESI *HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1A* DAN *INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE* (Studi Eksperimental *In Vivo* Tikus Wistar Model Diabetes Melitus Tipe 2)**”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Dengan demikian, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih yang mendalam 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 diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.

5. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes pembimbing kedua, yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo M.Kes 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. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, pengetahuan, serta referensi yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki banyak kekurangan dan memerlukan pengembangan lebih lanjut agar benar-benar bermanfaat. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk penyempurnaan proposal tesis ini, serta sebagai masukan bagi penulis dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa depan.

Semarang, 22 April 2025
Penulis,

Heryani Rambe
MBK2423010449

ABSTRAK

Latar Belakang: Kondisi hiperglikemia pada T2DM menyebabkan hipoksia kronis yang akan mencetuskan terjadinya degradasi ekspresi HIF-1 α , peningkatan iNOs dan inflamasi kronis. Potensi miRNA yang terdapat dalam *EH-MSCs* membuka kesempatan terapi baru yang dapat memodulasi inflamasi terutama ekspresi HIF-1 α dan iNOS sebagai bagian dari pendekatan terapeutik untuk mengatasi gangguan vaskular pada T2DM.

Tujuan: Mengetahui pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi HIF-1 α dan iNOS 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. Ekspresi HIF-1 α dan iNOS diperiksa menggunakan qRT-PCR. Ekspresi HIF-1 α dan iNOS dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis*.

Hasil: Rerata ekspresi HIF-1 α tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* yaitu kelompok K3 (0.91 ± 0.35) dan K4 (1.13 ± 0.72). Rerata ekspresi iNOS terendah terdapat pada kelompok K3 perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 μ L (1.56 ± 0.90). Hasil uji statistik *Kruskal Wallis* menunjukkan *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh dalam ekspresi HIF-1 α dan iNOS secara signifikan dengan nilai $p > 0,05$.

Kesimpulan: Pemberian *EH-MSCs* tidak berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi HIF-1 α dan iNOS pada tikus model diabetes mellitus tipe 2.

Kata Kunci: *EH-MSCs*, *Exosomes*, *Hypoxia*, HIF-1 α , iNOS

ABSTRACT

Background: Chronic hyperglycemia conditions in T2DM cause chronic hypoxia, which leads to the degradation of HIF-1 α , increased iNOS, and chronic inflammation. The miRNA potential found in EH-MSCs opens up promising new therapeutic strategies that can modulate inflammation, especially the expression of HIF-1 α and iNOS as targeted markers to address T2DM vascular disorders.

Objective: To determine the effect of EH-MSCs on the expression of HIF-1 α and iNOS in diabetic rats compared to controls.

Methods: This experimental study used a Post Test Only Control Group Design. A total of 28 Wistar rats with T2DM were divided into 4 groups (K1-K4). The negative control group (K1) received NaCl 0.9% 300 μ L, the positive control group (K2) received metformin 300 mg/kgBW orally, treatment group 1 (K3) received EH-MSCs 250 μ L IV, and treatment group 2 (K4) received EH-MSCs 500 μ L IV. HIF-1 α and iNOS expression was analyzed using qRT-PCR. HIF-1 α and iNOS expression was analyzed using the *Kruskal Wallis* test.

Results: The highest mean HIF-1 α expression was found in the K3 and K4 groups (K3: 0.91 $\pm$ 0.35; K4: 1.13 $\pm$ 0.72). The highest mean iNOS expression was found in the K4 group (1.56 $\pm$ 0.90). The *Kruskal Wallis* test showed no significant difference in the mean expression of HIF-1 α and iNOS between the control and treatment groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Administration of EH-MSCs did not have a significant effect on the expression of HIF-1 α and iNOS in diabetic rats compared to controls.

Keywords: EH-MSCs, Exosomes, Hypoxia, HIF-1 α , iNOS

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
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
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	7
1.5.2. Manfaat Praktis	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2.....	9
2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	9
2.1.2 Penyebab Diabetes Mellitus Tipe 2.....	9
2.1.3 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2	10
2.1.4 Terapi Diabetes Mellitus Tipe 2	11
2.1.5 Komplikasi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	12
2.2 Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α).....	13
2.2.1 Definisi Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α)	13
2.2.2. Struktur Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α)	13
2.2.3 Peran Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α) Pada T2DM	14
2.3 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)	15
2.3.1 Definisi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS).....	15

2.3.2 Fungsi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS).....	15
2.3.3 Peran Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Pada T2DM	16
2.4 Peran <i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i> (HIF-1 α) dan <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) Pada kondisi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	17
2.5 Mesenchymal Stem Cells.....	18
2.5.1 Definisi Mesenchymal Stem Cells	18
2.5.2 Definisi Exosome derived from Mesenchymal Stem Cells (MSC-Exos).....	18
2.5.3 Hipoksia Pada Exosome derived from Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)	19
2.6 Pengaruh <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i> (EH-MSCs) Terhadap <i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i> (HIF-1 α) dan <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) Pada Diabetes Mellitus Tipe 2	21
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	24
3.1. Kerangka Teori	24
3.2. Kerangka Konsep.....	28
3.3. Hipotesis	28
BAB IV METODE PENELITIAN	29
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	29
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	31
4.2.1 Populasi Penelitian.....	31
4.2.2. Sampel Penelitian.....	31
4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian	31
4.2.4. Kriteria Inklusi	33
4.2.5. Kriteria Eksklusi.....	33
4.2.6. Kriteria Drop Out	33
4.3 Variabel dan Definisi Operasional.....	34
4.3.1. Variabel Bebas (Independen).....	34
4.3.2. Variabel Terikat (Dependen):	34
4.3.3. Variabel Prakondisi.....	35
4.3.4. Variabel Terkendali.....	35

4.3.5. Definisi Operasional.....	35
4.4 Bahan Penelitian	37
4.5 Alat Penelitian.....	38
4.6 Prosedur Penelitian	38
4.6.1. Perolehan Ethical Clearance	38
4.6.2. Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	39
4.6.3. Uji Validasi MSCs	39
4.6.4 Teknik Pengumpulan Sampel	41
4.6.5 Analisis Ekspresi HIF-1 α dan iNOS	42
4.8. Analisis Data.....	43
4.9 Alur Penelitian	45
4.10 Jadwal pelaksanaan penelitian	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
5.1 Hasil Penelitian	47
5.1.1 Isolasi <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (EH-MSCs)</i>	47
5.1.2 Validasi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus Wistar Model Diabetes Melitus Tipe 2	50
5.1.3 Ekspresi gen HIF-1 α	53
5.1.4 Ekspresi Gen iNOS	55
5.2 Pembahasan Hasil Penelitian	57
5. 3. Keterbatasan Penelitian.....	62
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	63
6.1 Kesimpulan	63
6.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR SINGKATAN

Akt	: Protein Kinase B
AGEs	: Advanced glycation end-products
bHLH	: Helix-loop-helix
EH-MSCs	: Exosome Hypoxia Mesenchymal stem cells
EVs	: Vesikel ekstraselulars
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GIP	: Gastric Inhibitory Peptide
GLP-1	: Glucagon-Like Peptide-1
GLUT	: Glucose transporters
HFD	: High-Fat Diet
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
HIF	: Hypoxia inducible factor
huc-MSCs	: Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells
IDF	: International Diabetes Federation
IGF	: Insulin-like Growth Factor
IL	: Interleukin
iNOS	: Inducible Nitric Oxide Synthase
IR	: Resistensi insulin
IRS1	: Insulin Receptor Substrate-1
JAK	: Janus kinase
LPS	: Lipopolysaccharide
miRNAs	: MicroRNAs
MSC-Exos	: Mesenchymal stem cells-derived Exosome
MSCs	: Mesenchymal Stem Cells
NA	: Nicotinamide
NF- κ B	: Nuclear Factor kappa B
NO	: Nitric oxide
NTA	: Nanoparticle Tracking Analysis
PARP	: Poly ADP-Ribose Polymerase
PBS	: Phosphate-buffered saline
PEPCK	: Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
PI3K	: Phosphoinositide-3-kinase
PGE2	: Prostaglandin E2
PGF2	: Prostaglandin F2
PKC	: Protein kinase C
PHDs	: Prolyl hydroxylase domain proteins
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RISKESDAS	: Riset Kesehatan Dasar
ROS	: Reactive Oxygen Species
SOD	: Superoxide dismutase
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
STZ	: Streptozotocin
T2DM	: Type 2 Diabetes Mellitus

TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF-Beta	: <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TLR	: <i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1 Originalitas Penelitian	5
Tabel 4. 1 Jadwal Penelitian.....	46
Tabel 5. 1 Hasil pengukuran gula darah dengan glukometer sebelum induksi dan sesudah induksi diabetes.....	51
Tabel 5. 2 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji Kruskal Wallis pada Ekspresi HIF-1 α	54
Tabel 5. 3 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji Kruskal Wallis pada Ekspresi iNOS.....	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Hipoksia memengaruhi sekresi dan miRNA <i>exosomes</i> . ⁷⁹	21
Gambar 3. 1 Kerangka Teori	27
Gambar 3. 2 Kerangka Konsep Penelitian	28
Gambar 4. 1 Alur Rancangan Penelitian	30
Gambar 4. 2 Alur Penelitian	45
Gambar 5. 1 (A)Validasi MSCs dengan pembesaran mikroskopik 40x di dapatkan morfologi sel MSC berbentuk spindle-like setelah pasase ke-4 MSC. (B) Deposisi kalsium terlihat sebagai warna merah setelah pewarnaan Alizarin Red muncul pada populasi MSC pada perbesaran 400x ...	48
Gambar 5. 2 MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,70%), CD29 (99.9%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (0,40%) dan CD31 (3,92%).	49
Gambar 5. 3 (A). Histogram flowcytometry untuk validasi penanda permukaan CD9 pada exosome menunjukkan konsentrasinya adalah 7.5 ug/mL. (B). Flowcytometry membuktikan eksosom dalam sampel mengekspresikan CD81 28,2%, CD63 28,2%, CD9 9.1%.	50
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 100x. 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.	52
Gambar 5. 5 Grafik rata rata Ekspresi HIF-1 α pada Semua Kelompok Penelitian	55
Gambar 5. 6 Grafik Ekspresi iNOS pada Semua Kelompok Penelitian.....	57

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) merupakan penyakit metabolik yang disebabkan oleh disfungsi sel β pankreas dan ketidakmampuan jaringan untuk merespon insulin dengan tepat (resistensi insulin).¹ Peningkatan kadar glukosa dalam jangka panjang menyebabkan glukotoksisitas dan lipotoksisitas yang mengakibatkan terjadinya resistensi insulin dan disfungsi sel β .² Lipotoksisitas terjadi karena peningkatan *free fatty acid* (FFA), menyebabkan meningkatnya aktivitas *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan disregulasi *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α).^{3,4} Peningkatan iNOS menyebabkan gangguan jalur insulin IRS/PI3K/Akt dan mencetuskan inflamasi melalui jalur NF- κ B mengakibatkan progresivitas dari resistensi insulin.⁴ Di sisi lain, disregulasi HIF-1 α menyebabkan peningkatan infiltrasi makrofag M1 pro-inflamasi dan ekspresi sitokin inflamasi yang berkontribusi pada disfungsi sel β pankreas.^{5,6}

Pasien dengan T2DM memiliki risiko kematian sebesar 15% lebih tinggi karena komplikasi makrovaskular seperti penyakit jantung dan serebrovaskular serta komplikasi mikrovaskular meliputi retinopati dan nefropati diabetes.^{1,7} Komplikasi tersebut terjadi pada T2DM karena kerusakan yang dimediasi inflamasi kronis.^{1,7} Obat antihiperglikemia oral (seperti metformin, sulfonilurea), serta terapi injeksi insulin meski telah banyak

digunakan, terapi ini masih belum mampu mengatasi resistensi insulin dan inflamasi kronis pada T2DM.^{8,9} Pendekatan yang lebih spesifik diperlukan untuk meningkatkan sensitivitas reseptor insulin, yang belum sepenuhnya ditargetkan oleh terapi konvensional. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan terapi baru yang tidak hanya mengontrol glukosa darah tetapi juga menargetkan mekanisme molekuler penyebab resistensi insulin dan inflamasi kronis.⁹

Salah satu pendekatan terapeutik yang saat ini masih banyak dikembangkan adalah *exosomes* yang dihasilkan dari *mesenchymal stem cells* (MSCs).⁷ *Exosomes* yang dihasilkan oleh MSCs mengandung berbagai molekul bioaktif seperti sitokin, interleukin contohnya IL-10 dan *microRNAs* (miRNAs) seperti miR-125a dan miR-146a-5p yang dapat memodulasi respon inflamasi dan meningkatkan proses penyembuhan.^{10,11} *MSC-Exos* yang telah diberikan senyawa tambahan maupun diprakondisikan sebelumnya dapat meningkatkan produksi dan kandungan *exosomes* yang memiliki potensi terapeutik, terutama dalam konteks perbaikan jaringan dan modulasi respons imun.^{12,13} *MSC-Exos* dengan antioksidan berupa nano-selenium dapat menekan inflamasi dan meningkatkan regenerasi pankreas secara signifikan lebih baik dibandingkan *MSC-Exos* yang tidak diberikan tambahan nano-selenium.¹³

Berdasarkan data dari *International Diabetes Federation* (IDF) tahun 2021 terdapat 537 juta penderita diabetes di seluruh dunia diproyeksikan meningkat menjadi 783 juta pada tahun 2045.¹⁴ Di Indonesia, data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) menunjukkan bahwa prevalensi diabetes meningkat dari 6,9% pada tahun 2013 menjadi 8,5% pada tahun 2018.¹⁵

Prevalensi diabetes di Indonesia diproyeksikan meningkat dari 9,19% (18,69 juta kasus) pada tahun 2020 menjadi 16,09% (40,7 juta kasus) pada tahun 2045.¹⁶ Angka ini menunjukkan peningkatan sebesar 75,1% dalam 25 tahun, dengan rata-rata kenaikan tahunan sebesar 3%.¹⁶ Hal ini menunjukkan dibutuhkan solusi inovatif dan efektif untuk menangani masalah diabetes.

Beberapa penelitian terdahulu menyebutkan bahwa penderita T2DM yang diterapi menggunakan *MSC-Exos* dapat meningkatkan potensi regeneratifnya seperti menekan ROS,¹⁷ menyeimbangkan ekspresi HIF-1 α ,¹⁸ memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan sel MSCs,¹⁹ serta efek positif dalam mengurangi resistensi insulin dan mencegah apoptosis sel β pankreas.²⁰ Kondisi hiperglikemia mencetuskan terjadinya hipoksia yang mengakibatkan peningkatan kebutuhan oksigen dalam memproduksi kebutuhan insulin sehingga sel mengeluarkan respon adaptasi dengan meningkatkan ekspresi HIF-1 α , namun apabila kondisi tersebut berlangsung secara kronis akan menyebabkan terjadinya degradasi ekspresi HIF-1 α , peningkatan iNOs dan inflamasi kronis.⁴⁻⁶

MSC-exos mengandung miRNA yang dapat bertindak sebagai mediator dalam proses perbaikan jaringan, mengatur inflamasi, dan memodulasi respons sel terhadap hipoksia, yang dapat berkontribusi pada perbaikan fungsi metabolik pada penderita T2DM.²¹ Pengetahuan tersebut juga diteliti sebelumnya pada tikus diabetes dengan stroke yang diberikan *MSC-exos* secara intravena menunjukkan perbaikan sel saraf dan meregulasi inflamasi.²² Penelitian lain mempelajari pengaruh dosis tunggal 10mg/kgBB hUC-MSC-

exos yang diberikan secara intravena pada tikus model diabetes, setelah 1 bulan menunjukkan peningkatan pengambilan glukosa dan mencegah apoptosis sel pankreas.²³ Potensi miRNA yang terdapat dalam *EH-MSCs* membuka kesempatan terapi baru yang dapat memodulasi inflamasi terutama ekspresi HIF-1 α dan iNOS sebagai bagian dari pendekatan terapeutik untuk mengatasi gangguan pada T2DM. Adanya kaitan antara HIF-1 α dan iNOS dengan patogenesis T2DM dan keterbatasan penelitian terkait peran *EH-MSCs* dalam mengendalikan ekspresi HIF-1 α dan iNOS, maka perlu dilakukan studi yang mempelajari pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi HIF-1 α dan iNOS pada tikus Wistar model DM Tipe 2. Dengan harapan penelitian ini dapat menjadi dasar untuk pengembangan terapi pada penderita T2DM dan aplikatif untuk mengatasinya

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells* (*EH-MSCs*) terhadap ekspresi *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* dan *inducible Nitric Oxide Synthase* pada tikus Wistar model Diabetes Melitus Tipe 2?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells* (*EH-MSCs*) terhadap ekspresi *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* dan *inducible Nitric Oxide Synthase* pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 dibandingkan dengan kontrol.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan khusus antara lain:

1. Menganalisa ekspresi *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 setelah pemberian *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)*.
2. Menganalisa ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* 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.	Shalaby MS, Abdel-Reheim ES, Almanaa TN, Alhaber LA, Nabil A, Ahmed OM, et al. Regenerative Therapy. 2025;28:1-11. ¹²	<i>Therapeutic effects of mesenchymal stem cell conditioned media on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats</i>	Experimen tal in vivo	<i>MSCs-CM</i> yang disuntikkan langsung ke pankreas dan intravena dibandingkan dengan obat antidiabetik standar, glimepiride pada tikus diabetes tipe 1 yang diinduksi streptozotocin berpengaruh pada peningkatan yang signifikan pada kadar glukosa darah dan hemoglobin glikosilasi A1c (HbA1c), panel lipid, dan penanda terkait apoptosis pancreas. Selain itu, perawatan tersebut menghasilkan penekanan stres oksidatif dan peningkatan antioksidan.
2.	Khalil DY, Hussein RH, El-Kholy WM. Mesenchymal Biology (Basel). 2024 Apr 11;13(4):253. ¹³	<i>Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with Selenium or Nano Selenium as a Novel Therapeutic Paradigm for Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Rats.</i>	Experimen tal in vivo	<i>Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes</i> dengan antioksidan berupa nano-selenium lebih efektif dibandingkan dengan <i>Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes</i> dengan selenium maupun tanpa tambahan selenium dalam mengurangi inflamasi,

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
				meningkatkan regenerasi pankreas, dan mengurangi apoptosis sel β .
3.	Sabry D, Marzouk S, Zakaria R, Ibrahim HA, Samir M., Biotechnol Lett. 2020 Aug;42(8):1597-1610. ¹⁹	<i>The effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of induced type 1 diabetes mellitus in rats</i>	Experimen tal in vivo	<i>Exosomes</i> dari MSCs menunjukkan peningkatan regenerasi pankreas dan ekspresi gen insulin yang lebih tinggi dibanding MSCs. Histologi menunjukkan perbaikan signifikan pada sel Langerhans.
4.	Venkat P, Zacharek A, Landschoot-Ward J, Wang F, Culmone L, Chen Z, et al. Experimental Neurology.2020;34:113456. ²²	<i>Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells harvested from type two diabetes rats promotes neurorestorative effects after stroke in type two diabetes rats</i>	Experimen tal in vivo	<i>Exosomes</i> dari MSCs sumsum tulang belakang tikus model T2DM meningkatkan pemulihan neurologis, mengurangi inflamasi, memperbaiki integritas pembuluh darah otak, dan mendorong remodeling jaringan pasca-stroke. Efek neurorestoratif ini signifikan dibandingkan dengan kontrol.
5.	Sun Y, Shi H, Yin S, Ji C, Zhang X, Zhang B, Wu P, Shi Y, Mao F, Yan Y, Xu W, Qian H. ACS Nano. 2018 Aug 28;12(8):7613-7628. ²³	<i>Human Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β-Cell Destruction.</i>	Experimen tal in vivo dan in vitro	<i>Exosomes</i> dari human umbilical cord MSCs membantu menurunkan kadar glukosa darah, meningkatkan sensitivitas insulin, dan memperbaiki transport glukosa ke dalam jaringan. Selain itu, <i>Exosomes</i> mengurangi apoptosis sel β pankreas, yang sangat penting untuk mengatasi komplikasi T2DM.
6.	Sazil BI, Lindarto D, Hasan R, Putra A, Pranoto A, Sembiring RJ, Ilyas S, Syafril S. Med Arch. 2023 APR; 77(2): 90-96. ²⁴	<i>Secretome of Hypoxia Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease</i>	Experimen tal in vivo	Injeksi <i>Secretome of Hypoxia Preconditioned Mesenchymal Stem Cells</i> pada hari ke 1,3,5,7,10 dan 14 memberikan peningkatan angiogenesis melalui peningkatan ekspresi gen VEGF dan peningkatan area positif CD31 secara signifikan di jaringan otot tikus diabetes dengan <i>peripheral artery disease</i> .

Penelitian sebelumnya banyak membahas mengenai pengaruh *exosome-MSCs* pada kasus diabetes tipe 1 maupun 2 dengan menilai pengaruhnya berdasarkan histopatologi, gula darah dan molekuler secara umum seperti HbA1c dan TNF- α .^{12,13,19,22,23} Hal tersebut yang dapat menjadi perbedaan pada penelitian ini yang secara khusus membahas mengenai pengaruh *EH-MSCs* pada kasus diabetes melitus tipe 2 melalui HIF-1 α dan iNOS. Pemberian *MSC-Exos* pada kasus diabetes melitus dilakukan secara intravena dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L berdasarkan studi sebelumnya.^{12,19,23} Pada penelitian ini menggunakan *exosomes* yang berasal dari *umbilical cord mesenchymal stem cells* yang diprakondisikan hipoksia dengan mengurangi kadar oksigen dalam *hypoxic chamber*. Teknik hipoksia ini belum banyak digunakan pada penelitian mengenai *exosomes* sebelumnya. Berdasarkan penelitian sebelumnya, *exosomes* dapat diberikan tanpa diprakondisikan terlebih dahulu. Namun beberapa studi menyebutkan dengan penambahan senyawa seperti antioksidan nano selenium maupun prakondisi dengan hipoksia dapat memberikan luaran yang lebih baik.^{13,24}

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

- Memberikan pemahaman tentang peran HIF-1 α dan iNOS pada patofisiologi T2DM.
- Memberikan pemahaman baru tentang mekanisme kerja *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* dalam meregulasi ekspresi HIF-1 α dan iNOS pada T2DM.

- Menjadi referensi bagi penelitian lanjutan untuk mengembangkan terapi berbasis *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* yang dapat diaplikasikan pada penyakit metabolik lain yang melibatkan hipoksia dan inflamasi.

1.5.2. Manfaat Praktis

- Memberikan dasar ilmiah untuk mengembangkan *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* sebagai terapi inovatif yang spesifik dan efektif dalam mengatur ekspresi HIF-1 α dan iNOS pada T2DM.
- Mendukung penerapan *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* dalam praktik klinis dengan menyediakan data empiris terkait ekspresi HIF-1 α dan iNOS sehingga dapat mempercepat penyembuhan dan regenerasi jaringan.
- Memberikan alternatif solusi berbasis bioteknologi untuk mengatasi komplikasi terutama komplikasi vaskular pada T2DM, yang dapat diintegrasikan dalam terapi medis atau farmasi untuk meningkatkan kualitas hidup pasien.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2

2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus Tipe 2

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) merupakan kelainan metabolisme multisistemik yang kompleks ditandai dengan kadar glukosa darah tinggi yang diakibatkan oleh gangguan dalam sekresi insulin atau resistensi jaringan terhadap insulin.²⁵ Kondisi ini telah menjadi masalah kesehatan global dengan prevalensi yang terus meningkat dan diproyeksikan jumlah penderita T2DM pada tahun 2030 adalah 643 juta.²⁶ 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 meliputi poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan.²⁷

2.1.2 Penyebab Diabetes Mellitus Tipe 2

Beberapa faktor risiko utama untuk T2DM meliputi obesitas, kurangnya aktivitas fisik, pola makan tidak sehat yang tinggi kalori, gula, dan lemak jenuh, serta rendah serat.²⁸ Risiko juga meningkat seiring bertambahnya usia, khususnya setelah 45 tahun, serta pada individu yang memiliki kebiasaan merokok.¹⁵ Namun studi terbaru

mempelajari bahwa terdapat hubungan yang kuat antara obesitas dan T2DM dan juga disebutkan bahwa T2DM bukan hanya sering terjadi pada orang tua, peningkatan dua sampai tiga kali lipat kejadian T2DM telah tercatat dalam beberapa tahun terakhir menunjukkan penderitanya merupakan orang yang lebih muda (<40 tahun).²⁵

2.1.3 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2

Patofisiologi T2DM disebabkan oleh kombinasi resistensi insulin pada jaringan perifer dan disfungsi progresif sel β pankreas.²⁸ Pada tahap awal perkembangan penyakit, sel β pankreas berusaha mengkompensasi resistensi insulin dengan meningkatkan sekresi insulin untuk mempertahankan homeostasis glukosa.²⁸ Namun, sering kali terjadi kegagalan sel β yang memperburuk hiperglikemia.¹ Keadaan ini mempengaruhi fungsi sel sehingga mengakibatkan jaringan kompleks perubahan patologis yang saling mempengaruhi dan menyebabkan berlanjutnya disfungsi insulin.^{1,29}

Obesitas sebagai salah satu faktor risiko mengakibatkan akumulasi produk sampingan metabolisme yang beracun dan peningkatan FFA, secara langsung menyebabkan akumulasi lemak visceral, yang memicu disfungsi mitokondria dan peningkatan ROS yang memperburuk kerusakan jaringan melalui jalur inflamasi, seperti aktivasi IL-6, TNF- α , dan IL-1 β .^{1,28} Kombinasi ini kemudian meningkatkan resistensi insulin dan merusak sel β pankreas.¹

2.1.4 Terapi Diabetes Mellitus Tipe 2

Penanganan T2DM mencakup edukasi pasien, terapi nutrisi medis, peningkatan aktivitas fisik, terapi farmakologis, dan pemantauan kondisi pasien secara teratur.³⁰ Secara farmakologis, pengobatan T2DM biasanya dimulai dengan metformin sebagai terapi lini pertama.³⁰ Metformin bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin di jaringan perifer, menurunkan produksi glukosa di hati, dan membantu menurunkan kadar gula darah puasa.³⁰ Metformin menurunkan ekspresi dan stabilitas HIF-1 α terutama melalui penghambatan Kompleks I rantai transpor elektron mitokondria, yang menurunkan konsumsi oksigen seluler dan meningkatkan degradasi HIF-1 α via jalur ubiquitin–proteasom tanpa memengaruhi transkripsi gen.^{31, 32, 33} Efek ini dapat terjadi baik melalui aktivasi AMPK maupun secara independen, dengan mekanisme utama berupa penurunan ROS dan pergeseran metabolisme sel ke arah oksidasi lemak.^{31,32} Dalam konteks inflamasi, metformin menghambat program proinflamasi yang dimediasi HIF-1 α di makrofag dengan mempercepat degradasinya.³⁴ Selain itu, metformin menekan ekspresi iNOS, yang pada DM tipe 2 biasanya diinduksi oleh jalur NF- κ B, melalui aktivasi AMPK yang menghambat fosforilasi IKK β sehingga mencegah translokasi p65 NF- κ B ke inti.^{35 36} Penurunan HIF-1 α juga turut mengurangi iNOS karena promotor iNOS mengandung elemen respons hipoksia (HRE) yang dikendalikan HIF-1 α .³⁵

Jika metformin sebagai monoterapi tidak cukup mengontrol glikemia, kombinasi dengan obat oral lain dapat diberikan, seperti sulfonilurea (yang merangsang sekresi insulin dari sel β pankreas), inhibitor DPP-4 (yang meningkatkan aktivitas inkretin), atau SGLT-2 inhibitor (yang meningkatkan ekskresi glukosa melalui urin).³⁰ Pada pasien dengan hiperglikemia berat atau gagal mencapai target kontrol gula darah, terapi insulin dapat diberikan, baik sebagai tambahan pada terapi oral atau sebagai pengobatan utama.^{29,30,37}

2.1.5 Komplikasi Diabetes Mellitus Tipe 2

Kondisi hiperglikemia kronis ini memicu serangkaian komplikasi mikroangiopati dan makroangiopati yang signifikan.³⁸ Komplikasi mikroangiopati meliputi nefropati diabetik, retinopati diabetik, dan neuropati diabetik.^{7,38} Nefropati diabetik terjadi akibat hiperglikemia yang menyebabkan stres oksidatif dan peradangan, mengakibatkan kerusakan pada glomerulus dan progresi menuju gagal ginjal kronis.⁷ Retinopati diabetik disebabkan oleh kerusakan mikrovaskular pada retina yang menyerang sekitar 30–40% pasien T2DM dan lebih sering terjadi pada wanita, namun perjalanan penyakitnya lebih parah pada pria.²⁵ Retinopati diabetik dapat menyebabkan gangguan penglihatan hingga kebutaan.²⁵ Neuropati diabetik, yang merupakan komplikasi paling umum, terjadi pada hampir 45% pasien DM Tipe 2 dan melibatkan kerusakan pada saraf

perifer, menyebabkan gejala seperti nyeri, kesemutan, dan kelemahan otot.³⁹

Komplikasi makroangiopati seperti penyakit jantung koroner, penyakit serebrovaskular, dan penyakit arteri perifer terjadi akibat aterosklerosis yang dipercepat oleh disfungsi endotel yang diinduksi oleh hiperglikemia, resistensi insulin, dan stres oksidatif.^{4,38} Mekanisme patofisiologi yang mendasari komplikasi ini melibatkan aktivasi jalur poliol, pembentukan *advanced glycation end-products* (AGEs), aktivasi *protein kinase C* (PKC), dan stres oksidatif yang semuanya berkontribusi pada kerusakan vaskular dan jaringan.³⁸ Pengelolaan yang efektif terhadap T2DM melalui kontrol glikemik yang ketat, pengendalian tekanan darah, dan modifikasi gaya hidup sangat penting untuk mencegah atau memperlambat progresi komplikasi ini.³⁹ Komplikasi vaskular pada T2DM merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada penderita penyakit ini.³⁹

2.2 Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α)

2.2.1 Definisi Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α)

Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1 α) adalah faktor transkripsi utama yang mengatur ekspresi berbagai gen target dalam respons terhadap hipoksia.⁴⁰

2.2.2. Struktur Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α)

Struktur HIF-1 α memiliki domain *helix-loop-helix* (bHLH) dan domain PAS yang penting untuk dimerisasi dengan HIF-1 β serta pengikatan DNA. Domain bHLH bertanggung jawab untuk pengikatan DNA, sedangkan domain PAS berperan dalam stabilitas dan interaksi protein-protein.^{41,42,43} Subunit HIF-1 α sensitif terhadap oksigen dan cepat terdegradasi dalam kondisi nonhipoksia dengan waktu paruh kurang dari 10 menit.^{5,44}

2.2.3 Peran Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α) Pada T2DM

Dalam kondisi normoksik, HIF-1 α terdegradasi dalam kondisi oksigen normal, tetapi tetap ada dalam sel- β normoksik.⁴⁵ Hal ini berbeda pada saat hiperglikemia, terjadi akumulasi ROS dan lipolisis yang berlebihan.^{3,44} Kedua kondisi tersebut menyebabkan terjadinya hipoksia yang mencetuskan ekspresi HIF-1 α sebagai bentuk adaptasi sel pankreas untuk menghasilkan cukup insulin dengan jumlah oksigen yang terbatas.^{6,46} Peningkatan ekspresi HIF-1 α memiliki dampak yang berbeda pada setiap sel, pada sel otot, HIF-1 α membantu regulasi translokasi GLUT4 yang berperan pada pengambilan glukosa sedangkan pada sel adiposit peningkatan HIF-1 α justru menyebabkan disfungsi sel adiposit.^{5,44}

Peningkatan berlebihan ekspresi HIF-1 α dapat berkontribusi pada proses patologis lainnya seperti disfungsi sel adiposit dan pembentukan pembuluh darah yang tidak teratur yang dapat

mengarah pada komplikasi vaskular T2DM.^{47,48} Pembuluh darah baru ini mudah pecah dan berdarah, pada mata menyebabkan perdarahan vitreus, traksi retina, dan akhirnya dapat mengakibatkan kebutaan.³⁸ Hal ini disebabkan oleh pembentukan pembuluh darah baru yang tidak efektif dan sering disertai inflamasi serta fibrosis.^{49,50} Pada studi lain menyatakan bahwa peningkatan ekspresi HIF-1 α yang terkontrol juga diperlukan karena berperan mempertahankan sel β pankreas.⁴⁴ Namun secara umum hiperglikemia kronis menginduksi inhibisi dan degradasi ekspresi HIF-1 α melalui peningkatan 2-methylglyoxal dan *prolyl hydroxylase domain proteins* (PHDs).^{44,51} Defisiensi HIF-1 α menyebabkan gangguan sekresi insulin dengan penurunan ekspresi tipe 2 (GLUT2) dan glukokinase (GCK), sedangkan di sisi lain, ekspresi berlebihan HIF-1 α mengubah metabolisme glukosa dari oksidasi mitokondria menjadi glikolisis, sehingga menyebabkan pelemahan aktivitas mitokondria dan gangguan sekresi insulin.⁴⁵

2.3 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

2.3.1 Definisi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) merupakan enzim yang berperan dalam produksi *nitric oxide* (NO).⁵² iNOS merupakan salah satu isoform dari enzim *nitric oxide synthase* yang diinduksi selama kondisi inflamasi atau infeksi.⁵²

2.3.2 Fungsi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

iNOS dikodekan oleh gen NOS2 dan diekspresikan dalam berbagai jenis sel, termasuk makrofag, sel endotel, dan fibroblas, terutama sebagai respons terhadap stimulasi oleh sitokin proinflamasi (seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan $\text{IFN-}\gamma$) atau lipopolisakarida (LPS) dari bakteri.⁵⁰ Aktivasi iNOS memerlukan peningkatan transkripsi gen NOS2 melalui jalur $\text{NF-}\kappa\text{B}$, yang kemudian menghasilkan enzim iNOS aktif di sitoplasma.⁵⁰ Secara bioseluler, NO yang dihasilkan oleh iNOS memiliki efek pleiotropik, termasuk vasodilatasi, modulasi respons imun, dan penghambatan proliferasi patogen melalui stres oksidatif. Dalam sistem imun, NO berperan sebagai mekanisme pertahanan makrofag terhadap infeksi dengan menginduksi nitrosasi dan peroksidasi lipid, yang merusak DNA dan membran mikroba. Namun, produksi NO berlebih dapat menyebabkan stres seluler yang berkontribusi pada kerusakan sel, disfungsi mitokondria, dan peradangan kronis, sebagaimana terlihat pada penyakit inflamasi seperti diabetes mellitus, artritis reumatoid, dan sepsis.^{53,54}

2.3.3 Peran Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Pada T2DM

iNOS meningkat akibat stimulasi oleh hiperglikemia, FFA, sitokin proinflamasi ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$), dan stres oksidatif, yang mengaktifkan jalur $\text{NF-}\kappa\text{B}$.^{55,56} Enzim iNOS kemudian memproduksi NO dalam jumlah besar, yang dalam kondisi fisiologis dapat mendukung vasodilatasi dan homeostasis metabolik,

tetapi dalam kondisi patologis seperti T2DM, kelebihan NO berkontribusi pada stres oksidatif, yang menyebabkan disfungsi mitokondria, apoptosis sel beta pankreas, dan gangguan pensinyalan insulin.⁵⁶ Selain itu, NO juga dapat mengganggu jalur AKT/PI3K, yang esensial dalam translokasi GLUT4 ke membran sel otot dan adiposa, sehingga memperburuk resistensi insulin, menyebabkan penurunan efektivitas insulin dalam menurunkan kadar glukosa darah.^{57,58}

2.4 Peran *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α) dan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) Pada kondisi Diabetes Mellitus Tipe 2

HIF-1 α dan iNOS berperan penting dalam pathogenesis T2DM. Penelitian menunjukkan bahwa pada pasien T2DM, terjadi disregulasi ekspresi HIF-1 α pada sel β pankreas berkontribusi pada gangguan sekresi insulin dan perkembangan resistensi insulin.⁵⁴ Sehingga regulasi ekspresi HIF-1 α menjadi hal penting terutama dalam kondisi hiperglikemia kronis, dimana kondisi ini terjadi ketika hiperglikemia menyebabkan kebutuhan oksigen meningkat sehingga mencetuskan aktivasi HIF-1 α sebagai respon adaptasi sel terhadap hipoksia.⁴⁴ Ekspresi HIF-1 α yang meningkat secara berlebihan menyebabkan disfungsi sel endotel dan gangguan vaskularisasi yang memperburuk kondisi hipoksia jaringan sehingga terjadi induksi sinyal inflamasi NF- κ B, sedangkan dalam kondisi kronis, terjadi defisiensi ekspresi HIF-1 α juga berkontribusi pada disfungsi sel β pankreas.^{51,59} Hiperglikemia juga mempengaruhi ekspresi iNOS melalui peningkatan lipolisis yang berlebihan sebagai respon terhadap

kebutuhan sel.^{2,4} Lipolisis menyebabkan peningkatan FFA yang selanjutnya meningkatkan iNOS dan dapat memperburuk inflamasi dan kerusakan jaringan pada pasien T2DM.^{2,3,60} iNOS dapat memperburuk komplikasi diabetes, termasuk nefropati dan retinopati diabetik.⁶¹

2.5 Mesenchymal Stem Cells

2.5.1 Definisi Mesenchymal Stem Cells

Mesenchymal stem cells (MSCs) merupakan sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit.⁶² MSCs dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, *bone marrow*, hingga *wharton jelly* dari umbilikus.⁶² Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan dan bentuknya menyerupai sel fibroblast atau jarum.⁶³ Secara fenotipe, MSCs yang diisolasi dari tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik seperti CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenic dan penting pada penelitian ini.⁶³

2.5.2 Definisi Exosome derived from Mesenchymal Stem Cells (MSC-Exos)

Exosomes adalah vesikel ekstraseluler berukuran nano yang dilepaskan oleh berbagai jenis sel.⁶⁴ *MSC-Exos* memiliki ukuran sekitar 30-150 nm dan mengandung penanda spesifik seperti CD9, CD63, dan CD81 yang merupakan tetraspanin khas eksosom.⁶⁵

MSC-Exos terbentuk melalui mekanisme endosom dan dilepaskan ke lingkungan ekstraseluler melalui fusi *multivesicular bodies* (MVB) dengan membran sel.⁶⁵ *MSC-Exos* berinteraksi dengan sel target melalui beberapa mekanisme utama antara lain fusi dengan membran sel, endositosis oleh sel target, interaksi *Ligand-Receptor*.^{65,66} *MSC-Exos* mengandung berbagai komponen biomolekuler yang berkontribusi terhadap efek terapeutiknya,^{67,68} termasuk protein seperti HSP70 dan HSP90 yang berperan dalam perlindungan seluler serta faktor pertumbuhan seperti TGF- β yang mendukung regenerasi jaringan.⁶⁹ Selain itu, *MSC-Exos* juga mengandung lipid seperti sphingolipid, fosfolipid, dan ceramide yang berfungsi dalam menjaga stabilitas struktur eksosom serta meningkatkan interaksi dengan sel target.^{69,68}

Keunggulan *MSC-Exos* dibandingkan terapi sel langsung terletak pada stabilitas biologis yang lebih baik, imunogenisitas yang lebih rendah, dan kemampuan untuk melewati penghalang biologis.^{69,70} Interaksi antara *MSC-Exos* dengan jaringan target yang baik dapat mempengaruhi berbagai proses seluler, termasuk perbaikan jaringan, imunomodulasi, dan regenerasi sel.^{71,72}

2.5.3 Hipoksia Pada Exosome derived from Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)

MSCs dikultur dalam kondisi hipoksia (kadar oksigen 1–10% O₂) mengalami peningkatan aktivitas proliferasi dibandingkan dengan

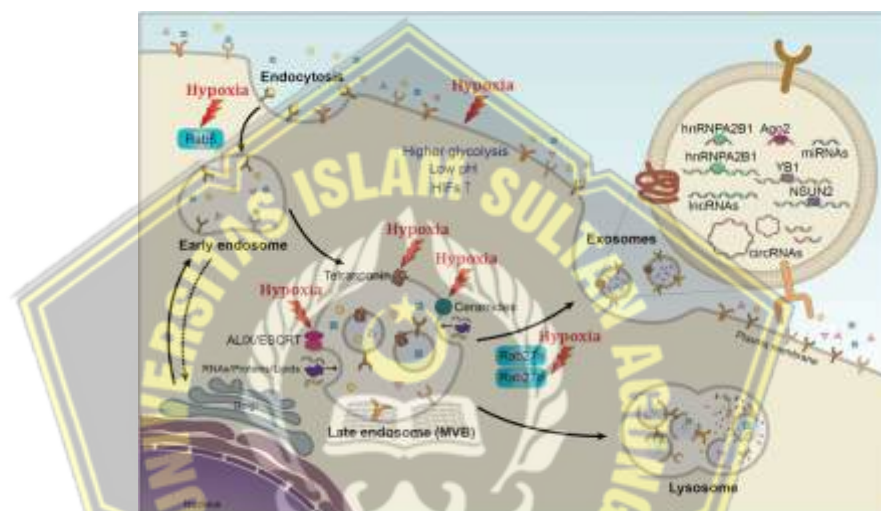
kultur dalam kondisi normoksia (21% O₂).⁷³ Peningkatan ini diduga dipicu oleh aktivasi faktor yang diinduksi HIF-1 α yang mengatur ekspresi gen yang terkait dengan metabolisme.⁷⁴

EH-MSCs mengandung tingkat faktor pro-angiogenik, protein anti-apoptosis, dan mikroRNA spesifik yang lebih tinggi yang berkontribusi pada perbaikan dan regenerasi jaringan.⁷⁵ Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *EH-MSCs* lebih efektif dalam perbaikan jantung setelah infark miokard, meningkatkan penyembuhan luka, dan mendukung regenerasi tulang.⁷⁵

Hipoksia merangsang aktivitas parakrin MSCs, yang menyebabkan peningkatan sekresi faktor pertumbuhan dan sitokin.⁷⁵ Efek parakrin yang ditingkatkan ini berkontribusi pada potensi terapeutik MSCs yang dikondisikan hipoksia dalam berbagai model penyakit.⁷⁵ *EH-MSCs* mengandung IL-10 yang berperan dalam modulasi respon imun dan perbaikan jaringan.⁷⁶ Hal ini dapat meningkatkan proses perbaikan jaringan dengan menghambat jalur inflamasi dan mengarahkan polarisasi makrofag ke fenotip M2 yang anti-inflamasi.^{76,77}

Kondisi hipoksia pada MSCs menginduksi ekspresi HIF-1 α , meningkatkan produksi berbagai faktor pelindung dalam eksosom termasuk faktor angiogenik (VEGF, angiopoietin-1), protein kelangsungan hidup (P65, P50), dan protein anti-apoptosis (Bcl-xL, Bcl-2).⁷⁵ Kondisi hipoksia juga meningkatkan kandungan miRNA

diantaranya miR-125a, miR-21, dan miR-146a-5p yang memiliki peran masing-masing dalam memodulasi inflamasi.^{10,11} Penelitian sebelumnya memepelajari bahwa miR-146a-5p bermanfaat untuk mencegah terjadinya komplikasi vaskular dan sepsis karena peran protektifnya terhadap sel tubuh melalui regulasi MYBL1 dan anti-inflamasinya yang poten melalui polarisasi makrofag M2.⁷⁸



Gambar 2. 1 Hipoksia memengaruhi sekresi dan miRNA *exosomes*.⁷⁹

Pada gambar 2.1, komponen ekstraseluler memasuki sel melalui endositosis bersama dengan membran plasma, yang mengarah pada pembentukan endosom awal dan endosom akhir (MVB).⁷⁹ Kemudian, *exosomes* dengan muatan spesifik dilepaskan melalui eksositosis.⁷⁹ Hipoksia memicu perubahan ekspresi gen HIF dan jalur pensinyalan lainnya pada *exosomes*.⁷⁹

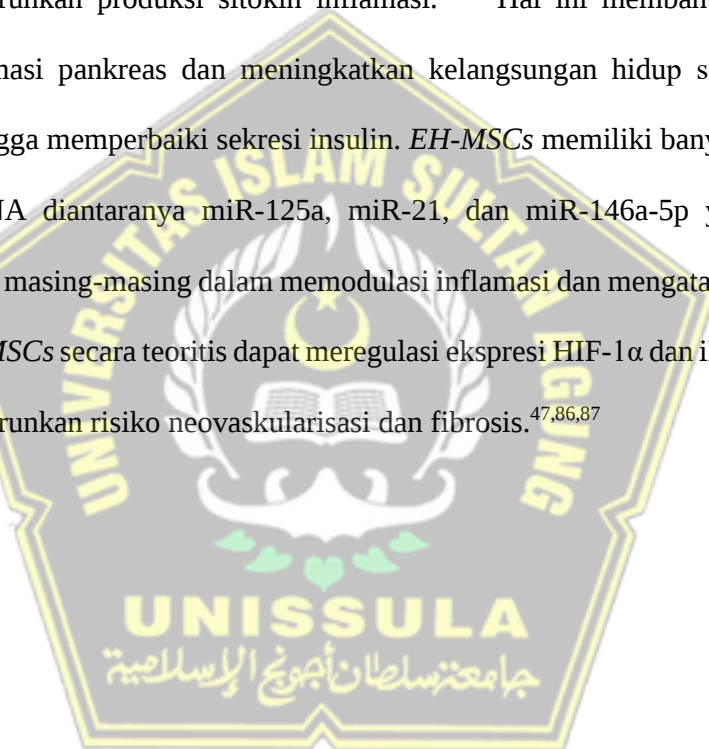
2.6 Pengaruh *Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (EH-MSCs) Terhadap *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α) dan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) Pada Diabetes Mellitus Tipe 2

Hiperglikemia kronis menyebabkan gangguan sinyal insulin terutama pada sel β pankreas dan sel adiposit sehingga glukosa berdampak pada fungsi sel β pankreas (glukotoksisitas) dan stabilitas protein HIF-1 α sedangkan lipid melalui lipolisis dan pelepasan FFA menyebabkan toksitas pada sel β pankreas (lipotoksisitas) dan ekspresi HIF-1 α .^{44,80,81} Kondisi tersebut menyebabkan ekspansi jaringan adiposa berlebihan yang selanjutnya membuat metabolit lipid toksik (FFA, *diacylglycerol*, *ceramide*) terakumulasi pada jaringan non-adiposa, menyebabkan lipotoksisitas dan mencetuskan kondisi hipoksia.⁸¹ Ekspresi HIF-1 α meningkat sebagai respons terhadap hipoksia akut, dan ekspresinya menurun selama hipoksia yang berkepanjangan, sehingga tingkat keparahan dan durasi hipoksia mengaktifkan respons adaptif secara berbeda dalam sel- β .⁴⁵ Hipoksia mengaktifkan HIF-1 α sebagai respon sel β pankreas agar kebutuhan oksigen tercukupi untuk memproduksi insulin yang cukup, namun peningkatan ekspresi HIF-1 α secara berlebihan mengakibatkan disfungsi mitokondria pada sel β pankreas dan mencetuskan aktivasi sinyal inflamasi NF-KB serta rekrutmen makrofag M1 dan sitokin pro-inflamasi lainnya dalam sel adiposit.^{2,80,81}

Hiperglikemia, peningkatan FFA dan peningkatan sitokin pro-infamasi juga meningkatkan ekspresi iNOS.^{4,82} Peningkatan iNOS menyebabkan gangguan pada sinyal insulin melalui inhibisi fosforilasi serine.^{4,82} Peningkatan iNOS pada sel β pankreas juga dapat terjadi karena mengurangi sintesis ATP dan mengganggu sinyal Ca^{2+} , sehingga melemahkan sekresi insulin.⁸² Pada

tikus model DM Tipe 2, makrofag dalam jaringan adiposa dan pankreas cenderung memiliki fenotip M1 yang meningkatkan ekspresi iNOS⁸³ dan menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β , sehingga memperburuk resistensi insulin dan apoptosis sel β pankreas.⁷⁰

EH-MSCs mendorong polarisasi makrofag dari M1 ke M2 (anti-inflamasi) dan juga berperan dalam menekan jalur NF- κ B sehingga dapat menurunkan produksi sitokin inflamasi.^{84,85} Hal ini membantu mengurangi inflamasi pankreas dan meningkatkan kelangsungan hidup sel β pankreas, sehingga memperbaiki sekresi insulin. *EH-MSCs* memiliki banyak kandungan miRNA diantaranya miR-125a, miR-21, dan miR-146a-5p yang memiliki peran masing-masing dalam memodulasi inflamasi dan mengatasi diabetes.^{10,11} *EH-MSCs* secara teoritis dapat meregulasi ekspresi HIF-1 α dan iNOS, sehingga menurunkan risiko neovaskularisasi dan fibrosis.^{47,86,87}



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1.Kerangka Teori

T2DM merupakan kondisi metabolik yang ditandai dengan resistensi insulin, peningkatan hiperglikemia, dan gangguan fungsi pankreas.⁸⁸ Proses patologis ini melibatkan serangkaian interaksi molekuler yang kompleks, termasuk peningkatan stres oksidatif, inflamasi kronis, dan kerusakan jaringan.¹⁵ *Streptozotocin* (STZ) dan *Nicotinamide* (NA) digunakan untuk induksi T2DM pada tikus Wistar. STZ bekerja dengan merusak DNA sel β melalui transporter GLUT2, sehingga memicu stres oksidatif dan aktivasi enzim PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*).⁸⁹ Aktivasi PARP yang berlebihan akan menghabiskan cadangan NAD^+ dan ATP di dalam sel, menyebabkan gangguan metabolisme energi dan akhirnya memicu kematian sel melalui apoptosis.⁸⁹ NA bertindak sebagai inhibitor PARP, membantu mencegah pengurasan NAD^+ dan ATP akibat kerusakan DNA oleh STZ sehingga kombinasi STZ dan NA menciptakan kondisi hiperglikemia dengan fungsi insulin yang masih sebagian aktif sehingga menyerupai karakteristik T2DM.⁹⁰

Pada T2DM, terjadi peningkatan akumulasi ROS dan lipolisis yang mengakibatkan akumulasi FFA dan ekspansi adiposit pada organ sensitif insulin seperti otot rangka, hepar dan pankreas.^{2,28,80} Kondisi ini menyebabkan hipoksia yang selanjutnya mengaktivasi HIF-1 α .^{2,28,80} Ekspresi

HIF-1 α yang berlebihan terutama pada sel adiposit mencetuskan sinyal inflamasi NF- κ B.⁹¹ Namun pada kondisi hiperglikemia kronis, ekspresi HIF-1 α menurun akibat peningkatan 2-methylglyoxal dan PHDs.^{44,51}

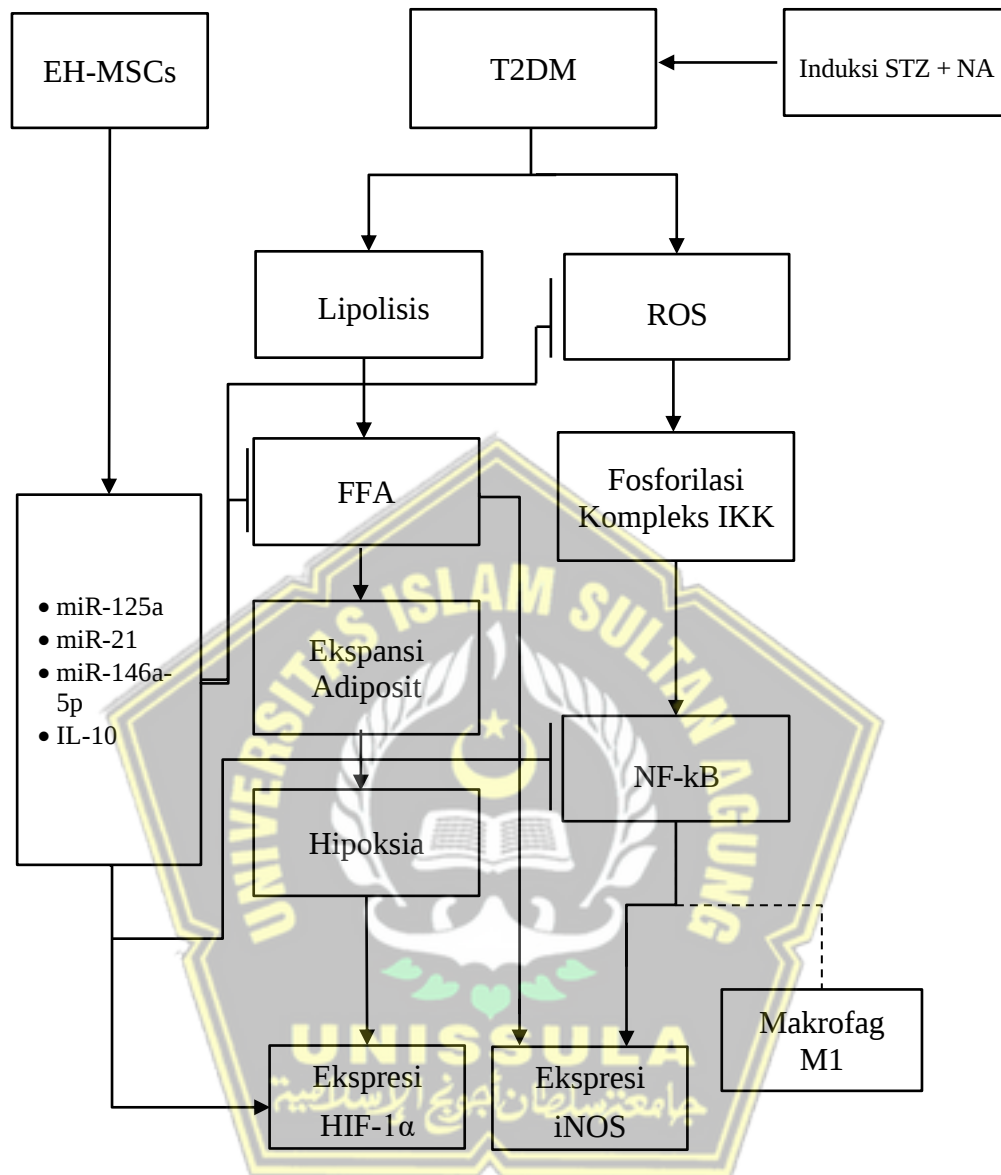
ROS dan aktivasi NF- κ B selanjutnya meningkatkan ekspresi iNOS dan merangsang makrofag M1 yang mengeluarkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6.⁹² Peningkatan ekspresi iNOS mengganggu aksi insulin dengan menghambat sinyal insulin pada IRS-1/-2, dan Akt.^{4,93} Sitokin pro-inflamasi dan HIF-1 α memperkuat respon inflamasi dan meningkatkan produksi ROS, yang pada gilirannya mengaktivasi kembali NF- κ B, menciptakan lingkaran umpan balik yang memperburuk inflamasi.^{94,95,96}

EH-MSCs memiliki potensi terapeutik dalam regenerasi jaringan, modulasi imun, dan perbaikan metabolik pada T2DM.⁸⁵ *EH-MSCs* memiliki banyak kandungan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan miRNA diantaranya miR-125a, miR-21, dan miR-146a-5p yang memiliki peran masing-masing dalam mengatasi diabetes seperti miR-125a berperan dalam anti-inflamasi dengan cara memodulasi metabolisme glikolipid, menekan akumulasi FFA, dan meningkatkan pengambilan glukosa melalui aktivasi jalur PI3K/AKT.^{10,11,97} *EH-SMCs* diketahui dapat menekan ROS dengan meningkatkan sekresi antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione*.⁹⁸

IL-10 pada *EH-MSCs* dapat menekan inflamasi melalui inhibisi NF- κ B yang selanjutnya dapat menekan ekspresi sitokin pro-inflamasi dan meningkatkan polarisasi makrofag anti-inflamasi M2.⁹⁹ Peran besar miR-21

dalam diabetes sangat bermanfaat dalam memodulasi langsung ekspresi HIF-1 α serta meningkatkan ekspresi faktor pro-angiogenik VEGF-A dan VEGF-B.^{100,101} VEGF-A adalah pengatur utama angiogenesis yang pada jaringan adiposa telah dilaporkan bersifat protektif terhadap resistensi insulin yang disebabkan oleh obesitas serta VEGF-B juga telah dikaitkan dengan peningkatan fungsi insulin pada jaringan adiposa, sehingga menghasilkan peningkatan kesehatan metabolisme.¹⁰¹ Sedangkan kandungan miR-146a-5p yang melimpah mampu mendorong polarisasi makrofag M2 dengan menargetkan jalur pensinyalan TRAF6-STAT1 untuk menekan inflamasi termasuk NF- κ B sehingga dapat menurunkan ekspresi HIF-1 α dan iNOS.^{102,103}

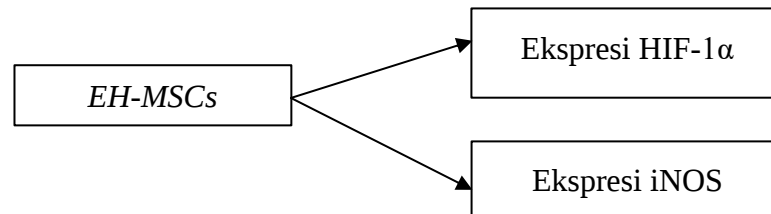




Keterangan : **————** = yang diteliti
----- = yang tidak diteliti

Gambar 3. 1 Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3. 2 Kerangka Konsep Penelitian

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh *EH-MSCS* terhadap ekspresi HIF-1 α pada tikus Wistar model diabetes mellitus tipe 2.
2. Terdapat pengaruh *EH-MSCS* terhadap ekspresi iNOS pada tikus Wistar model diabetes mellitus tipe 2.

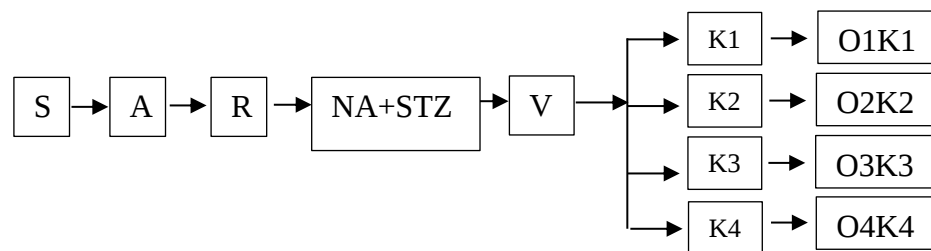
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental *in vivo* dengan pendekatan *post-test only control group design* untuk mengevaluasi pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi HIF-1 α dan ekspresi iNOS pada model tikus Wistar yang diinduksi T2DM menggunakan STZ-NA. Model diabetes ini dipilih karena dapat mereplikasi kondisi hiperglikemia dan resistensi insulin, yang relevan dengan patofisiologi T2DM pada manusia. Tikus percobaan dibagi menjadi empat kelompok perlakuan untuk mengidentifikasi pengaruh perlakuan yang berbeda.

Kelompok kontrol negatif (K1) hanya menerima induksi STZ-NA dan diberikan injeksi NaCl 0,9% sebanyak 300 μ L secara intravena pada hari ke 15, 18, dan 21 penelitian, tanpa perlakuan tambahan, sebagai pembanding dasar. Kelompok kontrol positif (K2) menerima terapi Metformin secara peroral dengan dosis 300 mg/kgBB/hari selama 14 hari, yang merupakan terapi standar untuk T2DM dan digunakan sebagai pembanding efektivitas *EH-MSCs*. Kelompok perlakuan pertama (K3) terdiri dari tikus yang diinduksi STZ-NA dan menerima *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L secara intravena yang diberikan pada hari ke-15, 18, dan 21 penelitian. Sementara itu, kelompok perlakuan kedua (K4) menerima *EH-MSCs* dengan dosis yang lebih tinggi, yaitu 500 μ L secara intravena, pada waktu yang sama seperti P1.



Gambar 4. 1 Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S: Sampel

A: Aklimatisasi

R: Randomisasi

V: Validasi diabetes dengan pengukuran kadar gula darah. Kadar glukosa darah (KGD) pada tikus normal yang berpuasa umumnya berkisar antara 90 hingga 130 mg/dL. Tikus dikatakan mengalami diabetes mellitus tipe 2 apabila kadar glukosa darah melebihi ≥ 200 mg/dL

K1: Tikus diabetes dengan NaCl 0,9% 300 μ L iv pada 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 μ L iv hari ke-15, 18, dan 21

O1K1: Observasi ekspresi HIF-1 α dan ekspresi iNOS pada kelompok 1

O2K2: Observasi ekspresi HIF-1 α dan ekspresi iNOS pada kelompok 2

O3K3: Observasi ekspresi HIF-1 α dan ekspresi iNOS pada kelompok 3

O4K4: Observasi ekspresi HIF-1 α dan ekspresi iNOS 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,

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

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

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

$$3n \geq 18$$

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

Di mana n adalah jumlah tikus per kelompok, dan t adalah jumlah kelompok. Pada penelitian ini, digunakan 6 kelompok tikus dan 1 tikus tambahan untuk mengatasi adanya tikus mati, maka minimal 7 tikus per kelompok diperlukan, dengan total sampel sebanyak 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 normal (tidak sakit, aktif bergerak, dan berat badan sesuai kriteria inklusi). Pemeriksaan awal kadar glukosa darah dilakukan untuk memastikan kadar glukosa awal.

2. Aklimatisasi

Pemeliharaan tikus dalam kondisi standar (suhu 22–24°C, siklus terang-gelap 12 jam, dan akses bebas ke makanan dan minuman). Adaptasi dilakukan pada kondisi standar minimal 1 minggu sebelum perlakuan.

3. Pembagian Kelompok

Tikus secara acak dibagi menjadi 4 kelompok:

- Kelompok 1: Kelompok kontrol negatif

Tikus diinduksi STZ-NA dan injeksi NaCl 0,9% 300 µL iv pada hari ke 15, 18, dan 21

Kelompok 2: Kelompok kontrol positif

Kelompok tikus dengan induksi STZ-NA dengan pemberian Metformin peroral 300mg/kgBB/hari selama 14 hari.

- Kelompok 3: *EH-MSCs*

Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok tikus dengan induksi STZ-NA diberikan *EH-MSCs* yang dikultur dalam kondisi hipoksia (5%

O₂) dengan dosis yang sama (250 µL saline, IV) pada hari ke 15, 18, dan 21.

- Kelompok 4: *EH-MSCs*

Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok tikus dengan induksi STZ-NA diberikan *EH-MSCs* yang dikultur dalam kondisi hipoksia (5% O₂) dengan dosis yang sama (500 µL saline, IV) pada hari ke 15, 18, dan 21.

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:

- Ekspresi HIF-1 α : Diukur pada jaringan pankreas menggunakan metode qRT-PCR untuk mengevaluasi tingkat inflamasi dan respons hipoksia pada tikus sebagai indikator efek perlakuan terhadap modulasi inflamasi sistemik.
- Ekspresi iNOS: Diukur pada jaringan pankreas menggunakan metode qRT-PCR untuk menilai dampak

perlakuan terhadap regulasi stres oksidatif dan inflamasi, yang berhubungan dengan sensitivitas insulin dan metabolisme glukosa.

4.3.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi pada penelitian ini adalah diabetes melitus yang diinduksi dengan injeksi 65 mg STZ dan 230 mg NA dengan secara intraperitoneal dosis tunggal.

4.3.4. Variabel Terkendali

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

4.3.5. Definisi Operasional

1. *EH-MSCs*

EH-MSCs adalah vesikel ekstraseluler berukuran kecil yang dihasilkan oleh MSCs dalam yang dikultur dalam kondisi hipoksia (5% O₂) selama 24 jam dengan suhu 37⁰ C. *EH-MSCs* ini mengandung molekul bioaktif seperti protein, mRNA, dan *microRNA* yang memiliki potensi untuk memodulasi peradangan dan meningkatkan sensitivitas insulin. Dalam penelitian ini, *EH-MSCs* diberikan kepada tikus melalui rute injeksi intravena pada hari ke ke 15, 18, dan 21 penelitian

Unit: Mikroliter (µl) per kilogram berat badan tikus.

Skala: Rasio

2. Ekspresi HIF-1 α

Jumlah mRNA HIF-1 α yang diukur pada jaringan pancreas menggunakan metode qRT-PCR di hari ke 14 setelah perlakuan untuk mengevaluasi tingkat inflamasi dan respons hipoksia di jaringan pankreas sebagai parameter efek perlakuan eksosom hipoksia dari MSC. Hasil diinterpretasikan dalam satuan *Fold Change*.

Unit: *Fold Change*

Skala: Rasio

3. Ekspresi iNOS

Jumlah mRNA *inducible Nitric Oxide Synthase* yang terdapat di jaringan pankreas, juga diukur menggunakan metode RT-PCR di hari ke 14 setelah perlakuan. Pengukuran ini bertujuan untuk mengevaluasi dampak perlakuan eksosom hipoksia MSC terhadap regulasi stres oksidatif dan inflamasi. Hasil diinterpretasikan dalam satuan *Fold Change*.

Unit: *Fold Change*

Skala: Rasio.

4. Berat Badan Tikus

Ukuran berat badan tikus Wistar sebagai variabel kontrol untuk memastikan keseragaman sampel dalam penelitian yang diukur menggunakan timbangan. Berat badan diukur sebelum perlakuan dan selama penelitian untuk memantau kondisi kesehatan tikus, karena

fluktuasi berat badan yang signifikan dapat menunjukkan adanya stres atau efek samping.

Unit: gram (g)

Skala: Rasio

5. Diabetes Melitus Tipe 2

Kondisi hiperglikemia pada tikus Wistar jantan yang diinduksi menggunakan menggunakan Streptozozin dan Nicotinamide. Tikus dinyatakan mengalami Diabetes Melitus apabila kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl pada hari ke 7 pasca induksi.

Unit: mg/dl

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. PCR Kit HIF-1 α
6. PCR Kit iNOS
7. Buffer PBS (phosphate-buffer saline)
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. PCR machine untuk analisis HIF-1 α dan iNOS
5. Jarum Suntik
6. Tabung hemamtokrit.
7. *6mm biopsy punch*
8. Sentrifuge
9. Mikropipet 1
10. 1000 μ L mikropipet tip
11. Vial tube 1,5 mL
12. *Coated desk glass*
13. *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/kg berat badan.
5. Setelah 15 menit, STZ diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 65 mg/kg berat badan.
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

4.6.3 Isolasi EH-MSCs

1. Preparasi *Condition Medium* dengan cara medium kultur dari passage 4 dikumpulkan dan disentrifugasi pada 300 $\times$ g selama 5 menit untuk menghilangkan sel-sel yang tersisa.
2. Supernatant kemudian disentrifugasi lagi pada 2000 $\times$ 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+.

4.6.4 Teknik Pengumpulan Sampel

1. Pada hari ke-28, tikus diterminasi menggunakan menggunakan *cocktail* dosis letal sebelum pengambilan jaringan pankreas 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 dikoleksi secara hati-hati. Sampel jaringan tersebut kemudian disimpan dalam *cryotube* yang bebas RNase untuk menjaga integritas RNA. Selanjutnya, jaringan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later untuk memastikan stabilitas molekuler jaringan hingga dilakukan analisis lebih lanjut.

4.6.5 Analisis Ekspresi HIF-1 α dan iNOS

1. Ekspresi mRNA dari iNOS dan HIF-1 α dianalisis menggunakan metode Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran reaksi terdiri dari 3 μl cDNA sampel, 12,5 μl Taq master mix (mengandung dNTPs, Taq DNA polymerase, buffer reaksi, dan MgCl₂) yang disintesis menggunakan *ReverTra Ace Qpcr RT Master Mix with gDNA* dan 0,6 μl primer *forward* dan *reverse* untuk masing-masing gen target (iNOS dan HIF-1 α), serta 8,3 μl Nuclease-Free Water.
3. Produk PCR yang dihasilkan dianalisis menggunakan qRT-PCR dengan *reagen* berupa EnturboTM SYBR Color qPCR Super ROX 10uL + NFW 7,4 uL menggunakan sistem illumine untuk mendeteksi ekspresi gen iNOS dan HIF-1 α .
4. Data ekspresi dianalisis dalam bentuk rasio peningkatan relatif terhadap housekeeping gene menggunakan software EcoStudy untuk memastikan keakuratan hasil pengukuran.

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research Indonesia.

Penelitian akan mulai dilakukan pada Februari - Juli 2025

4.8. Analisis Data

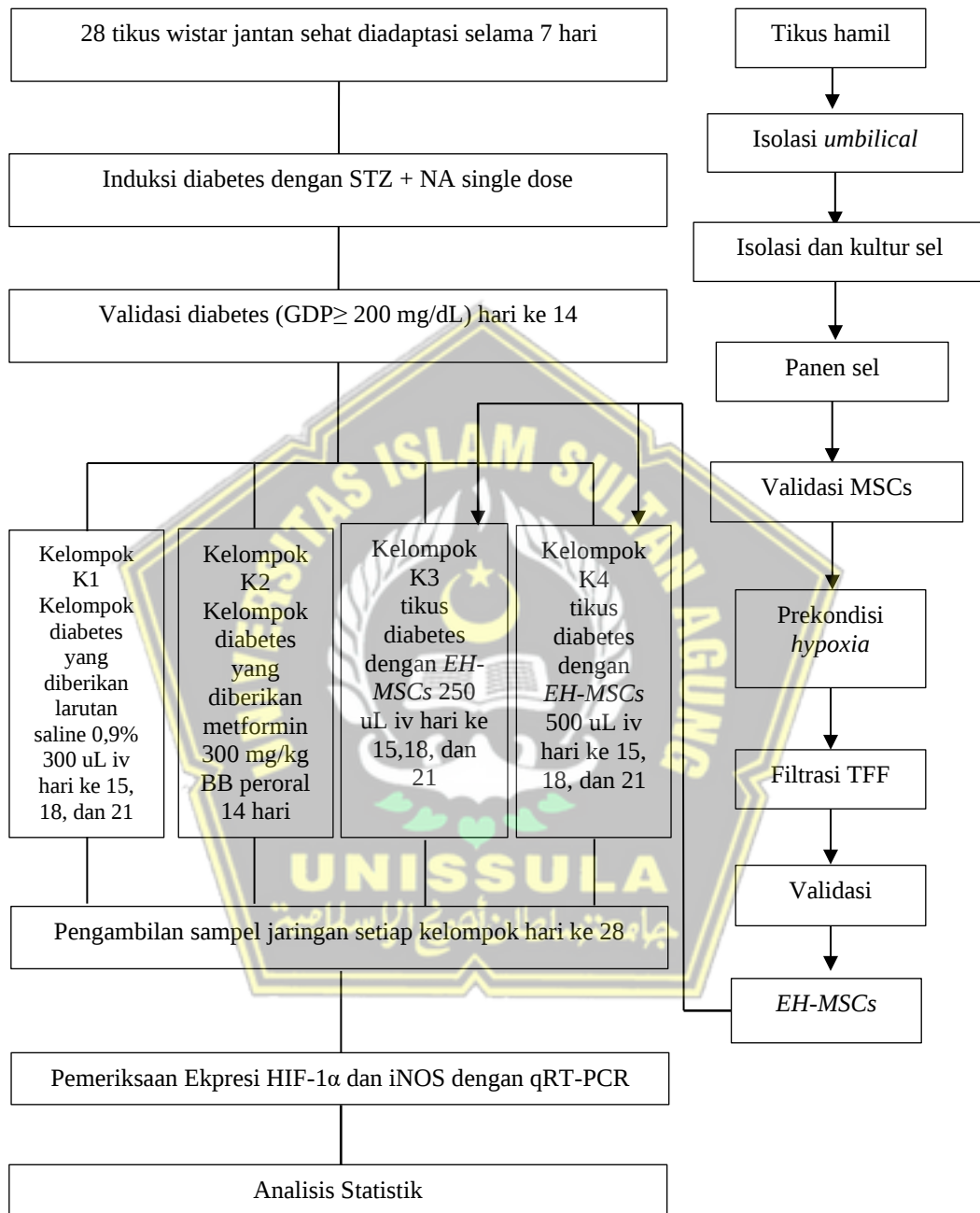
Data yang diperoleh dari penelitian dianalisis pada bulan Juli 2025 di lab SCCR dengan metode statistik sebagai berikut:

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 *EH-MSCs* dapat mempengaruhi ekspresi HIF-1 α secara signifikan dibandingkan kontrol.

- Apakah *EH-MSCs* dapat mempengaruhi ekspresi iNOS secara signifikan dibandingkan kontrol.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur Penelitian

4.10 Jadwal pelaksanaan penelitian

Penelitian dilakukan di *Laboratorium Stem Cell and Cancer Research*.

Penelitian rencana akan mulai dilakukan pada Februari - Juli 2025

Tabel 4. 1 Jadwal Penelitian

Jenis Kegiatan	Bulan ke-1	Bulan ke-2	Bulan ke-3	Bulan ke-4	Bulan ke-5	Bulan ke-6
Persiapan Penelitian	✓					
Penyusunan proposal dan pengajuan ke komite etik	✓					
Pengadaan alat dan bahan penelitian	✓					
Tahap Eksperimental		✓	✓			
Induksi diabetes pada tikus		✓				
Pemberian eksosom hipoksia MSCs			✓			
Pengambilan Sampel dan Analisis				✓		
Pengambilan darah tikus				✓		
Analisis ekspresi HIF-1 α				✓		
Analisis ekspresi iNOS				✓		
Pengolahan Data dan Penyusunan Laporan					✓	✓
Pengolahan dan analisis data					✓	
Penyusunan laporan penelitian					✓	✓

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian E-MSC hipoksia terhadap ekspresi gen HIF 1a dan iNOS pada tikus jantan galur Wistar model diabetes mellitus tipe 2. Studi eksperimental ini dilakukan secara *in vivo* dengan desain *Post-test Only Control Group* dilakukan selama bulan Februari - Juli 2025 di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang.

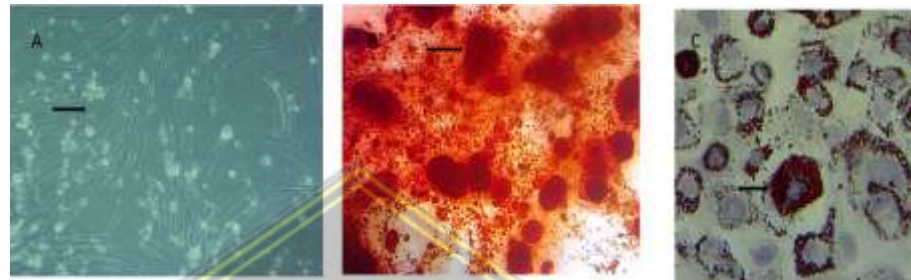
Penelitian dengan subjek tikus jantan sebanyak 28 ekor dengan model diabetes melitus tipe 2, Usia berkisar 2-3 bulan, dan berat badan 200-250 gram. Tikus Wistar diabetes mellitus tipe 2 kemudian randomisasi dan dibagi 4 kelompok, yaitu tikus diabetes dengan NaCl 0,9% 300 μ L iv pada hari ke 15, 18, dan 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 Cell (EH-MSCs)*

Isolasi MSC berasal dari tali pusat tikus Wistar yang sedang bunting 21 hari. Hasil isolasi MSC dikultur pada flask dengan medium khusus yang lengkap. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke-4 didapatkan MSCs yang melekat dan mencapai konfluensi lebih dari 80% menunjukkan morfologi sel berbentuk spindle-like saat diamati di bawah mikroskop (Gambar 5.1.A). Bentuk spindle ini adalah

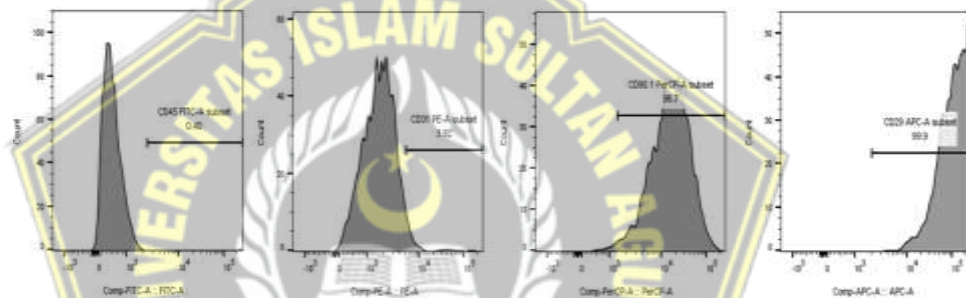
karakteristik morfologi khas MSC dalam kultur. Sel tampak memanjang dengan ujung meruncing menyerupai gelendong (spindle). Ini adalah bentuk yang menggambarkan MSC sehat dan proliferaatif. Morfologi ini juga mendukung fungsi multipotensi MSC dalam berdiferensiasi.¹⁰⁴



Gambar 5. 1 (A)Validasi MSCs 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.

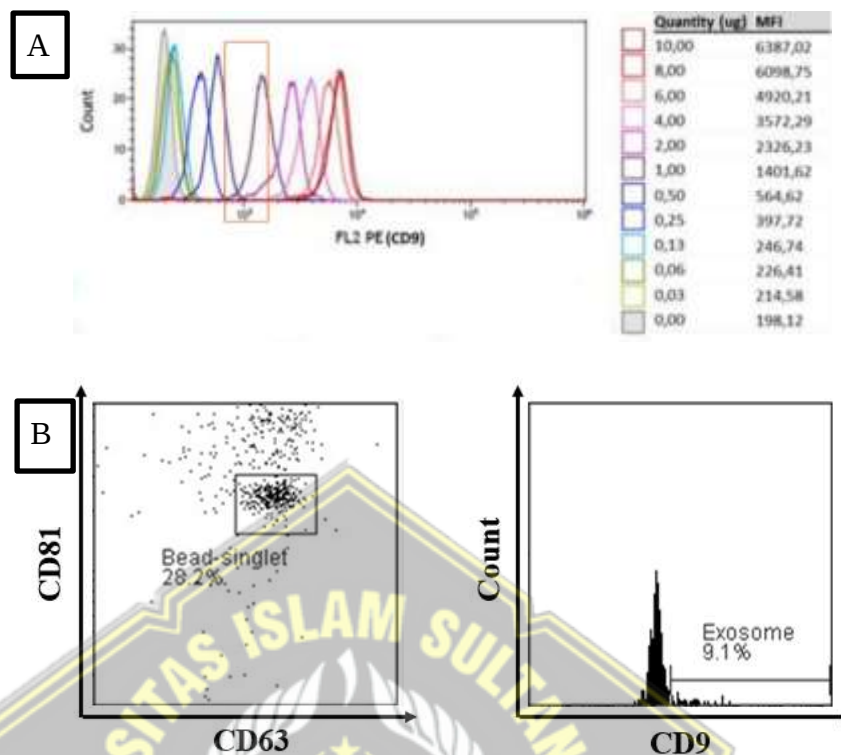
MSCs berkarakteristik dapat diferensiasi menjadi sel matur, termasuk osteosit dan adipogenik. Karakteristik ini dapat diamati setelah MSC diinkubasi dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik yang kemudian masing-masing diwarnai menggunakan Alizarin red untuk melihat deposisi kalsium dan Oil Red O untuk melihat droplet lipid yang terbentuk. 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.¹⁰⁵

Marker sel MSCs kemudian divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry* untuk menguji kemampuan MSCs dalam mengekspresikan *surface marker* khusus. Penelitian ini menunjukkan MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,70%), CD29 (99.9%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (0,40%) dan CD31 (3,92%). Oleh karena itu dapat dikatakan telah memenuhi karakteristik MSCs berdasarkan standar yang ditetapkan oleh *The International Society for Cellular Therapy* (ISCT) .¹⁰⁶



Gambar 5. 2 MSCs mampu mengekspresikan CD90 (98,70%), CD29 (99.9%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (0,40%) dan CD31 (3,92%).

MSCs diprakondisikan hipoksia dalam O_2 konsentrasi 5% selama 24 jam dalam suhu $37^0 C$ dan selanjutnya dilakukan filtrasi dengan TFF berdasarkan *molecular weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 100-500 kDa yang mengandung *exosome* $0.75 \text{ ug}/100 \text{ uL} = 7.5 \text{ ug/mL}$. Validasi *exosome* dilakukan dengan *flowcytometry* untuk melihat kandungan marker *exosome* didapatkan ekspresi CD81 28,2%, CD63 28,2%, CD9 9.1%.



Gambar 5. 3 (A). Histogram flowcytometry untuk validasi penanda permukaan CD9 pada exosome menunjukkan konsentrasinya adalah 7.5 ug/mL. (B). Flowcytometry membuktikan eksosom dalam sampel mengekspresikan CD81 28,2%, CD63 28,2%, CD9 9.1%.

Data flow cytometry ini membuktikan eksosom dalam sampel berhasil terisolasi dan mengekspresikan marker permukaan spesifik (CD9, CD63, CD81), sesuai standar validasi eksosom secara internasional.¹⁰⁷

5.1.2 Validasi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus 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 salah satu tikus setelah induksi diabetes meningkat signifikan sebesar 334 mg/dL. Ini menunjukkan hiperglikemia berat pada tikus yang telah diinduksi STZ dan NA telah terjadi hiperglikemia berat.^{105, 108}

Tabel 5. 1 Hasil pengukuran gula darah dengan glukometer sebelum induksi dan sesudah induksi diabetes

Kelompok	Tikus	Sebelum Perlakuan (mg/dL)	validasi	
			GDS	GDP
K-	1	92	299	294
K-	2	93	264	246
K-	3	94	317	287
K-	4	111	277	259
K-	5	102	334	284
K-	6	83	402	397
K-	7	84	323	256
K+	1	111	451	450
K+	2	80	600	414
K+	3	83	402	354
K+	4	91	276	274
K+	5	121	374	282
K+	6	109	305	274
K+	7	108	350	282
P1	1	122	286	274
P1	2	105	301	282
P1	3	115	252	246
P1	4	109	255	223
P1	5	105	341	265
P1	6	102	332	330
P1	7	110	517	452
P2	1	87	288	226
P2	2	108	524	452
P2	3	104	519	500
P2	4	108	456	447
P2	5	132	600	578
P2	6	113	485	390
P2	7	100	588	467

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 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 100x. 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.

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.

Berdasarkan pengukuran gula darah dan pewarnaan HE di atas, 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 Ekspresi gen HIF-1 α

Hasil uji dan analisis rerata ekspresi gen HIF-1 α setelah perlakuan pada masing-masing kelompok subjek penelitian ditunjukkan pada tabel 5. 2 sebagai berikut :

Tabel 5. 2 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji Kruskal Wallis pada Ekspresi HIF-1 α

Variabel	Kelompok				Sig. (p)
	K1 n=7	K2 n=7	K3 n=7	K4 n=7	
Ekspresi HIF-1 α					
Mean	0.46 $\pm$ 0.32	0.37 $\pm$ 0.20	0.91 $\pm$ 0.35	1.13 $\pm$ 0.72	
Shapiro Wilk	0.05	0.55*	0.22*	0.15*	
Kruskal Wallis					0.432

Keterangan:

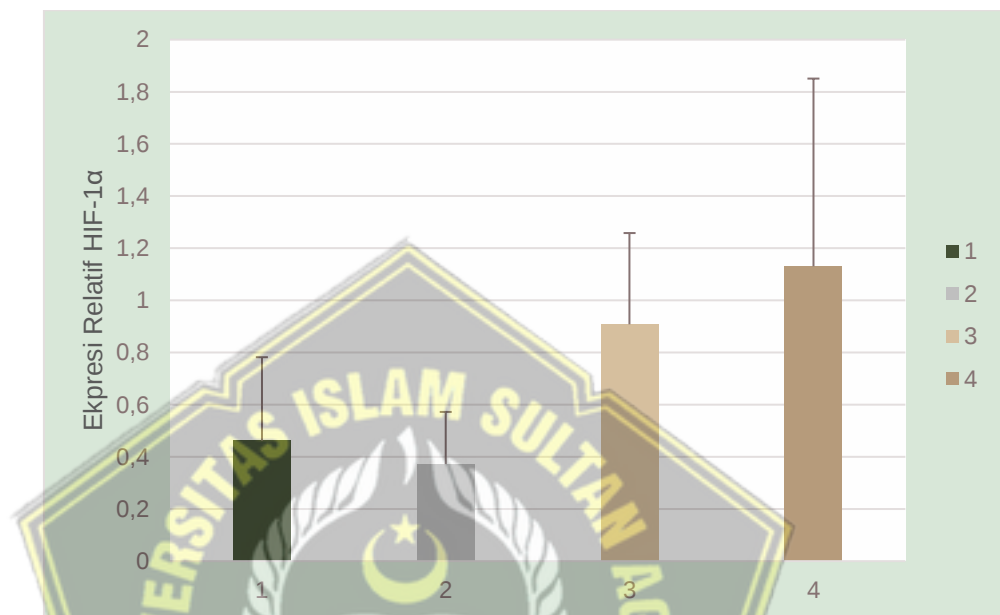
Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

Kruskal Wallis ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Tabel di atas menunjukkan rerata ekspresi gen HIF-1 α tertinggi pada kelompok K4 yaitu sebesar 1.13, diikuti oleh kelompok K3 sebesar 0.91 dan kelompok K1 sebesar 0.46. Ekspresi gen HIF-1 α terendah terdapat pada kelompok K2 yaitu kelompok kontrol positif sebesar 0.37. Hasil uji normalitas data dengan uji *Shapiro wilk* untuk mengevaluasi sebaran normalitas data dalam masing-masing kelompok terhadap ekspresi gen HIF-1 α didapatkan sebaran data dalam keempat kelompok tersebut tidak terdistribusi normal dimana ada salah satu kelompok yaitu kelompok K1 nilai p tidak $> 0,05$. Oleh karena sebaran data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis* untuk membandingkan 4 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 di atas didapatkan hasil bahwa *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh dalam ekspresi HIF-

1 α secara signifikan. Namun ekspresi relative HIF-1 α pada masing-masing kelompok menunjukkan perbedaan seperti yang ditampilkan pada gambar 5.5.



Gambar 5. 5 Grafik rata rata Ekspresi HIF-1 α pada Semua Kelompok Penelitian

5.1.4 Ekspresi Gen iNOS

Hasil uji dan analisis rerata ekspresi gen iNOS setelah perlakuan pada masing masing kelompok subjek penelitian ditunjukan pada tabel

5. 3 sebagai berikut:

Tabel 5. 3 Data Hasil Uji Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji Kruskal Wallis pada Ekspresi iNOS

Variabel	Kelompok				Sig. (p)
	K1 n=7	K2 n=7	K3 n=7	K4 n=7	
Ekspresi iNOS					
Mean±SD	1.83±1.23	1.98±1.30	1.56±0.90	1.86±0.85	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.01	0.01	0.01	0.09	
<i>Kruskal Wallis</i>					0,928

Keterangan:

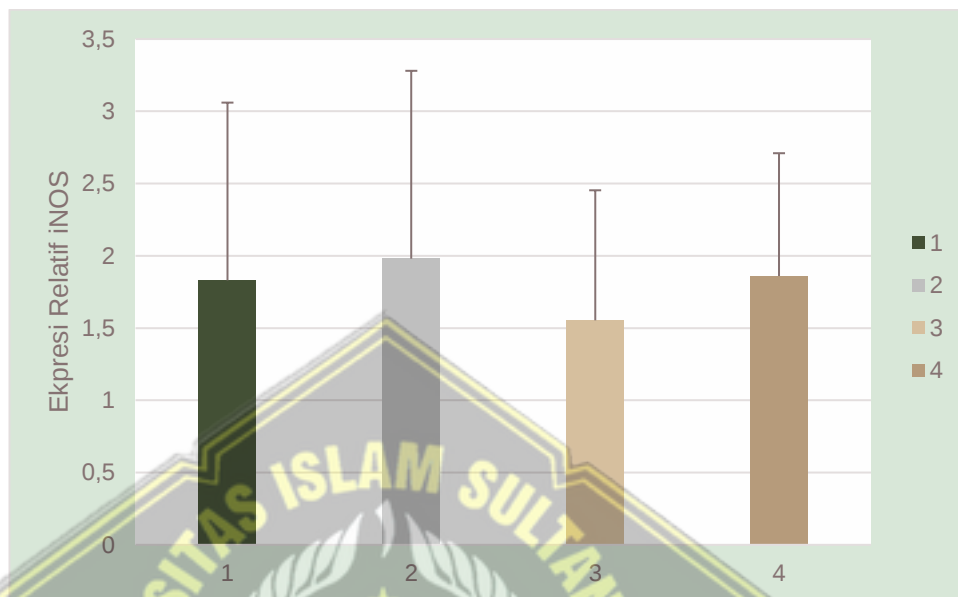
Uji Saphiro Wilk ($p > 0,05$ = normal)

Kruskal Wallis ($p < 0,05$) = perbedaan signifikan)

Tabel 5.3 menunjukkan rerata ekspresi gen iNOS tertinggi pada kelompok K2 yaitu sebesar 1,98, diikuti oleh kelompok K4 sebesar 1,86 dan kelompok K1 sebesar 1,83. Ekspresi gen iNOS terendah terdapat pada kelompok K3 sebesar 1,56. Hasil uji normalitas data dengan uji *Shapiro wilk* pada kelompok ekspresi gen iNOS didapatkan nilai p pada K1 sebesar 0,01, K2 sebesar 0,01, K3 sebesar 0,01 dan K4 sebesar 0,09. Berdasarkan hasil uji *Shapiro wilk* dimana nilai p tidak $> 0,05$ menunjukkan sebaran data pada keempat kelompok tidak terdistribusi normal. Oleh karena itu dilakukan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis* untuk membandingkan 4 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 di atas didapatkan hasil bahwa *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh dalam ekspresi iNOS secara signifikan. Namun ekspresi relative iNOS pada masing-masing

kelompok menunjukkan perbedaan seperti yang ditampilkan pada gambar 5.6.



Gambar 5. 6 Grafik Ekspresi iNOS pada Semua Kelompok Penelitian

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian terhadap ekspresi gen HIF 1α dan iNOS pada Tikus Jantan Galur Wistar model diabetes mellitus tipe 2 yang diberikan injeksi *EH-MSCs* dengan dosis 250 μL dan 500 μL menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Namun rata – rata ekspresi relatif ekspresi gen HIF 1α dan iNOS pada masing-masing kelompok menunjukkan perbedaan.

Ekspresi HIF- 1α pada kelompok K1 kontrol negatif relatif rendah, yang sesuai dengan literatur sebelumnya bahwa pada kondisi T2DM terjadi penurunan ekspresi HIF- 1α akibat hiperglikemia dan hipoksia kronis.¹⁰⁹ Pada diabetes, khususnya diabetes melitus tipe 2 (T2DM), HIF- 1α terlibat dalam berbagai proses metabolik, vaskular, dan inflamasi.¹⁰⁹ Regulasi HIF- 1α

mendorong neovaskularisasi (pembentukan pembuluh darah baru) dan menginduksi sekresi VEGF, tetapi juga dapat berkontribusi pada angiogenesis patologis yang terlihat pada komplikasi vaskular diabetes.¹⁰⁹ Di sisi lain, peningkatan kadar HIF-1 α serum berhubungan dengan dislipidemia dan risiko komplikasi arteri koroner yang lebih tinggi pada pasien T2DM.¹¹⁰ Terdapat korelasi positif antara HIF-1 α dan penanda seperti glukosa darah puasa (GDP), HbA1c, kolesterol total, trigliserida, dan LDL-C.¹¹⁰ Pada kondisi hipoksia kronis, terjadi inhibisi aktivitas HIF-1 α melalui proses degradasi dan hidrosilasi yang mengakibatkan gangguan adaptasi seluler terhadap hipoksia.^{6,111}

Pada kelompok K2 kontrol positif, ekspresi HIF-1 α lebih rendah dibandingkan K1, K2 dan K3. Pada kelompok K2 kontrol positif, ekspresi HIF-1 α lebih rendah dibandingkan K1, K2 dan K3. Metformin menurunkan akumulasi HIF-1 α model hewan diabetes melitus tipe 2. Penurunan ekspresi HIF-1 α ini melalui penghambatan respirasi mitokondria menyebabkan penurunan konsumsi oksigen sel, sehingga meningkatkan kadar oksigen intraseluler dan memungkinkan aktivitas enzim *prolyl hydroxylases* (PHDs) yang mempercepat degradasi HIF-1 α .¹¹² Meskipun metformin dapat memperbaiki sebagian aspek metabolik, efeknya terhadap perbaikan jaringan pankreas atau dalam memodulasi HIF-1 α belum optimal yang menunjukkan bahwa metformin belum cukup efektif dalam memperbaiki fungsi pankreas.

Pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 μ L dan dosis 500 μ L terlihat tren peningkatan ekspresi HIF-1 α secara bertahap pada kelompok ini, dengan *EH-MSCs* dosis 500 μ L menunjukkan ekspresi tertinggi. Hal ini

mengindikasikan bahwa *EH-MSCs* yang mengandung berbagai faktor regeneratif dan pro-angiogenik seperti miRNA, protein, dan vesikel kecil mampu mengaktivasi kembali jalur HIF-1 α , mendukung proses perbaikan vaskularisasi, dan memfasilitasi pemulihan jaringan pankreas yang rusak pada T2DM.^{103,111} Beberapa penelitian sebelumnya telah mempelajari bahwa *EH-MSCs* memiliki banyak muatana miRNA yang dapat memodulasi inflamasi dan perbaikan jaringan pada T2DM melalui berbagai mekanisme salah satunya modulasi HIF-1 α .^{103,111} MiR-125a pada MSC-Exos memiliki efek protektif terhadap sel-sel yang mengalami stres diabetes.¹¹³ MiR-125a mengatur fungsi mitokondria dan mitofagi, yang berkaitan erat dengan pensinyalan hipoksia dan stabilitas HIF-1 α .¹¹³ Kandungan lainnya berupa miR-146a dan IL-10 dalam MSC-Exos menunjukkan potensi anti-inflamasi dan mendukung kelangsungan hidup dan fungsi sel β pankreas pada diabetes.¹¹⁴ miR-146a memodulasi target dan jalur pensinyalan yang terkait dengan respons stres seluler, termasuk NF- κ B yang merupakan pengatur hulu aktivitas HIF-1 α dan adaptasi seluler selama keadaan hipoksia dan hiperglikemia kronis. Hal ini yang menguatkan bahwa *EH-MSCs* lebih efektif dibandingkan metformin dalam perbaikan kondisi pankreas pada model DM.¹¹⁴

Ekspresi gen iNOS pada kelompok K1 kontrol negatif relatif tinggi. Sejalan dengan literatur sebelumnya hiperglikemia kronis dan peningkatan FFA pada T2DM mengaktifkan jalur sinyal inflamasi, yang menyebabkan peningkatan ekspresi iNOS.¹¹⁵ Pada T2DM, iNOS terlibat dalam resistensi insulin, disfungsi sel β , komplikasi vaskular, dan inflamasi kronis.¹¹⁵ Ekspresi

iNOS yang berlebihan pada jaringan metabolik (hati, otot rangka, jaringan adiposa) dikaitkan dengan perkembangan resistensi insulin dan intoleransi glukosa, baik pada model hewan maupun manusia.^{4,93} iNOS mengganggu pensinyalan insulin dengan mendorong fosforilasi inhibitorik protein IRS.⁴

Ekspresi gen iNOS pada kelompok K2 kontrol positif tertinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada fase awal terapi metformin dapat memicu respons imun adaptif sementara yang menyebabkan peningkatan ekspresi iNOS sebagai bagian dari mekanisme pertahanan dan penyesuaian jaringan terhadap stres inflamasi kronis. Namun, efek ini bersifat temporal karena seiring terapi berlanjut, aktivasi AMPK dan penghambatan NF- κ B semakin dominan, sehingga ekspresi gen iNOS akan menurun.¹¹⁶

Kelompok tikus T2DM yang diberikan perlakuan *EH-MSCs* dosis 500 μ L memiliki ekspresi iNOS lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tikus T2DM yang diberikan perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 μ L. Kelompok tikus T2DM yang diberikan perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 μ L menunjukkan penurunan ekspresi iNOS paling besar. Hasil tersebut menunjukkan potensi efek anti-inflamasi *EH-MSCs* dosis rendah dan dosis tinggi justru menstimulasi sistem imun sehingga homeostasis terganggu, menimbulkan efek sebaliknya (*biphasic response*).¹¹⁷ Eksosom dosis tinggi dapat dikenali oleh reseptor sistem imun innate seperti Toll-like receptor 3 (TLR3) dan Toll-like receptor 4 (TLR4). Aktivasi TLR3 dan TLR4 ini memicu jalur sinyal NF- κ B yang menyebabkan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi seperti iNOS, IL-6, dan TNF- α .¹¹⁸

Studi sebelumnya menyatakan bahwa *exosomes* yang disekresikan oleh MSCs dapat secara signifikan menurunkan ekspresi iNOS dalam kondisi inflamasi. Eksosom yang berasal dari MSC mengandung miRNA anti-inflamasi seperti miR-146a dan miR-21 yang efektif menekan jalur NF- κ B sehingga menurunkan ekspresi iNOS pada tikus diabetes.¹¹⁹ Penurunan iNOS oleh *MSC-Exos* berkaitan dengan kemampuannya untuk memodulasi polarisasi sel imun, sehingga mengubah makrofag dari fenotipe pro-inflamasi (M1) menjadi anti-inflamasi (M2).¹²⁰ Eksosom MSC menurunkan ekspresi gen iNOS di pankreas tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin (STZ), disertai dengan pengurangan infiltrasi sel inflamasi dan peningkatan regenerasi sel β pankreas, memperkuat efek protektif dan anti-inflamasi eksosom pada diabetes tipe 2.¹²¹

122

Pada penelitian ini didapatkan hasil tidak ada perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan terhadap ekspresi gen HIF 1 α dan iNOS. Durasi observasi pasca perlakuan yang hanya selama 14 hari memungkinkan deteksi awal pengurangan stres oksidatif dan inflamasi, tetapi belum cukup lama untuk melihat manifestasi regenerasi struktural dan pemulihan fungsi sel β pankreas secara signifikan,^{123 124,125} terutama dalam perubahan ekspresi HIF-1 α dan iNOS. Pemeriksaan Hematoxylin-Eosin pada jaringan pankreas pasca pemberian eksosom MSC sangat dianjurkan dalam penelitian ini karena metode ini merupakan standar utama dalam analisis histologis untuk menilai perubahan struktural jaringan. Pemeriksaan ini penting untuk mendeteksi efek regeneratif eksosom pada pankreas secara langsung, seperti peningkatan kepadatan dan

struktur islet yang menjadi bukti regenerasi struktural dan pemulihan fungsi sehingga memberikan gambaran yang lebih lengkap mengenai keberhasilan terapi.^{126 127 128}

5.3. Keterbatasan Penelitian

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

1. Durasi observasi pasca terapi yang hanya 14 hari mungkin belum cukup untuk melihat perubahan ekspresi gen yang bersifat dinamis dan jangka panjang.
2. Pemeriksaan Hematoxylin-Eosin pada jaringan pankreas pasca pemberian eksosom hipoksia untuk menilai perubahan struktural jaringan tidak dilakukan



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian EH-MSC tidak berpengaruh terhadap ekspresi gen HIF 1 α dan iNOS pada tikus jantan galur Wistar model diabetes mellitus tipe 2

6.2 Saran

Berdasarkan hasil keterbatasan tersebut maka penelitian ini dapat dilakukan penelitian ulang dengan metode yang sama tetapi memperhatikan :

1. Durasi observasi pasca pemberian terapi diperpanjang guna menangkap perubahan ekspresi gen yang bersifat bertahap dan jangka panjang, serta mengevaluasi efek terapeutik EH-MSCs secara lebih komprehensif.
2. Pemeriksaan Hematoxylin-Eosin pada jaringan pankreas pasca pemberian eksosom hipoksia MSC dilakukan untuk menilai perubahan struktural jaringan pankreas

DAFTAR PUSTAKA

1. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6275. doi:10.3390/IJMS21176275
2. 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. doi:10.3389/FENDO.2024.1503704/EPUB
3. 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.* 2021;12(6):909. doi:10.1111/JDI.13541
4. Soskić SS, Dobutović BD, Sudar EM, Obradović MM, Nikolić DM, Djordjevic JD, Radak DJ, Mikhailidis DP, Isenović ER. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. *Open Cardiovasc Med J.* 2011;5(1):153. doi:10.2174/1874192401105010153
5. Ban JJ, Ruthenborg RJ, Cho KW, Kim J whan. Regulation of obesity and insulin resistance by hypoxia-inducible factors. *Hypoxia.* 2014;2:171-183. doi:10.2147/HP.S68771
6. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1 α Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. *Int J Med Sci.* 2013;10(10):1412-1421. doi:10.7150/IJMS.5630
7. Caturano, A., D'Angelo, M., Mormone, A., Rossi, F., De Lorenzo, A., Sesti, G., & Fiorentino, T. V. (2023). Oxidative stress in type 2 diabetes: Impacts from pathogenesis to lifestyle modifications. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(8), 6651–6666. <https://doi.org/10.3390/cimb45080420>
8. 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. doi:10.21608/amj.2022.230481
9. 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. doi:10.1038/s41392-022-01073-0
10. Li W, He S, Lin C, Yang S, Zhang W. Mesenchymal stem cell-derived exosomes carry miR-125a-5p to improve diabetic keratopathy by regulating endoplasmic reticulum stress. *Tissue Cell.* 2025;93. doi:10.1016/J.TICE.2024.102669
11. Bi, Y., Qiao, X., Liu, Q., Zhang, Y., Zhang, L., Su, R., Wang, Y., Liu, Z., Zhang, L., Wang, J., Zhang, M., Zhou, D., Han, X., & Zhao, R. C. Systemic proteomics and miRNA profile analysis of exosomes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):1-19. doi:10.1186/S13287-022-03142-1/METRICS
12. Shalaby, M. S., Abdel-Reheim, E. S., Almanaa, T. N., Alhaber, L. A., Nabil, A., Ahmed, O. M., Elwan, M., & Abdel-Moneim, A. Therapeutic effects of

- mesenchymal stem cell conditioned media on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Regen Ther.* 2025;28:1-11. doi:10.1016/J.RETH.2024.11.004
13. 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)*. 2024;13(4):253. doi:10.3390/BIOLOGY13040253
 14. Webber S. *International Diabetes Federation*. Vol 102.; 2013. doi:10.1016/j.diabres.2013.10.013
 15. Dinas Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar. *Diabetes Mellitus*. Published online 2013;87-90. doi:1 Desember 2013
 16. Wahidin, M., Achadi, A., Besral, B., Kosen, S., Nadjib, M., Nurwahyuni, A., Ronoatmodjo, S., Rahajeng, E., Pane, M., & Kusuma, D. 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. doi:10.1038/s41598-024-54563-2
 17. Kornicka K, Houston J, Marycz K. Dysfunction of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetic Patients as Result of Oxidative Stress and Autophagy may Limit Their Potential Therapeutic Use. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(3):337-345. doi:10.1007/s12015-018-9809-x
 18. Zhou Y, Liu Y, Chen J, Sun YZ, Li LH, Chen L. Inhibition of β -elemene on the expressions of HIF-1 α , VEGF and iNOS in diabetic rats model. *Int J Ophthalmol*. 2019;12(11):1693-1698. doi:10.18240/ijo.2019.11.05
 19. Sabry D, Marzouk S, Zakaria R, Ibrahim HA, Samir M. The effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Biotechnol Lett*. 2020;42(8):1597-1610. doi:10.1007/S10529-020-02908-Y,
 20. Sun, J., Shen, H., Shao, L., Teng, X., Chen, Y., Liu, X., Yang, Z., & Shen, Z. HIF-1 α overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):373. doi:10.1186/s13287-020-01881-7
 21. He X, Kuang G, Wu Y, Ou C. Emerging roles of exosomal miRNAs in diabetes mellitus. *Clin Transl Med*. 2021;11(6). doi:10.1002/ctm2.468
 22. Venkat, P., Zacharek, A., Landschoot-Ward, J., Wang, F., Culmone, L., Chen, Z., Chopp, M., & Chen, J.. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells harvested from type two diabetes rats promotes neurorestorative effects after stroke in type two diabetes rats. *Exp Neurol*. 2020;334:113456. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113456
 23. Sun, Y., Shi, H., Yin, S., Ji, C., Zhang, X., Zhang, B., Wu, P., Shi, Y., Mao, F., Yan, Y., Xu, W., & Qian, H. 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. doi:10.1021/ACSNANO.7B07643,

24. Sazli, B. I., Lindarto, D., Hasan, R., Putra, A., Pranoto, A., Sembiring, R. J., Ilyas, S., & Syafril, S. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease. Published online 2023. doi:10.5455/medarh.2023.77.90-96
25. Młynarska, E., Czarnik, W., Dzieża, N., Jędraszak, W., Majchrowicz, G., Prusinowski, F., Stabrawa, M., Rysz, J., & Franczyk, B. Type 2 Diabetes Mellitus: New Pathogenetic Mechanisms, Treatment and the Most Important Complications. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol 26, Page 1094. 2025;26(3):1094. doi:10.3390/IJMS26031094
26. Lu, X., Xie, Q., Pan, X., Zhang, R., Zhang, X., Peng, G., Zhang, Y., Shen, S., & Tong, N. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):262. doi:10.1038/s41392-024-01951-9
27. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Med J.* 2012;27(4):269-273. doi:10.5001/omj.2012.68
28. Chandrasekaran P, Weiskirchen R. Cellular and Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. *Current Tissue Microenvironment Reports* 2024 5:3. 2024;5(3):79-90. doi:10.1007/S43152-024-00056-3
29. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1(July):1-23. doi:10.1038/nrdp.2015.19
30. Soelistijo S. Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021. *Global Initiative for Asthma.* Published online 2021:46.
31. Yu X, Li S, Liu Y, Li Y, Zhang W, Hu Y, et al. Metformin inhibits hypoxia-induced expression of HIF-1 α via the mitochondrial respiratory chain in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2017;28(2):677-84.
32. Kim J, Park JH, Lee J, Cho Y, Kim Y, Han J, et al. Metformin inhibits HIF-1 α by enhancing proteasomal degradation through mitochondrial complex I inhibition. *Biology (Basel).* 2024;13(5):302.
33. Choi YK, Lim JH, Lee HG, Kim TW, Park KA, Jang YS, et al. Metformin reduces hypoxia-inducible factor-1 α expression by stimulating proteasomal degradation via AMPK activation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:753.
34. Kumagai A, Sato N, Horie T, Takahashi K, Nakamura Y, Maeda K, et al. Metformin inhibits HIF-1 α -mediated proinflammatory responses in macrophages through mitochondrial complex I inhibition. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;528:111240.
35. Cheng X, Zhang W, Xu H, Li J, Wang C, Liu Y, et al. Metformin inhibits nitric oxide synthase and inflammation through AMPK/NF- κ B signaling in vascular endothelial cells. *Front Oncol.* 2020;10:1605.
36. Zhao Y, Huang Z, Li L, Chen J, Xu X, Zhang Q, et al. Metformin alleviates inflammation and nitric oxide overproduction by inhibiting the AMPK/NF- κ B/iNOS pathway in diabetic models. *Biomolecules.* 2023;13(2):250.

37. Adelina R, Fajra JR, Hunafa Z, Luthfi R, Muhamad N. The Global Surge in Type 2 Diabetes Mellitus Among Young Adults : Causes , Habits , and Public Awareness through a Literature Review Study. 2023;40(1):33-40.
38. Li, Y., Liu, Y., Liu, S., Gao, M., Wang, W., Chen, K., Huang, L., & Liu, Y.. Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1. 2023;8(1):1-29. doi:10.1038/s41392-023-01400-z
39. Dr. Tariq Farhad, Dr. Muhammad Rahim Burghri, Dr. Muhammad Uzair Memon, Dr. Soha Fatima, Dr. Yasir Latif, Haji Abdullah Memon. Vascular Complications and their Risk Factors in Patients of Diabetes Mellitus, Type 2. *Journal of Islamabad Medical & Dental College*. 2023;11(4):196-203. doi:10.35787/jimdc.v11i4.875
40. Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(10):5063-5073. doi:10.1172/JCI137556
41. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/549412
42. Amalia, L., Parwati, I., Rizal, A., Panigoro, R., Gamayani, U., Rasyid, A., & Atiik, N. Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1-A dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada Stroke Iskemik Fase Akut. *Jurnal Neuroanestesi Indonesia*. 2019;8(3):226-232. doi:10.24244/jni.v8i3.218
43. Semenza, G. L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B. H., Leung, S., Roe, R., Wiener, C., & Yu, A. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int*. 1997;51(2):553-555. doi:10.1038/ki.1997.77
- Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5063. doi:10.1172/JCI137556
44. Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5063. doi:10.1172/JCI137556
45. Yamagata K, Tsuyama T, Sato Y. Roles of β -Cell Hypoxia in the Progression of Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2024;25(8). doi:10.3390/ijms25084186
46. Gabryelska A, Karuga FF, Szmyd B, Białasiewicz P. HIF-1 α as a Mediator of Insulin Resistance, T2DM, and Its Complications: Potential Links With Obstructive Sleep Apnea. *Front Physiol*. 2020;11:1035. doi:10.3389/FPHYS.2020.01035
47. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T. The possible mechanisms underlying the impairment of hif-1 α pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies. *Int J Med Sci*. 2013;10(10):1412-1421. doi:10.7150/ijms.5630
48. Zhu D, Wei W, Zhang J, Zhao B, Li Q, Jin P. Mechanism of damage of HIF-1 signaling in chronic diabetic foot ulcers and its related therapeutic perspectives. *Heliyon*. 2024;10(3):e24656. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e24656

49. Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*. 2011;25(2):125-137. doi:10.1016/j.niox.2010.12.010
50. Torres SH, De Sanctis JB, de L Briceño M, Hernández N, Finol HJ. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *Journal of Endocrinology*. 2004;181(3):419-427. doi:10.1677/joe.0.1810419
51. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*. 2021;64(4):709-716. doi:10.1007/s00125-021-05380-z
52. Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*. 2011;25(2):125-137. doi:10.1016/j.niox.2010.12.010
53. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*. 2010;23(2):75-93. doi:10.1016/j.niox.2010.04.007
54. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*. 2021;64(4):709-716. doi:10.1007/s00125-021-05380-z
55. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol*. 2015;36(3):161-178. doi:10.1016/j.it.2015.01.003
56. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12). doi:10.3390/ijms19123805
57. Darwiche, S. S., Pfeifer, R., Menzel, C., Ruan, X., Hoffman, M., Cai, C., Chanthaphavong, R. S., Loughran, P., Pitt, B. R., Hoffman, R., Pape, H.-C., & Billiar, T. R. Inducible Nitric Oxide Synthase Contributes to Immune Dysfunction Following Trauma. *Shock*. 2012;38(5):499-507. doi:10.1097/SHK.0b013e31826c5afe
58. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001;15(5):831-845. doi:10.1053/berh.2001.0196
59. Rusdiana. Assessment of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in North Sumatera, Indonesia. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2021;5(11):1919-1921. doi:10.26538/tjnpr/v5i11.4
60. García-Pastor C, Benito-Martínez S, Moreno-Manzano V, Fernández-Martínez AB, Lucio-Cazaña FJ. Mechanism and Consequences of The Impaired Hif-1 α Response to Hypoxia in Human Proximal Tubular HK-2 Cells Exposed to High Glucose. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-18. doi:10.1038/s41598-019-52310-6
61. Jiao, Y., Jiang, H., Lu, H., Yang, Y., Zhang, Y., Zhang, K. Liu, H. Deficiency of hypoxia inducible factor-1 α promoted progression of diabetic nephropathy with hypertension. *Exp Ther Med*. 2018;16(4):3658-3662. doi:10.3892/etm.2018.6621

62. Harrell CR, Djonov V, Volarevic V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Ocular Graft-Versus-Host Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21). doi:10.3390/ijms232113254
63. Almeria, C., Weiss, R., Roy, M., Tripisciano, C., Kasper, C., Weber, V., & Egger, D. Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(October):1-12. doi:10.3389/fbioe.2019.00292
64. Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(February):1-13. doi:10.3389/fbioe.2020.00043
65. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-230. doi:10.4252/wjsc.v2.i4.67
66. 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. doi:10.1186/s13287-024-03652-0
67. Li Y, Tan J, Miao Y, Zhang Q. MicroRNA in extracellular vesicles regulates inflammation through macrophages under hypoxia. *Cell Death Discov.* 2021;7(1). doi:10.1038/s41420-021-00670-2
68. Alexander, M., Hu, R., Runtsch, M. C., Kagele, D. A., Mosbruger, T. L. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun.* 2015;6. doi:10.1038/ncomms8321
69. 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. doi:10.4252/wjsc.v14.i5.318
70. Sabry D, Marzouk S, Zakaria R, Ibrahim HA, Samir M. The effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Biotechnol Lett.* 2020;42(8):1597-1610. doi:10.1007/s10529-020-02908-y
71. Tan, Y., Nie, W., Chen, C., Monda, M., Rostami, K., & Wang, X. Mesenchymal stem cells alleviate hypoxia-induced oxidative stress and enhance the pro-survival pathways in porcine islets. *Exp Biol Med.* 2019;244(9):781-788. doi:10.1177/1535370219844472
72. Jumena F, Dina Amalina N, Antari AD. The Effect of Hypoxic Mesenchymal Cell Secretome Administration on VEGF Levels in Type 1 Diabetes Rats Model. *International Journal of Cell and Biomedical Science (2023).* 2023;1(3):86-92.
73. 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. doi:10.1089/ten.teb.2021.0145
74. Ejtehadifar, M., Shamsasenjan, K., Movassaghpour, A., Akbarzadehlaleh, P., Dehdilani, N., Abbasi, P., Molaeipour, Z., & Saleh, M. The effect of

- hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Adv Pharm Bull.* 2015;5(2):141-149. doi:10.15171/apb.2015.021
75. 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. doi:10.3389/fcell.2024.1446050
 76. Mao, F., Wu, Y., Tang, X., Kang, J., Zhang, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., & Xu, W. (Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Biomed Res Int.* 2017;2017:5356760. doi:10.1155/2017/5356760
 77. Cheng, P., Xie, X., Hu, L., Zhou, W., Mi, B., Xiong, Y. Hypoxia endothelial cells-derived exosomes facilitate diabetic wound healing through improving endothelial cell function and promoting M2 macrophages polarization. *Bioact Mater.* 2023;33:157. doi:10.1016/J.BIOACTMAT.2023.10.020
 78. Liu, C., Xue, J., Xu, B., Zhang, A., Qin, L., Liu, J., & Yang, Y. Exosomes Derived from miR-146a-5p-Enriched Mesenchymal Stem Cells Protect the Cardiomyocytes and Myocardial Tissues in the Polymicrobial Sepsis through Regulating MYBL1. *Stem Cells Int.* 2021;2021:1530445. doi:10.1155/2021/1530445
 79. Wang W, Han Y, Jo HA, Lee J, Song YS. Non-coding RNAs shuttled via exosomes reshape the hypoxic tumor microenvironment. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1). doi:10.1186/S13045-020-00893-3
 80. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie.* 2016;125:259-266. doi:10.1016/j.biochi.2015.10.024
 81. 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. 2022;7(1):1-25. doi:10.1038/s41392-022-01073-0
 82. Bahadoran Z, Mirmiran P, Kashfi K, Ghasemi A. Vascular nitric oxide resistance in type 2 diabetes. *Cell Death & Disease* 2023 14:7. 2023;14(7):1-14. doi:10.1038/s41419-023-05935-5
 83. Suschek C, Schnorr O, Kolb-Bachofen V. The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes In Vivo: Is it Damage-Promoting, Protective, or Active at all? *Curr Mol Med.* 2005;4(7):763-775. doi:10.2174/1566524043359908
 84. Shalaby, M. S., Abdel-Reheim, E. S., Almanaa, T. N., Alhaber, L. A., Nabil, A., Ahmed, O. M., Elwan, M., & Abdel-Moneim, A.. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell conditioned media on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Regen Ther.* 2025;28:1-11. doi:10.1016/j.reth.2024.11.004
 85. Fialho, M. d. L. S., Purnama, U., Dennis, K. M. J. H., Montes Aparicio, C. N., Castro-Guarda, M., Massourides, E., Tyler, D. J., Carr, C. A., Heather, L. C. Activation of HIF1 α Rescues the Hypoxic Response and Reverses Metabolic Dysfunction in the Diabetic Heart. *Diabetes.* 2021;70(11):2518-2531. doi:10.2337/DB21-0398

86. Tang YY, Wang DC, Wang YQ, Huang AF, Xu WD. Emerging role of hypoxia-inducible factor-1 α in inflammatory autoimmune diseases: A comprehensive review. *Front Immunol.* 2023;13(January):1-14. doi:10.3389/fimmu.2022.1073971
87. Huang S, Czech MP. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* 2007;5(4):237-252. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.006
88. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-1625. doi:10.2337/diabetes.54.6.1615
89. De Magalhães, D. A., Kume, W. T., Correia, F. S., Queiroz, T. S., Allebrandt Neto, E. W., Santos, M. P., Kawashita, N. H., & França, S. A. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: A new proposal. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(1):1-14. doi:10.1590/0001-3765201920180314
90. Yan LJ. The Nicotinamide/Streptozotocin Rodent Model of Type 2 Diabetes: Renal Pathophysiology and Redox Imbalance Features. *Biomolecules.* 2022;12(9):1225. doi:10.3390/biom12091225
91. Bonello, S., Zähringer, C., BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., Kietzmann, T., Görlach, A. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):755-761. doi:10.1161/01.ATV.0000258979.92828.BC/SUPPL_FILE/ATVB7729-SUPPL.PDF
92. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2(1):1-9. doi:10.1038/SIGTRANS.2017.23;SUBJMETA=250,256,262,631;KWRD=INFLAMMATION,INNATE+IMMUNITY
93. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JAJ, Ueki K, Kaneki M. A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. *Diabetes.* 2005;54(5):1340-1348. doi:10.2337/DIABETES.54.5.1340
94. Scortegagna, M., Cataisson, C., Martin, R. J., Hicklin, D. J., Schreiber, R. D., Yuspa, S. H., Arbeit, J. M. HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF κ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood.* 2008;111(7):3343-3354. doi:10.1182/blood-2007-10-115758
95. Nakazawa, H., Chang, K., Shinozaki, S., Yasukawa, T., Ishimaru, K., Yasuhara, S. iNOS as a driver of inflammation and apoptosis in mouse skeletal muscle after burn injury: Possible involvement of sirt1 S-nitrosylation-mediated acetylation of p65 NF κ B and p53. *PLoS One.* 2017;12(1):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0170391
96. Harrell, C. R., Simović Marković, B., Fellabaum, C., Arsenijević, A., Djonov, V., & Volarević, V.. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1089:47-57. doi:10.1007/5584_2018_219
97. Aghaei-Zarch SM. Crosstalk between MiRNAs/lncRNAs and PI3K/AKT signaling pathway in diabetes mellitus: Mechanistic and therapeutic

perspectives. *Noncoding RNA Res.* 2024;9(2):486. doi:10.1016/J.NCRNA.2024.01.005

98. Tan, Y., Nie, W., Chen, C., Monda, M., Rostami, K., & Wang, X. Mesenchymal stem cells alleviate hypoxia-induced oxidative stress and enhance the pro-survival pathways in porcine islets. *Exp Biol Med.* 2019;244(9):781. doi:10.1177/1535370219844472
99. Ha, D. H., Kim, H. K., Lee, J., Kwon, H. H., Park, G. H., Yang, S. H., Jung, J. Y., Choi, H., Lee, J. H., Sung, S., Yi, Y. W., & Cho, B. S. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells.* 2020;9(5):1157. doi:10.3390/CELLS9051157
100. Xie, J., Wu, W., Zheng, L. Roles of MicroRNA-21 in Skin Wound Healing: A Comprehensive Review. *Front Pharmacol.* 2022;13:828627. doi:10.3389/FPHAR.2022.828627/XML/NLM
101. Lhamyani, S., Gentile, A.-M., Giráldez-Pérez, R. M., Feijóo-Cuaresma, M., Romero-Zerbo, S. Y., Clemente-Postigo, M., Zayed, H., Oliva Olivera, W., Bermúdez-Silva, F. J., Salas, J., López Gómez, C., Hajji, N., Olveira Fuster, G., Tinahones, F. J., & El Bekay, R.. miR-21 blocks obesity in mice: a potential therapy for humans. *medRxiv.* Published online October 31, 2020:2020.10.27.20219915. doi:10.1101/2020.10.27.20219915
102. Serrano-Marco, L., Rodríguez-Calvo, R., El Kochairi, I., Palomer, X., Michalik, L., Wahli, W., & Vázquez-Carrera, M. Activation of peroxisome proliferator - Activated receptor- β - δ (PPAR- β - δ) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes.* 2011;60(7):1990-1999. doi:10.2337/db10-0704
103. 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. doi:10.3389/FENDO.2022.1027686/XML/NLM
104. Widyaningsih. *Pengaruh Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Kadar IL-6 Dan Polarisasi Makrofag Pada Tikus Obesitas Diabetes Melitus Tipe 2.* Universitas Islam Sultan Agung; 2016.
105. Widyaningsih W. *Pengaruh Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Kadar IL-6 Dan Polarisasi Makrofag Tipe 2 Pada Tikus Obesitas Diabetes Melitus Tipe 2 .* Universitas Islam Sultan Agung; 2022.
106. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
107. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018). *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
108. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70(1):5-47.

109. Rusdiana R, Widjaja SS, Savira M, Amelia R, Rusmalawati R. Assessment of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in North Sumatera, Indonesia: doi.org/10.26538/tjnpr/v5i11.4. *Tropical Journal of Natural Product*
110. Gharib AF, Saber T, El Askary A, Alkhudhairy M, Almutairi F, Alshammari A, et al. Relation of hypoxia inducible factor, dyslipidemia and CAD in Saudi patients with type 2 diabetes. *In Vivo*. 2022;36(5):2481-9. [doi:10.21873/invivo.12984](https://doi.org/10.21873/invivo.12984)
111. Zhu D, Wei W, Zhang J, Zhao B, Li Q, Jin P, et al. Mechanism of damage of HIF-1 signaling in chronic diabetic foot ulcers and its related therapeutic perspectives. *Heliyon*. 2024;10(3):e24656. [doi:10.1016/j.heliyon.2024.e24656](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24656)
112. Takiyama Y, Harumi H, Shigeta M, Kitazawa R, Takeuchi E, Ueno Y, et al. Hypoxia and metformin affect renal tubular HIF-1 α in diabetes mellitus. *Nephron Exp Nephrol*. 2011;2:118-25.
113. Liu C, Xiang J, Chen Y, Li M, Wang H, Zhou Y, et al. MiR-125a-5p in MSC-derived small extracellular vesicles alleviates Müller cells injury in diabetic retinopathy by modulating mitophagy via PTP1B pathway. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):226. [doi:10.1038/s41420-025-02439-3](https://doi.org/10.1038/s41420-025-02439-3)
114. He Q, Song J, Cui C, Wang Y, Li S, Zhang H, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a reverses diabetic β -cell dedifferentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):449. [doi:10.1186/s13287-021-02371-0](https://doi.org/10.1186/s13287-021-02371-0)
115. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM, Finkel T, McClain DA, et al. Aging and insulin resistance: just say iNOS. *Diabetes*. 2013;62(2):346-8. [doi:10.2337/db12-1239](https://doi.org/10.2337/db12-1239)
116. Ursini F, Russo E, Pellino G, D'Angelo S, Chiaravalloti A, De Sarro G, et al. The mechanisms of action of metformin. *Pharmacol Res*. 2018;134:239-45. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5552828/>
117. Yi YF, Fan ZQ, Liu C, Zhang Q, Chen H, Wu X, et al. Immunomodulatory effects and clinical application of exosomes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2025;17(3):103560. [doi:10.4252/wjsc.v17.i3.103560](https://doi.org/10.4252/wjsc.v17.i3.103560)
118. Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, et al. Induction of paradoxical inflammatory responses by extracellular vesicles via Toll-like receptor activation. *Front Immunol*. 2020;11:1300. [doi:10.3389/fimmu.2020.01300](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01300)
119. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, Croix CM, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles modulate macrophage activation and suppress inflammation via miRNA cargo. *Cell Stem Cell*. 2018;22(4):502-16. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165668>
120. Wang SS, Jia J, Wang Z, Zhang Y, Liu X, Chen F, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles suppress iNOS expression and ameliorate neural impairment in Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis*. 2018;61(3):1005-13. [doi:10.3233/jad-170848](https://doi.org/10.3233/jad-170848)

121. Ti D, Hao H, Tong C, Liu J, Dong L, Zheng J. Hypoxic preconditioning enhances the anti-inflammatory effects of MSC-derived exosomes in islet transplantation. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12:232. Accessed August 14, 2025. <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-021-02397-2>
122. Shi R, Wang S, Zhu L, Ni Y, Liu J, Tian J. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate pancreatic damage in STZ-induced diabetic mice through modulation of inflammation. *J Cell Mol Med.* 2017;21(11):2711-2720. Accessed August 14, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613316/>
123. Wu J, Chen LH, Sun SY, Li Y, Ran XW. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: the dawn of diabetic wound healing. *World J Diabetes.* 2022;13(12):1066.
124. 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.
125. Jiao YR, Chen KX, Tang X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells in diabetes and diabetic complications. *Cell Death Dis.* 2024;15(4):271.
126. Wulandari NM, Santoso D, Putri DP. Pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap fungsi pankreas dan gambaran histopatologi pankreas tikus putih galur Wistar jantan yang mengalami diabetes melitus. *Jurnal P3K.* 2024;10(1):45-55.
127. Sari AP, Nugroho D, Widodo W. Pengaruh ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap histopatologi pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) yang diberi pakan tinggi lemak. *Berita Farmasi.* February 22, 2023. Accessed August 14, 2025. <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/baf/article/view/9162>
128. Harahap SB, Lestari M, Simanjuntak P. Efek ekstrak etanol daun sukun (*Artocarpus altilis*) dalam menurunkan kadar glukosa darah dan gambaran histopatologi pankreas pada tikus jantan model hiperkolesterolemia-diabetes diinduksi pakan tinggi lemak dan streptozotocin. *Jurnal Sains dan Kesehatan.* 2022;9(1):98-107.