

**PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS (EH-MSCs)* TERHADAP EKSPRESI
INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE-1 DAN *PROTEIN
KINASE B***

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

TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

**Riski Dwi Prameswari
MBK2423010466**

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

TESIS
PENGARUH *EXOSOME HYPOXIA MESENCHYMAL*
***STEM CELLS (EH-MSCs)* TERHADAP EKSPRESI**
INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE-1* DAN *PROTEIN
KINASE B

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

Disusun Oleh:

Riski Dwi Prameswari

MBK2423010466

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada

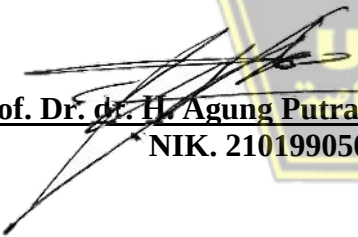
Tanggal 12 Agustus 2025

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui :

Pembimbing I,

Pembimbing II,


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


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

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



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

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “**Pengaruh Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) Terhadap Ekspresi Insulin Receptor Substrate dan Protein Kinase B**” adalah hasil karya saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.

Semarang, 12 Agustus 2025
Yang Menyatakan,

Riski Dwi Prameswari
MBK2423010466



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Riski Dwi Prameswari
Tempat / tanggal lahir : Gresik, 11 Desember 1985
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

SDN Sidokumpul 2 Gresik : Lulus Tahun 1998
SMPN 1 Gresik : Lulus Tahun 2001
SMAN 1 SOOKO Mojokerto : Lulus Tahun 2004
Fakultas Kedokteran Universitas
Hang Tuah Surabaya : Lulus Tahun 2011
Magister Ilmu Biomedis FK Unissula : 2024 - Sekarang



KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan hidayahnya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul **“Pengaruh Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) Terhadap Ekspresi Insulin Receptor Substrate dan Protein Kinase B”**. Pada penyusunan proposal tesis ini penyusun mendapat bantuan pengarahan dan bimbingan, untuk itu pada penyusun ingi mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH.,M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan Pendidikan Magister Ilmu Biomedik
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di Program Magister Ilmu Biomedik.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memebrikan kesempatan untuk mengikuti Pendidikan di Program Magister Ilmu Biomedik serta sebagai dosen penguji I.
4. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi. Med selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semngat bimbingan dan masukan dalam penyusunan tesis ini.

5. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat bimbingan dan masukan selama penyusunan tesis ini.
6. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo M.kes selaku penguji II yang banyak memberikan masukan agar penyusunan tesis ini lebih baik.
7. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku penguji III yang telah memberikan banyak saran saran dalam penyusunan tesis ini.
8. Para dosen pengajar dan staf Magister Ilmu Biomedik yang banyak membantu dan memberikan saran kepada penyusun.
9. Keluarga yang telah memberikan dorongan, serta doa sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau penulis menyadari bahwa penelitian ini masih banyak kekurangan. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar penelitian ini lebih sempurna untuk itu penyusun berharap dengan semua kekurangan dalam penulisan tesis ini, tetap dapat memberikan manfaat bagi penyusun pribadi, bagi Prodi Magister Biomedik serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan. Akhir kata, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmatnya kepada kita semua. Amin Ya Rabbal Alamin.

Semarang, Agustus 2025
Penulis,

Riski Dwi Prameswari
MBK2423010466

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Originalitas Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2.....	11
2.1.1 Definisi Diabetes Mellitus Tipe 2.....	11
2.1.2 Penyebab Diabetes Mellitus Tipe 2	13
2.1.3 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2	13
2.1.4 Terapi Diabetes Mellitus Tipe 2	17
2.1.5 Komplikasi Diabetes Mellitus Tipe 2	19
2.2 <i>Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)</i>	19
2.2.1 Definisi <i>Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)</i>	19
2.2.2 Struktur <i>Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)</i>	20
2.2.3 Fungsi <i>Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)</i>	21
2.2.4 Peran <i>Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)</i> Pada T2DM.....	21
2.3 <i>Protein Kinase B (PKB)</i>	22
2.3.1 Definisi <i>Protein Kinase B (PKB)</i>	22
2.3.2 Struktur <i>Protein Kinase B (PKB)</i>	23

2.3.3 Fungsi <i>Protein Kinase B</i> (PKB)	24
2.3.4 Peran <i>Protein Kinase B</i> (PKB) Pada T2DM	25
2.4 Peran IRS1 dan PKB Pada kondisi Diabetes Mellitus Tipe.....	26
2.5 <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	28
2.5.1 Definisi <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	28
2.5.2 Struktur <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	29
2.5.3 Fungsi <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	30
2.5.4 Peran <i>EH-MSCs</i> dalam Terapi Penyakit Diabetes mellitus tipe 2	31
2.6 Pengaruh <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)</i> Terhadap <i>Insulin Receptor Substrate-1</i> (IRS1) dan <i>Protein Kinase B</i> (PKB) Pada Diabetes mellitus tipe 2	33
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	35
3.1. Kerangka Teori	35
3.2. Kerangka Konsep.....	38
3.3. Hipotesis	38
BAB IV METODE PENELITIAN	39
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	39
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	41
4.3 Variabel dan Definisi Operasional.....	44
4.4 Bahan Penelitian	46
4.5 Alat Penelitian.....	47
4.6 Prosedur Penelitian	47
4.7 Analisis Data	52
4.8 Alur Penelitian	54
4.9 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	55
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	56
5.1 Hasil Penelitian	57
5.1.1 Isolasi <i>Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cell (EH- MSCs)</i>	57

5.1.2 Validasi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus Wistar Model	
Diabetes Melitus Tipe 2.....	58
5.2 Pembahasan Hasil Penelitian	62
5.3 Keterbatasan Penelitian.....	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	67
6.1 Kesimpulan	67
6.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	79



DAFTAR SINGKATAN

PKB	: <i>Protein Kinase B</i>
EH-MSCs	: <i>Exosomes hypoxia mesenchymal stem cells</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EVs	: <i>Vesikel ekstraselulars</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
Gel-H-Exos	: <i>Hypoxic exosomes-loaded HGM-QCS hydrogels</i>
GIP	: <i>Gastric Inhibitory Peptide</i>
GLP-1	: <i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GLUT	: <i>Glucose transporters</i>
HFD	: <i>High-Fat Diet</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia inducible factor</i>
huc-MSCs	: <i>Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells</i>
IDF	: <i>International Diabetes Federation</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IR	: <i>Resistensi insulin</i>
IRS1	: <i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
JAK	: <i>Janus kinase</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
miRNAs	: <i>MicroRNAs</i>
MSC-Exos	: <i>Mesenchymal stem cells-derived Exosome</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NTA	: <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PEPCK	: <i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PGF2	: <i>Prostaglandin F2</i>
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOCS3	: <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
T2DM	: <i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
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>

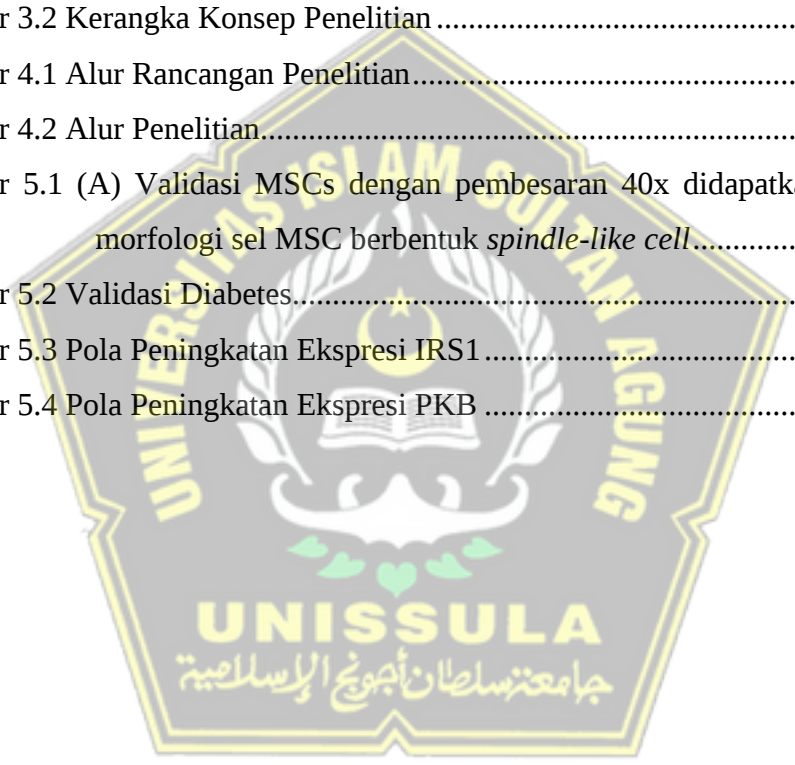
DAFTAR TABEL

Tabel 1-1 Originalitas Penelitian.....	4
Tabel 4-1 Jadwal Penelitian	55
Tabel 5-1 Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji <i>Kruskal Wallis</i> pada Ekspresi IRS1.....	58
Tabel 5-2 Perbedaan Ekspresi IRS1 antara kelompok penelitian	59
Tabel 5-3 Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji <i>One Way ANOVA</i> pada Ekspresi PKB.....	60
Tabel 5-4 Perbedaan Ekspresi PKB Antar Kelompok Penelitian	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Patofisiologi diabetes sebagian besar didasarkan pada resistensi insulin.	14
Gambar 2.2 Jalur pensinyalan insulin.	27
Gambar 2.3 Proses khas pembentukan, sekresi, dan pemindahan <i>MSC-Exos</i> dari sel donor ke sel penerima serta struktur <i>MSC-Exos</i>	33
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	37
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian	38
Gambar 4.1 Alur Rancangan Penelitian.....	40
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	54
Gambar 5.1 (A) Validasi MSCs dengan pembesaran 40x didapatkan gambaran morfologi sel MSC berbentuk <i>spindle-like cell</i>	57
Gambar 5.2 Validasi Diabetes.....	59
Gambar 5.3 Pola Peningkatan Ekspresi IRS1	61
Gambar 5.4 Pola Peningkatan Ekspresi PKB	62



ABSTRAK

Latar Belakang *Type 2 Diabetes Mellitus* (T2DM) merupakan kondisi penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan hiperglikemia akibat resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin. Dalam tingkat molekuler, resistensi insulin berhubungan erat dengan gangguan jalur sinyal insulin, terutama yang melibatkan protein kunci seperti IRS1 dan PKB. *MSC-Exos* telah terbukti efektif dalam modulasi inflamasi dan stres oksidatif maka itu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas *EH-MSCs* terutama dalam konteks klinis dan pengaturan dosis yang optimal dalam mentatalaksana kondisi diabetes

Tujuan: Mengetahui pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi IRS1 dan PKB 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% 300µL iv, kelompok kontrol positif (K2) metformin 300 mg/kgBB PO, kelompok perlakuan 1 (K3) *EH-MSCs* 250µl iv, dan kelompok perlakuan 2 (K4) *EH-MSCs* 500µl iv. Ekspresi IRS1 dan PKB diperiksa menggunakan qRT-PCR. Ekspresi IRS1 dianalisis dengan uji *Mann-Whitney* dan Ekspresi PKB dianalisis dengan uji *Post Hoc LSD*.

Hasil: Rerata ekspresi IRS1 tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 µL (3.03 ± 3.72) dan diikuti oleh kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 500 µL (2.52 ± 2.35). Sedangkan rerata ekspresi PKB tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 250 µL (2.47 ± 0.92) dan diikuti oleh kelompok perlakuan *EH-MSCs* dosis 500 µL (1.65 ± 1.18). Hasil uji statistik *Mann-Whitney* menunjukkan tidak terdapat perbedaan rerata ekspresi IRS1 pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan ($p > 0.05$). Uji *Post Hoc LSD* menunjukkan tidak terdapat perbedaan rerata ekspresi IRS1 pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan ($p > 0.05$).

Kesimpulan: Pemberian *EH-MSCs* dosis 250 µL dan 500 µL tidak berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi IRS1 dan PKB secara bermakna pada tikus model diabetes mellitus tipe 2.

Kata Kunci: *EH-MSCs*, *Exosomes*, *Hypoxia*, IRS1, PKB

ABSTRACT

Background: Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia due to insulin resistance and impaired insulin secretion. At the molecular level, insulin resistance is associated with disturbances in the insulin signaling pathway, especially involving the proteins IRS1 and PKB. MSC-Exos have been shown to have effects on modulating inflammation and oxidative stress, so further research is needed on the effect of EH-MSCs, especially in the context of dose and their role in modulating diabetes mellitus.

Objective: To determine the effect of EH-MSCs on IRS1 and PKB expression in Wistar rats with a type 2 diabetes mellitus model at various doses.

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). Negative control group (K1) received NaCl 0.9% 300 μ L, i.v. Positive control group (K2) received metformin 300 mg/kgBW orally. Treatment group 1 (K3) received EH-MSCs 250 μ L, i.v., and treatment group 2 (K4) received EH-MSCs 500 μ L, i.v. IRS1 and PKB expression was analyzed using RT-PCR and statistical analysis was performed using the Post Hoc LSD test.

Results: The highest mean IRS1 expression was found in group K4 (0.63 ± 0.14). The highest mean PKB expression was also found in group K4 (0.72 ± 0.15). The Post Hoc LSD test showed no significant difference in mean IRS1 and PKB expression between the control and treatment groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Administration of EH-MSCs at doses of 250 μ L and 500 μ L did not significantly affect the increase of IRS1 and PKB expression in Wistar rats with a type 2 diabetes mellitus model.

Keywords: EH-MSCs, Exosomes, Hypoxia, IRS1, PKB

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) merupakan kondisi penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan hiperglikemia akibat resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin.¹ Pada T2DM, *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS1) dan *Protein Kinase B* (PKB) merupakan dua marker kunci dalam jalur sinyal insulin yang berperan dalam metabolisme glukosa dan sensitivitas insulin.² Pemilihan IRS1 dan PKB sebagai marker dalam penelitian ini didasarkan pada peran krusial keduanya dalam transduksi sinyal insulin dan regulasi metabolik.^{3,4}

Obat antihiperglikemia oral (misalnya metformin, sulfonilurea, dan inhibitor DPP-4), serta terapi injeksi seperti insulin dan agonis reseptor GLP-1 merupakan terapi utama menurunkan kadar glukosa darah.⁵ Meski telah banyak digunakan, terapi ini masih belum mampu mengatasi masalah resistensi insulin dan inflamasi kronis pada T2DM.^{6,7} Saat ini, terdapat berbagai pendekatan dalam mengatasi diabetes, salah satunya adalah *exosomes* yang dihasilkan dari *mesenchymal stem cells* (MSCs) dengan prekondisi hipoksia.⁸ Penggunaan *exosomes* yang diprekondisikan hipoksia dinilai lebih efektif karena memiliki kandungan molekuler bioPKBif, seperti molekul anti-inflamasi dan pro-regeneratif, yang lebih tinggi dibandingkan *exosomes* normoksia.⁹

Berdasarkan data yang diperoleh *International Diabetes Federation* (IDF), pada tahun 2021 terdapat 537 juta penderita diabetes di seluruh dunia dengan proyeksi terjadinya peningkatan menjadi 783 juta pada tahun 2045.¹ DM T2 mencakup sekitar 90% dari total kasus diabetes dan erat kaitannya dengan perubahan gaya hidup serta peningkatan prevalensi obesitas.^{10,11} Di Indonesia, data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) menunjukkan prevalensi diabetes mengalami peningkatan yang cukup signifikan dari 6,9% pada tahun 2013 menjadi 8,5% pada tahun 2018.¹² Prevalensi ini disebut akan terus mengalami peningkatan dan diproyeksikan meningkat dari 9,19% (18,69 juta kasus) pada tahun 2020 menjadi 16,09% (40,7 juta kasus) pada tahun 2045. Angka ini menunjukkan peningkatan sebesar 75,1% dalam 25 tahun, dengan rata-rata kenaikan tahunan sebesar 3%.¹³ Hal ini menunjukkan dibutuhkan solusi inovatif dan efektif untuk menangani masalah diabetes.

Dalam tingkat molekuler, resistensi insulin berhubungan erat dengan gangguan jalur sinyal insulin, terutama yang melibatkan protein kunci seperti IRS1 dan PKB.^{3,4} IRS1 berfungsi sebagai penghubung utama antara reseptor insulin dengan jalur sinyal *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K)/ *Protein Kinase B* (PKB), sementara PKB berperan dalam translokasi GLUT4 dan regulasi metabolisme glukosa.¹⁴ Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa resistensi insulin pada T2DM berkaitan erat dengan gangguan pada jalur sinyal insulin, khususnya ekspresi IRS1 dan PKB.^{15,16} MSC-Exos telah terbukti efektif dalam modulasi inflamasi dan stres oksidatif.¹⁷ Penelitian *in-vivo* pada tikus model T2DM menunjukkan bahwa pemberian MSC-Exos

mampu meningkatkan sensitivitas insulin dan menurunkan peradangan sistemik.^{18,19} Meskipun demikian, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)*, terutama dalam konteks klinis dan pengaturan dosis yang optimal dalam mentatalaksana kondisi diabetes.

Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik melakukan penelitian dengan judul pengaruh *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap ekspresi IRS1 dan PKB pada tikus Wistar model diabetes mellitus tipe 2.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap ekspresi *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)* dan *Protein Kinase B (PKB)* pada tikus Wistar model Diabetes Melitus Tipe 2?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisa pengaruh *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)* terhadap *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)* dan *Protein Kinase B (PKB)* 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 *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS1) pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 setelah pemberian *Exosome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs)*.
2. Menganalisa ekspresi *Protein Kinase B* (PKB) 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. ¹⁸	<i>Therapeutic effects of mesenchymal stem cell conditioned media on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	MSCs-CM diberikan pada tikus diabetes secara intravena sebesar 0.5 mL selama 28 hari dan injeksi pankreas dosis Tunggal 0.5 mL menunjukkan penurunan kadar glukosa darah, hemoglobin glikosilasi A1c (HbA1c), penurunan marker apoptosis pankreas dan penurunan stres oksidatif.
2.	Khalil Y, Hussein R, El-Kholy W. Int. J. Adv. Res.2024;12(08): 1188-1199. ¹⁹	<i>Anti inflammatory and anti-apoptotic therapeutic effects of Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes on the Pancreas of Streptozotocin-diabetic Rats.</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Pemberian intravena MSC-Exos 500 µg/mL pada tikus diabetes menunjukkan penurunan sitokin pro-inflamasi TNF-α dan IL-6.
3.	Aierken A, Li B, Liu P, Cheng X, Kou Z, Tan N, et al. Stem Cell Res Ther. 2022 Apr 12;13(1):164. ²⁰	<i>Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of T2DM via the PI3K/PKB signaling pathway</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Kombinasi hUC-MSCs dan melatonin meningkatkan PKBivasi jalur PI3K/PKB dan mengurangi resistensi insulin pada tikus DMT2.

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
4.	Chen G, Fan XY, Zheng XP, Jin YL, Liu Y, Liu SC. Stem Cell Res Ther. 2020 Sep 16;11(1):401. ²¹	<i>Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance via PTEN-mediated crosstalk between the PI3K/PKB and Erk/MAPKs signaling pathways in the skeletal muscles of db/db mice</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	HUC-MSCs menstabilkan PI3K/PKB dan mengurangi inflamasi, menunjukkan mekanisme regulasi resistensi insulin pada otot rangka.
5.	Watad SH, Barakat N, Nassr A, Zahran F. Biochemistry Letters.2023;19(1):64-77. ²²	<i>Protective effects of Balanites aegyptiaca extract, MSCs and Exosome against Diabetic nephropathy induced in male albino rats</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Eksosom MSCs meningkatkan regenerasi sel beta pankreas dan mengurangi kerusakan ginjal pada tikus diabetes.
6.	Albeltagy RS, Hussein MM, Alazzouni AS, Abdo SM, Faraag AH, Hassan BN. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci 2021; 13(1):159-172. ²³	<i>Anti-Diabetic Effects of Metformin Nanoemulsion and Cell-Based Therapy on the Insulin Signaling Pathway (IRS1/PKB) and Apoptotic Related Genes in Type 2 Diabetic Rat Model</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Kombinasi terapi MSCs dan metformin nanoemulsion meningkatkan ekspresi IRS1/PKB dan mengurangi apoptosis pada hati tikus.
7.	Zheng T, Li S, Zhang T, Fu W, Liu S, He Y, Wang X, Ma T. Front Immunol. 2024 Jun 18;15:1397722. ²⁴	<i>Exosome-shuttled miR-150-5p from LPS-preconditioned mesenchymal stem cells down-regulate PI3K/PKB/mTOR pathway via Irs1 to enhance M2 macrophage polarization and confer protection against sepsis</i>	Eksperimental <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i>	Eksosom MSC yang dipre-kondisi LPS menurunkan IRS1 dan jalur PI3K/PKB/mTOR, mendukung polarisasi makrofag M2, serta melindungi dari sepsis.

Berdasarkan tabel 1.1, penelitian sebelumnya telah menunjukkan berbagai potensi MSCs, tetapi terdapat keterbatasan yang mendukung perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian sebelumnya telah mempelajari potensi *MSC-Exos* dengan dosis 500 μ L secara intravena dan injeksi langsung pada pankreas tikus yang telah diinduksi STZ, hasilnya menunjukkan bahwa *MSC-Exos* dapat menurunkan glukosa darah, menekan stress oksidatif dan memodulasi inflamasi melalui penurunan ekspresi sitokin pro-inflamasi.^{18,19} Streptozotocin (STZ) digunakan untuk menginduksi tikus model diabetes karena dapat merusak sel β pankreas dengan memicu stres oksidatif, sehingga mengurangi produksi insulin tanpa mengeliminasi sepenuhnya.¹⁹ Dalam sebuah studi, telah ditunjukkan bahwa kombinasi melatonin dan *exosomes* yang berasal dari *human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells* (hUC-MSC) mampu meningkatkan PKB jalur PI3K/PKB serta mengurangi resistensi insulin pada tikus model T2DM.²⁰ *MSC-Exos* juga telah dilaporkan berperan dalam mengatur sinyal insulin melalui jalur PI3K/PKB dan ERK/MAPK pada otot rangka tikus diabetes.²¹ Namun, pengaruh kondisi hipoksia terhadap *MSC-Exos* belum dievaluasi, dan studi tersebut tidak menyertakan pengujian dosis *exosomes* yang bervariasi.

Penelitian lain menunjukkan bahwa kombinasi *MSC-Exos* dengan campuran ekstrak *Balanites aegyptiaca* dapat menurunkan kadar glukosa darah dan meningkatkan regenerasi sel beta pankreas pada tikus dengan nefropati diabetes.²² Meskipun hasilnya

positif, penelitian tersebut tidak secara terpisah mengevaluasi efek *MSC-Exos* saja dan tidak menyelidiki dosis yang berbeda. Dalam penelitian lain, *MSC-Exos* yang dipre-kondisi dengan *lipopolysaccharide* (LPS) dilaporkan lebih efektif dalam menurunkan ekspresi IRS1 melalui jalur PI3K/PKB/mTOR dan mendukung polarisasi makrofag M2.²⁴ Namun, penelitian ini tidak menilai efek hipoksia terhadap *MSC-Exos* dan tidak memvariasikan dosis *exosome* yang digunakan. Penelitian lain mengenai kombinasi metformin nanoemulsion dan terapi MSCs yang mampu meningkatkan ekspresi IRS1/PKB serta mengurangi apoptosis pada model tikus diabetes.²³ Namun, fokus utama penelitian tersebut adalah kombinasi terapi dengan metformin dan eksosom MSCs yang dipre-kondisi dalam lingkungan hipoksia secara individual tidak diselidiki secara mendalam.

Penelitian ini lebih untuk memberikan solusi inovatif dalam pengelolaan diabetes melitus tipe 2 (DMT2) melalui terapi berbasis *MSC-Exos* yang dipre-kondisi hipoksia. Pendekatan ini dipilih karena potensinya untuk menargetkan mekanisme molekuler utama, termasuk peningkatan ekspresi IRS1 dan PKB, yang berperan penting dalam memperbaiki sinyal insulin dan metabolisme glukosa. *EH-SC-MSCs* dinilai sebagai terapi yang lebih aman, stabil, dan non-invasif dibandingkan terapi berbasis sel langsung atau metode pengobatan konvensional. Dengan mengeksplorasi pengaruh pemberian *EH-SC-MSCs* dalam dosis 250 μ L dan 500 μ L, penelitian ini diharapkan dapat

memberikan alternatif yang lebih efektif dan aplikatif untuk pengelolaan T2DM.



1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

1. Memberikan pemahaman tentang peran IRS1 dan PKB dalam inflamasi kronis pada patofisiologi T2DM.
2. Memberikan pemahaman baru tentang mekanisme kerja *EH-MS*C dalam meningkatkan ekspresi IRS1 dan menurunkan ekspresi PKB, yang berpotensi mengurangi stres oksidatif, inflamasi, dan memperbaiki kerusakan jaringan pada T2DM.
3. Menjadi referensi bagi penelitian lanjutan untuk mengembangkan terapi berbasis *EH-MS*C yang dapat diaplikasikan pada penyakit metabolik lain yang melibatkan hypoxia dan inflamasi.

1.5.2. Manfaat PrPKBis

1. Memberikan dasar ilmiah untuk mengembangkan *EH-MS*C sebagai terapi inovatif yang spesifik dan efektif dalam mengatur ekspresi IRS1 dan PKB, yang berperan penting dalam mengurangi inflamasi kronis dan memperbaiki kerusakan jaringan pada T2DM.
2. Mendukung penerapan *EH-MS*C dalam prPKBik klinis dengan menyediakan data empiris terkait efeknya pada peningkatan ekspresi IRS1 dan penurunan ekspresi PKB yang dapat mempercepat penyembuhan dan regenerasi jaringan.
3. Memberikan alternatif solusi berbasis bioteknologi untuk mengatasi komplikasi hipoksia dan inflamasi 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 penyakit metabolik kronis yang ditandai oleh hiperglikemia akibat kombinasi resistensi insulin dimana adanya ketidakmampuan jaringan tubuh merespons insulin secara efektif dan disfungsi sel β pankreas, yang menghasilkan sekresi insulin yang tidak memadai untuk mengimbangi kebutuhan tubuh.²⁵ Menurut *World Health Organization* (WHO), T2DM merupakan penyakit kronis yang melibatkan peningkatan kadar glukosa darah secara persisten.²⁵ Hal ini terjadi karena ketidakseimbangan antara produksi insulin oleh pankreas dan respons jaringan tubuh terhadap insulin. Hiperglikemia yang berlangsung lama dapat menyebabkan kerusakan organ-organ tubuh, termasuk jantung, pembuluh darah, ginjal, mata, dan saraf.²⁶

Peningkatan glukosa darah, menjadi salah satu fPKBor terbentuknya T2DM. Jumlah glukosa dalam aliran darah dikontrol sekitar 5-10 gram pada saat tertentu. Sel darah merah mewakili sekitar 40% volume darah dan glukosa dalam keadaan seimbang sehingga menambahkan glukosa dari serum dan sel darah merah menghasilkan total sekitar 5-10 gram glukosa di seluruh aliran darah.²⁷

Menurut Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Mellitus di Indonesia yang diterbitkan oleh PERKENI,⁵ diagnosis T2DM dilakukan berdasarkan beberapa kriteria. Gejala utama yang menjadi indikator T2DM meliputi poliuria (frekuensi buang air kecil yang meningkat), polidipsia (rasa haus berlebihan), polifagia (nafsu makan yang berlebihan), dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan. Selain gejala klinis, diagnosis juga didasarkan pada kadar glukosa darah.

Pada pemeriksaan glukosa darah puasa (GDP), kadar ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) menunjukkan diabetes, sementara kadar normal berada di bawah 100 mg/dL (5,6 mmol/L), dan kadar antara 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L) menunjukkan prediabetes. Glukosa darah sewaktu (GDS) ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) disertai gejala klasik diabetes juga dianggap sebagai diagnosis DM. Tes toleransi glukosa oral (TTGO) 2 jam yang menunjukkan kadar glukosa ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) setelah konsumsi 75 gram larutan glukosa juga menandakan diabetes, sementara kadar normal berada di bawah 140 mg/dL (7,8 mmol/L), dan kadar antara 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L) dianggap sebagai prediabetes. Kadar HbA1c juga digunakan sebagai indikator, di mana kadar $\geq 6,5\%$ menunjukkan diabetes, kadar antara 5,7-6,4% menunjukkan prediabetes, dan kadar di bawah 5,7% dianggap normal. Kombinasi kriteria ini membantu dalam menentukan diagnosis yang akurat untuk diabetes mellitus.⁵

2.1.2 Penyebab Diabetes Mellitus Tipe 2

T2DM disebabkan oleh resistensi insulin, yaitu ketidakmampuan tubuh untuk menggunakan insulin secara efektif, meskipun pankreas masih menghasilkan insulin.²⁸ Selain itu, fungsi pankreas dalam memproduksi insulin cenderung menurun seiring wPKBu. DM2 umumnya berkembang pada usia dewasa dan sangat dipengaruhi oleh gaya hidup tidak sehat, seperti pola makan tinggi kalori, kurang PKBivitas fisik, obesitas, dan juga fPKBor genetik.

Beberapa fPKBor risiko utama untuk T2DM meliputi obesitas, terutama lemak visceral, kurangnya PKBivitas fisik, pola makan tidak sehat yang tinggi kalori, gula, dan lemak jenuh, serta rendah serat. Selain itu, hipertensi dan dislipidemia sering berhubungan erat dengan T2DM, bersama dengan riwayat diabetes gestasional pada wanita dan fPKBor etnisitas tertentu, seperti Asia Selatan, Afrika, dan Hispanik.^{28,29} Risiko juga meningkat seiring bertambahnya usia, khususnya setelah 45 tahun, serta pada individu yang memiliki kebiasaan merokok. Kombinasi penyebab dan fPKBor risiko ini dapat mempercepat perkembangan T2DM jika tidak ditangani dengan baik melalui perubahan gaya hidup, kontrol berat badan, dan manajemen penyakit kronis lainnya.¹²

2.1.3 Patofisiologi Diabetes Mellitus Tipe 2

Patofisiologi T2DM melibatkan berbagai perubahan metabolik yang kompleks, terutama terkait dengan resistensi insulin, disfungsi sel beta pankreas, dan gangguan metabolisme glukosa. Pada tahap awal perkembangan penyakit, sel β pankreas berusaha mengkompensasi resistensi insulin dengan meningkatkan sekresi insulin untuk mempertahankan homeostasis glukosa.²⁶



Gambar 2.1 Patofisiologi diabetes sebagian besar didasarkan pada resistensi insulin. Insulin tidak adekuat pada diabetes melitus tipe 1, sedangkan pada diabetes melitus tipe 2, insulin ditolak oleh jaringan perifer.³⁰

Patofisiologi T2DM terdapat resistensi insulin yang dikaitkan dengan sitokin pro-inflamasi dalam plasma dan kadar asam lemak yang tinggi, sehingga menyebabkan kekurangan transportasi glukosa ke sel target, peningkatan pemecahan lemak, dan peningkatan produksi glukosa hati.³⁰ Hiperglikemia yang terjadi diakibatkan oleh sekresi glukagon yang berlebihan dan defisiensi insulin oleh sel alfa yang mensekresi glukagon dan sel beta yang mensekresi insulin.³⁰ Pada

T2DM, pasien tidak dapat meningkatkan sekresi insulin untuk mengatasi resistensi insulin mereka, sehingga menyebabkan kadar glikemik yang tinggi.²⁹

Patofisiologi diabetes melitus T2 melibatkan delapan kelainan utama yang disebut sebagai "*ominous octet*" yaitu:³¹

- Disfungsi Sel

Disfungsi sel β pankreas merupakan komponen kunci dalam patogenesis T2DM. Sel β bertanggung jawab untuk memproduksi insulin, hormon yang mengatur kadar glukosa darah. Pada individu dengan DM2, kemampuan sel β untuk merespons peningkatan kadar glukosa dengan memproduksi insulin menurun secara signifikan. Penyebab terjadinya gangguan Disfungsi Sel Beta Pankreas: Glukotoksisitas, lipotoksisitas, stres oksidatif, dan inflamasi kronis.³¹

- Penurunan Sensitivitas Insulin pada Otot

Resistensi insulin di otot rangka menyebabkan penurunan pengambilan glukosa oleh GLUT-4. Efek: Hiperglikemia postprandial akibat berkurangnya pemanfaatan glukosa di otot. Mekanisme kerjanya: PKBivitas jalur insulin terganggu, terutama pada fosforilasi IRS-1.³²

- Resistensi Insulin di Hati

Insulin gagal menghambat produksi glukosa oleh hati. Sehingga terjadinya peningkatan glukoneogenesis dan

glikogenolisis, memperburuk hiperglikemia puasa. Resistensi insulin meningkatkan ekspresi PEPCCK (*Phosphoenolpyruvate Carboxykinase*) dan G6Pase (*Glucose-6-Phosphatase*).³²

- Disfungsi Jaringan Adiposa

Terjadi karena adanya peningkatan lipolisis akibat resistensi insulin. Berdampak pada peningkatan asam lemak bebas (FFA) yang memperburuk resistensi insulin di hati dan otot dengan mekanisme merangsang inflamasi dan stres oksidatif.³²

- Defisiensi Efek Incretin

Incretin adalah hormon usus yang dilepaskan setelah makan dan berfungsi untuk meningkatkan sekresi insulin. Penurunan sekresi hormon GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*) dan GIP (*Gastric Inhibitory Peptide*) menyebabkan berkurangnya stimulasi sekresi insulin dan penghambatan glukagon.³³

- Hiperglukagonemia dari Sel Alfa Pankreas

Sel alfa pankreas menghasilkan glukagon, hormon yang merangsang produksi glukosa oleh hati. Pada T2DM, sekresi glukagon tetap tinggi meskipun kadar insulin meningkat, yang menyebabkan peningkatan produksi glukosa di hati dan memperparah hiperglikemia.³³

- Peningkatan Reabsorpsi Glukosa di Ginjal

Ginjal berperan penting dalam homeostasis glukosa dengan menyaring dan menyerap kembali glukosa dari urin. Pada T2DM,

terjadi peningkatan reabsorpsi glukosa melalui upregulasi transporter SGLT-2, yang mencegah ekskresi glukosa dan memperburuk hiperglikemia.³³

- Disfungsi Neurotransmitter

Disfungsi neurotransmitter di otak turut berperan dalam patogenesis T2DM. Resistensi insulin pada pusat pengatur nafsu makan di otak menyebabkan peningkatan nafsu makan dan kenaikan berat badan, yang semakin memperparah kondisi metabolik.³³

Pada tingkat molekuler, resistensi insulin terjadi melalui berbagai mekanisme termasuk gangguan pada jalur sinyal IRS-1/PI3K/PKB2, peningkatan sitokin proinflamasi, dan akumulasi lipid.³⁴ Kondisi hiperglikemia kronis mengakibatkan jalur stres oksidatif yang berkontribusi pada kerusakan sel beta pankreas.³⁴

2.1.4 Terapi Diabetes Mellitus Tipe 2

Diperlukan pendekatan terapi holistik yang bertujuan untuk meningkatkan kualitas hidup pasien, mencegah komplikasi, serta menurunkan angka kesakitan dan kematian. Berdasarkan panduan PERKENI,⁵ pengelolaan T2DM mencakup edukasi pasien, terapi nutrisi medis, peningkatan aktivitas fisik, terapi farmakologis, serta pemantauan kondisi secara berkala.

Langkah pertama yang penting adalah edukasi pasien untuk meningkatkan pemahaman mereka tentang penyakit, pengobatan, dan

target terapi yang diharapkan.^{5,35} Dalam aspek nutrisi medis, pola makan yang seimbang dengan kebutuhan kalori individu sangat disarankan, sementara PKBivitas fisik dengan intensitas sedang direkomendasikan untuk membantu meningkatkan sensitivitas insulin.³⁶

Secara farmakologis, metformin sering menjadi terapi lini pertama untuk T2DM. Obat ini bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin pada jaringan perifer, mengurangi produksi glukosa oleh hati, dan menurunkan kadar glukosa darah puasa. Jika kontrol gula darah tidak tercapai dengan metformin saja, kombinasi dengan obat oral lainnya dapat digunakan, seperti sulfonilurea yang merangsang sekresi insulin dari sel β pankreas, inhibitor DPP-4 yang meningkatkan PKBivitas hormon inkretin, atau inhibitor SGLT-2 yang meningkatkan ekskresi glukosa melalui urin.⁵

Pada kasus hiperglikemia berat atau ketika target glikemik tidak tercapai, terapi insulin dapat diberikan, baik sebagai tambahan pada terapi oral maupun sebagai pengobatan utama. Jenis insulin yang digunakan, seperti insulin basal, bolus, atau premix, dipilih berdasarkan kebutuhan pasien dan tingkat keparahan hiperglikemia. Selain itu, agonis reseptor GLP-1 dapat menjadi pilihan terutama untuk pasien dengan risiko kardiovaskular yang tinggi karena manfaatnya dalam menurunkan berat badan dan memperbaiki profil lipid. Pendekatan komprehensif ini dirancang untuk memberikan pengelolaan yang optimal bagi pasien DMT2.^{5,35,37}

2.1.5 Komplikasi Diabetes Mellitus Tipe 2

Komplikasi Mikrovaskular²⁸

- a. Nefropati Diabetes: Penebalan membran basal glomerulus dan fibrosis interstitial.
- b. Retinopati Diabetes: Disfungsi mikrovaskular di retina akibat angiogenesis abnormal.
- c. Neuropati Diabetes: Kerusakan saraf akibat iskemia lokal dan stres oksidatif.

Komplikasi Makrovaskular²⁸

1. Penyakit Jantung Koroner (PJK): Aterosklerosis dipercepat oleh AGE-RAGE dan inflamasi.
2. Stroke: Hiperglikemia meningkatkan risiko plak aterosklerotik.
3. Gangrene: Iskemia jaringan perifer akibat disfungsi vaskular.

2.2 Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)

2.2.1 Definisi Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)

Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1) adalah protein adaptor sinyal yang berperan penting dalam jalur transduksi sinyal insulin. IRS-1 berfungsi sebagai penghubung antara reseptor insulin dan jalur sinyal PI3K/PKB dan MAP kinase, yang mengatur berbagai proses biologis, termasuk metabolisme glukosa dan pertumbuhan sel.³⁸ Fosforilasi tirosin IRS1 oleh reseptor insulin memicu pembentukan situs pengikatan untuk protein lain yang memiliki domain SH2, seperti PI3K, yang kemudian terlibat dalam PKBivasi jalur sinyal yang lebih lanjut.

Meski demikian, IRS1 dapat mengalami fosforilasi pada residu serin atau treonin, yang dapat menghambat atau meningkatkan PKBivitas sinyal insulin tergantung pada lokasi spesifik fosforilasi tersebut. Gangguan pada fungsi IRS1 sering berkaitan dengan resistensi insulin.³⁹

2.2.2 Struktur *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)*

IRS1 memiliki berat molekul sekitar 185 kDa dan berfungsi sebagai penghubung dalam jalur transduksi sinyal insulin.⁴⁰ Struktur IRS1 mencakup dua domain fungsional utama, yaitu domain *pleckstrin homology* (PH) yang terletak di bagian N-terminus dan berfungsi dalam interaksi dengan fosfolipid dan protein lain, serta domain *phosphotyrosine-binding* (PTB) yang terletak sekitar 40 residu di bawahnya, yang berperan dalam pengikatan residu tirosin terfosforilasi pada reseptor insulin dan fPKBor pertumbuhan.⁴¹

Domain PH IRS1 memiliki kantong pengikatan bermuatan positif yang memungkinkan interaksi dengan fosfolipid dan protein bermotif asam, sedangkan domain PTB dapat mengenali residu tirosin terfosforilasi dalam motif NPXY, yang menghubungkan IRS-1 dengan reseptor insulin dan reseptor *insulin-like growth factor* (IGF)⁴². Selain itu, bagian C-terminal dari IRS-1 mengandung banyak situs fosforilasi yang berkontribusi pada regulasi fungsinya dan dapat mempengaruhi interaksi dengan protein lain yang terlibat dalam jalur sinyal.⁴³ Struktur ini memungkinkan IRS1 untuk bertindak sebagai *scaffold* yang

mengintegrasikan berbagai jalur sinyal, memainkan peran penting dalam metabolisme glukosa dan pertumbuhan sel.^{42,43}

2.2.3 Fungsi *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)*

Fungsi utama IRS1 adalah sebagai adaptor sinyal dalam jalur transduksi sinyal insulin dan fPKBor pertumbuhan. IRS-1 berperan penting dalam menghubungkan reseptor insulin dengan berbagai jalur *downstream*, seperti PI3K/PKB dan MAPK, yang mengatur metabolisme glukosa, pertumbuhan sel, dan proliferasi.³ Ketika insulin mengikat reseptor insulin, IRS-1 mengalami fosforilasi pada residu tirosin, yang menciptakan situs pengikatan untuk protein lain yang mengandung domain SH2, seperti PI3K. PKBivasi PI3K melalui IRS-1 menghasilkan produksi PIP3, yang kemudian merekrut dan mengPKBifkan PKB, enzim kunci dalam regulasi metabolisme glukosa dan pertumbuhan sel.⁴⁴

Selain itu, IRS-1 juga terlibat dalam pengaturan gen-gen yang penting untuk homeostasis glukosa. Namun, fungsi IRS-1 dapat dipengaruhi oleh fosforilasi pada residu serin atau treonin, yang dapat menghambat atau meningkatkan sinyal insulin. Misalnya, fosforilasi serin 307 dapat mengganggu interaksi antara IRS-1 dan reseptor insulin, menyebabkan resistensi insulin. Oleh karena itu, IRS-1 berfungsi sebagai pengatur utama dalam menjaga keseimbangan metabolik dan respons terhadap insulin di dalam tubuh.⁴⁵

2.2.4 Peran *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1)* Pada T2DM

IRS1 berperan dalam melalui mekanisme resistensi insulin. Penelitian menunjukkan bahwa tingkat ekspresi mRNA IRS1 berkurang pada adiposit dari individu obesitas serta pada otot rangka dari subjek yang mengalami resistensi insulin dibandingkan dengan yang sensitif terhadap insulin.³⁹ Hal ini menunjukkan bahwa penurunan IRS1 dapat berkontribusi terhadap gangguan metabolisme glukosa yang banyak terjadi pada penderita DM2.⁴⁶ Selain itu, variasi genetik tertentu dalam IRS1, seperti polimorfisme Gly972Arg, telah terbukti berhubungan dengan resistensi insulin dan hiperglikemia. Dalam beberapa studi, individu dengan varian ini menunjukkan peningkatan kadar insulin plasma dan indeks resistensi insulin (HOMA-IR), yang menunjukkan bahwa IRS1 tidak hanya berfungsi dalam transduksi sinyal tetapi juga sebagai fPKBor penting dalam pengaturan metabolisme glukosa.^{39,46}

2.3 *Protein Kinase B* (PKB)

2.3.1 Definisi *Protein Kinase B* (PKB)

PKB, juga dikenal sebagai *Protein Kinase B*, adalah serine/threonine kinase yang berperan penting dalam berbagai fungsi seluler, termasuk pertumbuhan, metabolisme, proliferasi, dan kelangsungan hidup sel. Terdapat tiga isoform utama dari PKB pada mamalia, yaitu PKB1, PKB2, dan PKB3, yang memiliki struktur domain yang mirip namun menunjukkan spesifikasi fungsi yang berbeda. Struktur PKB terdiri dari domain PH di bagian N-terminus,

domain katalitik di tengah, dan domain regulatori di bagian C-terminus. PKBivasi PKB terjadi melalui fosforilasi pada residu tertentu, terutama Thr308 dan Ser473, yang memungkinkan PKB untuk berinteraksi dengan berbagai substrat downstream dan mengatur banyak jalur sinyal seluler.^{47,48}

PKB berperan secara sentral dalam jalur transduksi sinyal PI3K-PKB, yang diPKBifkan oleh sinyal ekstraseluler lainnya. Ketika diPKBifkan, PKB mempromosikan kelangsungan hidup sel dengan menghambat proses apoptosis melalui penghambatan protein pro-apoptotik seperti FOXO.^{47,49} Selain itu, PKB juga berperan dalam regulasi metabolisme glukosa dengan meningkatkan transkripsi *glucose transporters* (GLUT) dan memfasilitasi sintesis glikogen. Disfungsi atau PKBivasi abnormal jalur PKB sering kali dikaitkan dengan berbagai penyakit, termasuk kanker dan diabetes, menjadikannya target penting dalam pengembangan terapi baru.⁵⁰

2.3.2 Struktur *Protein Kinase B* (PKB)

PKB memiliki struktur yang terdiri dari tiga domain fungsional utama, yaitu domain PH di bagian N-terminus, domain katalitik di tengah, dan domain regulatori di bagian C-terminus. Domain PH berfungsi untuk berinteraksi dengan lipid membran, khususnya PIP3, yang penting pada proses translokasi PKB ke membran sel. Domain ini terdiri dari sekitar 100 asam amino dan memainkan peran kunci dalam pengenalan oleh kinase hulu serta translokasi PKB ke membran.⁵¹

Domain katalitik adalah bagian tengah dari protein PKB dan memiliki kesamaan tinggi dengan kinases lainnya. Domain ini mengandung residu threonine yang harus terfosforilasi untuk mengPKBifkan PKB. PKBivasi PKB terjadi melalui fosforilasi pada dua residu kunci, yaitu Thr308 di loop PKBivasi dan Ser473 di domain regulatori C-terminal. Fosforilasi ini diperlukan untuk mengubah konformasi PKB menjadi bentuk PKBif, memungkinkan interaksi dengan substrat downstream.⁵²

Bagian C-terminal dari PKB berfungsi sebagai domain regulatori yang mengandung motif hidrofobik dan daerah kaya prolin. Motif ini juga harus terfosforilasi untuk mengPKBifkan PKBivitas kinase PKB. Struktur keseluruhan PKB menunjukkan bahwa interaksi antara domain PH dan domain katalitik sangat penting dalam pengaturan autoinhibisi dan PKBivasi kinase. Selain itu, perubahan konformasi yang terjadi pada saat fosforilasi mempengaruhi afinitas PKB terhadap PIP3 dan substrat lainnya, menjadikannya sebagai komponen kunci dalam jalur sinyal yang mengatur pertumbuhan sel dan metabolisme.^{51,52}

2.3.3 Fungsi *Protein Kinase B* (PKB)

PKB berfungsi sebagai regulator utama dalam berbagai proses seluler, termasuk kelangsungan hidup, pertumbuhan, metabolisme, migrasi, dan diferensiasi sel. PKBivasi PKB terjadi melalui fosforilasi pada residu spesifik, yang memungkinkan protein ini untuk berinteraksi dengan banyak substrat *downstream*. Salah satu fungsi utama PKB

adalah mempertahankan kelangsungan hidup sel dengan menghambat proses apoptosis. PKB dapat memfosforilasi dan menginaktivasi protein pro-apoptotik seperti BAD, sehingga mencegah kematian sel yang tidak diinginkan. Selain itu, PKB juga berperan dalam regulasi metabolisme glukosa dengan meningkatkan translokasi GLUT4 ke membran plasma, yang penting untuk pengambilan glukosa oleh sel.^{14,53}

PKB juga terlibat dalam pengaturan siklus sel dengan memfasilitasi transisi dari fase G1 ke S dan G2 ke M. Aktivitas PKB yang tinggi selama fase G2/M membantu melindungi sel dari apoptosis dan memastikan masuknya sel ke mitosis secara efisien. Selain itu, PKB berperan dalam angiogenesis, yaitu pembentukan pembuluh darah baru, yang penting untuk pertumbuhan tumor dan penyembuhan luka. Disfungsi jalur sinyal PKB sering kali terkait dengan berbagai penyakit inflamasi kronis, termasuk kanker dan diabetes.^{48,54}

2.3.4 Peran *Protein Kinase B* (PKB) Pada T2DM

PKB berfungsi sebagai komponen transduksi sinyal insulin pada jalur sinyal PI3K/PKB dalam pengambilan glukosa oleh sel-sel tubuh. Aktivasi PKB terjadi setelah insulin mengikat reseptor insulin, yang kemudian memicu fosforilasi PKB pada residu spesifik. PKB yang teraktivasi berfungsi untuk meningkatkan translokasi transporter glukosa GLUT ke membran sel, sehingga memungkinkan glukosa dari darah masuk ke dalam sel, terutama di jaringan otot dan lemak, serta

menghambat produksi glukosa di hati melalui pengaturan enzim-enzim penting seperti G6Pase dan PEPCK.⁵⁵

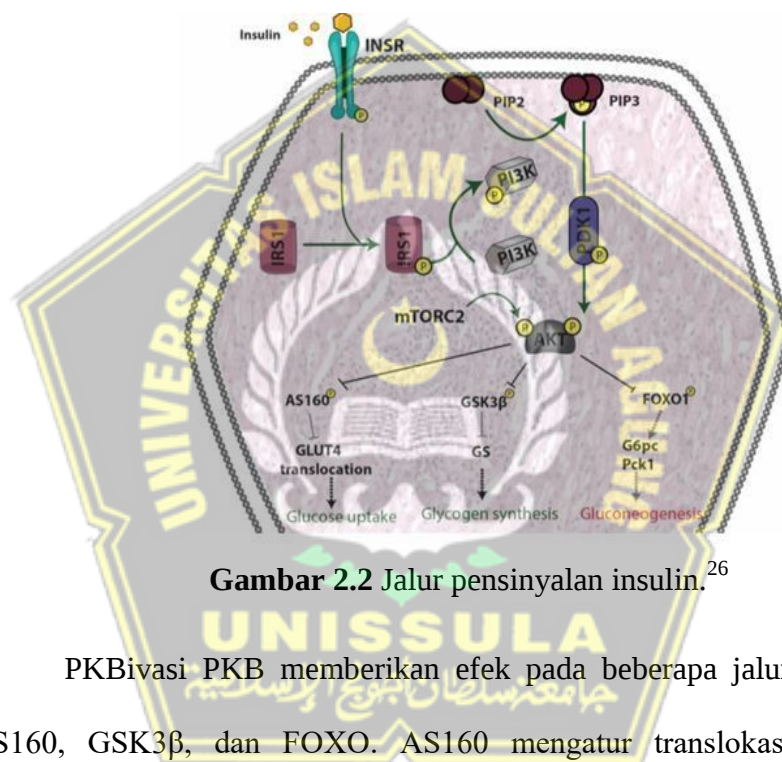
Pada individu dengan T2DM, sering terjadi gangguan pada jalur PI3K/PKB yang berkontribusi pada resistensi insulin. Penurunan PKB atau PKB dapat menyebabkan penurunan sensitivitas sel terhadap insulin, sehingga mengganggu pengambilan glukosa dan meningkatkan kadar glukosa darah. Penelitian menunjukkan bahwa mutasi atau penurunan ekspresi isoform PKB 2, yang paling banyak ditemukan di jaringan sensitif insulin, dapat menyebabkan gejala mirip diabetes dan resistensi insulin.^{56,57}

2.4 Peran IRS1 dan PKB Pada kondisi Diabetes Mellitus Tipe

Pada keadaan resistensi insulin (IR), tingkat fisiologis insulin yang bersirkulasi tidak cukup untuk menimbulkan respon insulin yang sesuai pada sel-sel hati. Pada hepar, IR mengganggu sintesis glikogen, gagal menekan produksi glukosa, meningkatkan lipogenesis, dan meningkatkan sintesis protein seperti CRP proinflamasi. Produksi protein proinflamasi yang tidak normal seperti adipositokin dan sitokin, dikombinasikan dengan kondisi seperti stres oksidatif, dapat menyebabkan keadaan inflamasi yang menyebabkan perubahan respon insulin oleh hati.²⁶

Pada Gambar 2.2 menjelaskan bahwa jalur ketika insulin (ditandai dengan molekul kuning) berikatan dengan reseptor insulin (INSR) yang berada pada membran sel. Ikatan ini mengaktifkan reseptor melalui proses autofosforilasi, yang kemudian memfosforilasi IRS1. IRS1 berfungsi sebagai

adaptor protein yang meneruskan sinyal dari reseptor insulin ke jalur hilir. Setelah teraktivasi, IRS1 merekrut dan mengaktifkan enzim PI3K, yang mengubah PIP2 menjadi di membran plasma. PIP3 ini berperan merekrut PDK1 ke membran, yang kemudian mengaktifkan PKB melalui fosforilasi. PKB menjadi protein kunci dalam jalur sinyal insulin, yang mengatur berbagai proses metabolisme penting dalam sel.²⁶



Gambar 2.2 Jalur pensinyalan insulin.²⁶

PKBivasi PKB memberikan efek pada beberapa jalur hilir, seperti AS160, GSK3β, dan FOXO. AS160 mengatur translokasi GLUT4 ke permukaan membran, sehingga meningkatkan pengambilan glukosa oleh sel.²⁶ GSK3β dihambat oleh PKB, yang memungkinkan PKBivasi glycogen synthase dan meningkatkan sintesis glikogen.⁵⁸ Selain itu, PKB juga menghambat FOXO, yang menurunkan ekspresi enzim-enzim glukoneogenesis seperti G6pc dan Pck1, sehingga menurunkan produksi glukosa baru di hati.^{53,58} Kompleks mTORC2 berperan dalam memperkuat PKBivasi PKB, mendukung jalur ini untuk meningkatkan efisiensi sinyal

insulin. Efek keseluruhan dari jalur ini adalah peningkatan pengambilan glukosa oleh sel, penyimpanan glukosa dalam bentuk glikogen, dan pengurangan produksi glukosa baru di hati. Pada kondisi resistensi insulin seperti pada T2DM, jalur ini terganggu, terutama pada tingkat fosforilasi IRS1 dan PKBivasi PKB. Gangguan ini menyebabkan penurunan pengambilan glukosa, hambatan pada sintesis glikogen, dan peningkatan glukoneogenesis, yang memperburuk kondisi hiperglikemia kronis. Jalur ini menjadi target penting dalam penelitian terapi DMT2 untuk memperbaiki resistensi insulin dan kontrol metabolik.²⁶

2.5 *Mesenchymal Stem Cells*

2.5.1 Definisi *Mesenchymal Stem Cells*

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel punca yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, termasuk kondrosit. MSCs pertama kali diidentifikasi pada sumsum tulang, namun juga ditemukan di berbagai jaringan seperti lemak, tali pusat, plasenta, dan gigi susu.⁵⁹ Karakteristik MSC:

- a. MSCs mampu berdiferensiasi menjadi sel mesenkimal (tulang, otot, dan lemak) dan memberikan kontribusi pada regenerasi jaringan.⁶⁰
- b. MSCs menghasilkan imunomodulator seperti prostaglandin E2 (PGE2), TGF- β , dan IL-10, yang dapat menekan PKBivitas limfosit T dan meningkatkan toleransi imun.⁶⁰
- c. MSCs dapat mensekresi molekul pertumbuhan seperti VEGF dan HGF yang berperan dalam angiogenesis dan regenerasi jaringan.⁶⁰

Berdasarkan standar internasional, MSCs harus mengekspresikan penanda permukaan tertentu. Penanda positif meliputi CD105, CD73, dan CD90, sedangkan penanda negatif mencakup CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, dan HLA-DR.⁶¹ Profil imunologis ini memberikan MSCs sifat *immunoprivilege*, memungkinkan mereka menghindari pengenalan oleh sistem imun sekaligus memodulasi respons imun, sehingga meningkatkan potensinya untuk aplikasi terapeutik.⁶¹

Exosomes yang berasal dari MSCs merupakan vesikel berbentuk bulat dengan lapisan lipid ganda berukuran 40-100 nm. Pembentukannya terjadi melalui proses kompleks yang melibatkan invaginasi membran plasma, pembentukan endosom awal, dan akhirnya pelepasan melalui fusi membran.⁶²

2.5.2 Struktur *Mesenchymal Stem Cells*

Penelitian terbaru mengungkapkan bahwa MSCs memiliki karakteristik morfologi khas, seperti ukuran badan sel yang kecil dengan tonjolan panjang dan tipis, inti sel besar berbentuk bulat dengan nukleolus menonjol, serta kromatin yang tersebar halus.⁶¹ Sel-sel ini tumbuh melalui tiga fase berbeda: fase lag awal yang berlangsung selama 3–5 hari, fase ekspansi cepat, dan diakhiri dengan fase stasioner. Salah satu sifat paling menonjol dari MSCs adalah multipotensitasnya, yang memungkinkan diferensiasi menjadi berbagai 16 jenis sel dari asal mesodermal.⁶³ Hal ini menjadikan MSCs dapat menjadi alternatif pada

rekayasa jaringan dan kedokteran regeneratif. Selain itu, MSCs memiliki kemampuan terapeutik seperti bermigrasi ke lokasi cedera dan mensekresi sitokin tertentu yang berperan dalam proses penyembuhan.⁶¹

Struktur nano tersebut mengandung berbagai komponen bioPKBif, termasuk protein, asam nukleat, lipid, dan berbagai molekul pengatur yang memungkinkan komunikasi antar sel yang canggih.⁶⁴ Pada penyembuhan luka, *exosomes* akan meningkatkan proliferasi fibroblas, mendorong pembentukan pembuluh darah baru, dan mengatur respons imun melalui transfer miRNA spesifik.⁵³ Pada pengobatan diabetes, *exosomes* menunjukkan kemampuan untuk menghambat peradangan pulau Langerhans dan meningkatkan sensitivitas insulin. Keunggulan *exosomes* yang berasal dari MSCs dibandingkan terapi sel langsung terletak pada stabilitas biologis yang lebih baik, imunogenisitas yang lebih rendah, dan kemampuan untuk melewati penghalang biologis. Hal ini secara efektif menghindari potensi risiko yang terkait dengan terapi sel, seperti tumorigenisitas dan penolakan imun, sambil mempertahankan efektivitas terapeutik.⁶⁴

2.5.3 Fungsi *Mesenchymal Stem Cells*

Salah satu karakteristik utama MSCs adalah kemampuan multipotensinya, yang memungkinkan diferensiasi menjadi berbagai jenis sel mesodermal.⁶¹ Sifat ini menjadikan MSCs sangat bermanfaat dalam bidang rekayasa jaringan dan kedokteran regeneratif. Selain itu,

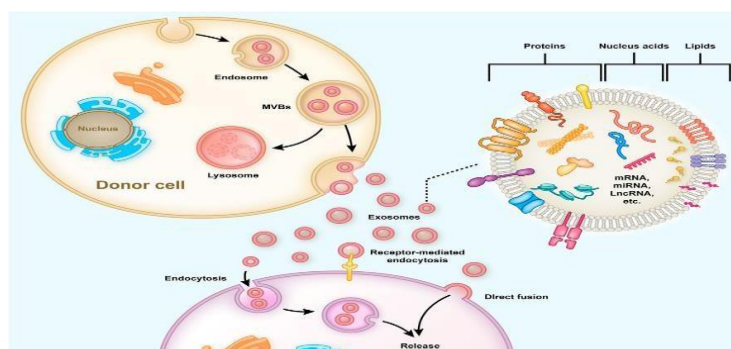
MSCs memiliki sejumlah kemampuan terapeutik yang signifikan, seperti kemampuan bermigrasi ke area cedera dan menghasilkan sitokin tertentu yang berperan penting dalam proses penyembuhan. Dengan kemudahan dalam isolasi dan pengembangan secara *ex-vivo*, MSCs telah menjadi salah satu pilihan unggulan untuk terapi berbasis sel punca.⁶¹ Kombinasi keunggulan seperti multipotensitas, sifat imunomodulasi, dan kemampuan migrasi membuat MSCs sangat potensial untuk aplikasi klinis dalam kedokteran regeneratif dan rekayasa jaringan. Penelitian yang terus berkembang semakin menyoroti potensi MSCs dalam terapi, mulai dari pengobatan penyakit autoimun hingga mempercepat regenerasi dan perbaikan jaringan.⁶⁴

2.5.4 Peran *EH*-MSCs dalam Terapi Penyakit Diabetes mellitus tipe 2

Pada penyembuhan luka, *exosomes* akan meningkatkan proliferasi fibroblas, mendorong pembentukan pembuluh darah baru, dan mengatur respons imun melalui transfer miRNA spesifik.⁵³ Pada pengobatan diabetes, *exosomes* menunjukkan kemampuan untuk menghambat peradangan pulau Langerhans dan meningkatkan sensitivitas insulin. Keunggulan *exosomes* yang berasal dari MSCs dibandingkan terapi sel langsung terletak pada stabilitas biologis yang lebih baik, imunogenisitas yang lebih rendah, dan kemampuan untuk melewati penghalang biologis. Hal ini secara efektif menghindari potensi risiko yang terkait dengan terapi sel, seperti tumorigenisitas dan penolakan imun, sambil mempertahankan efektivitas terapeutik.⁶⁴

Mekanisme kerja *exosomes* melibatkan tiga jalur utama, yaitu PKBivasi reseptor langsung pada sel target, modifikasi lingkungan ekstraselular, dan fusi membran dengan pelepasan konten berikutnya.⁶⁵ Melalui mekanisme ini, *exosomes* yang berasal dari MSCs dapat mempengaruhi berbagai proses seluler, termasuk perbaikan jaringan, imunomodulasi, dan regenerasi sel.⁶⁵ *MSC-Exos* ini membantu mengurangi steatosis hati dan peradangan dengan memodulasi metabolisme lipid serta menurunkan stres retikulum endoplasma di jaringan hepar. Pada obesitas, *MSC-Exos* diketahui dapat mendorong diferensiasi jaringan adiposa putih menjadi adiposa coklat, sekaligus meningkatkan termogenesis pada jaringan adiposa coklat, yang berpotensi membantu pengelolaan berat badan. *MSC-Exos* memiliki beberapa keunggulan dibandingkan terapi berbasis sel tradisional.

Keunggulan ini meliputi stabilitas biologis yang lebih baik, imunogenisitas yang rendah sehingga risiko komplikasi lebih kecil, kemampuan untuk melintasi penghalang biologis, serta kemudahan dalam penyimpanan dan transportasi dibandingkan dengan transplantasi sel utuh.⁶⁶ Efek terapeutik *MSC-Exos* didukung oleh muatan kompleksnya, seperti protein, lipid, mRNA, dan miRNA.⁶⁶ Penelitian menunjukkan bahwa miR-216 dan miR-21 dalam *MSC-Exos* diketahui mampu mengPKBifkan jalur PI3K/PKB, dan menekan inflamasi untuk meningkatkan metabolisme glukosa pada pasien T2DM.⁶⁶



Gambar 2.3 Proses khas pembentukan, sekresi, dan pemindahan *MSC-Exos* dari sel donor ke sel penerima serta struktur *MSC-Exos* yang merupakan membran berlapis ganda yang mengandung protein fungsional, asam nukleat (mRNA, miRNA, lncRNA, dll.), dan lipid.⁶⁵

2.6 Pengaruh Exosome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (EH-MSCs) Terhadap Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1) dan Protein Kinase B (PKB) Pada Diabetes mellitus tipe 2

Hypoxia secara signifikan memengaruhi berbagai aspek biologis MSCs, termasuk viabilitas, proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan metabolisme. Ketika MSCs dikultur dalam kondisi *hypoxia* (kadar oksigen 1–10% O₂), terjadi peningkatan PKBivitas proliferasi dibandingkan dengan kultur dalam kondisi normoksia (21% O₂) sehingga terjadi peningkatan sensitivitas insulin melalui PKBivasi jalur PI3K/PKB, yang berperan penting dalam transduksi sinyal insulin. Durasi kultur juga menjadi fPKBor penting dalam optimalisasi kondisi *hypoxia*. Prekondisi minimal 2 hari diperlukan untuk meningkatkan efek kelangsungan hidup sel, sedangkan prekondisi 24 jam sudah menunjukkan manfaat terapeutik untuk aplikasi tertentu. Kultur selama 6-7 hari menunjukkan peningkatan laju proliferasi sel.⁶⁷ Penelitian menunjukkan bahwa *EH-MSCs* dapat meningkatkan

fosforilasi IRS1, yang merupakan adaptor kunci dalam sinyal insulin, sehingga memperbaiki respons metabolik sel terhadap insulin.^{15,68}

Selain itu, *hypoxia* juga mempengaruhi komposisi miRNA dalam *EH-MSCs*, yang dapat menargetkan gen-gen tertentu seperti IRS1, mengatur ekspresi dan PKBivitasnya. Misalnya, miR-150-5p yang diangkut oleh *EH-MSCs* dapat memodulasi ekspresi IRS1 pada makrofag penerima, mengubah plastisitas makrofag dan memodulasi respons inflamasi.⁶⁹ Dengan demikian, *EH-MSCs* tidak hanya berfungsi sebagai pengantar fPKBor pertumbuhan dan sitokin, tetapi juga sebagai mediator penting dalam regulasi jalur sinyal yang berkaitan dengan metabolisme glukosa dan inflamasi, memberikan wawasan baru untuk terapi berbasis *exosome* dalam pengobatan diabetes dan penyakit terkait metabolisme lainnya.^{62,70}

Pada kondisi *hypoxia*, *MSCs* menunjukkan peningkatan kemampuan proliferasi, kelangsungan hidup, dan migrasi melalui berbagai adaptasi seluler. Respons *hypoxia* ini terutama dimediasi melalui fPKBor yang diinduksi HIF yang mengatur ratusan gen yang terlibat dalam kelangsungan hidup dan fungsi sel. Prekondisi *hypoxia* terbukti meningkatkan karPKBeristik *MSCs* dalam beberapa aspek penting. Proliferasi sel meningkat melalui PKBivasi PrP C-dependent JAK2 dan STAT3, sementara kelangsungan hidup sel ditingkatkan melalui regulasi PKBivitas superoksida dismutase dan katalase. Kondisi *hypoxia* juga meningkatkan potensi diferensiasi kondrogenik dan produksi sekretom serta vesikel ekstraseluler (EVs).⁷¹

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Kerangka teori dalam penelitian ini dibangun berdasarkan konsep-konsep dan teori yang mendukung pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi IRS1 dan PKB pada T2DM. T2DM adalah penyakit metabolik yang ditandai oleh hiperglikemia kronis akibat resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas.¹ Resistensi insulin melibatkan gangguan jalur pensinyalan insulin, termasuk penurunan fosforilasi IRS1 dan penghambatan PKB. Aktivitas PKB, yang berujung pada gangguan metabolisme glukosa.³⁴ STZ adalah agen toksik yang sering digunakan untuk menginduksi kondisi diabetes pada model hewan. STZ menyebabkan kerusakan pada sel-sel beta pankreas, sehingga terjadi penurunan sekresi insulin. Akibatnya, tubuh mengalami kondisi hiperglikemia kronis. Hiperglikemia ini merupakan salah satu karakteristik utama T2DM yang dapat memicu serangkaian perubahan molekuler, termasuk inflamasi sistemik, stres oksidatif, dan resistensi insulin.⁷²

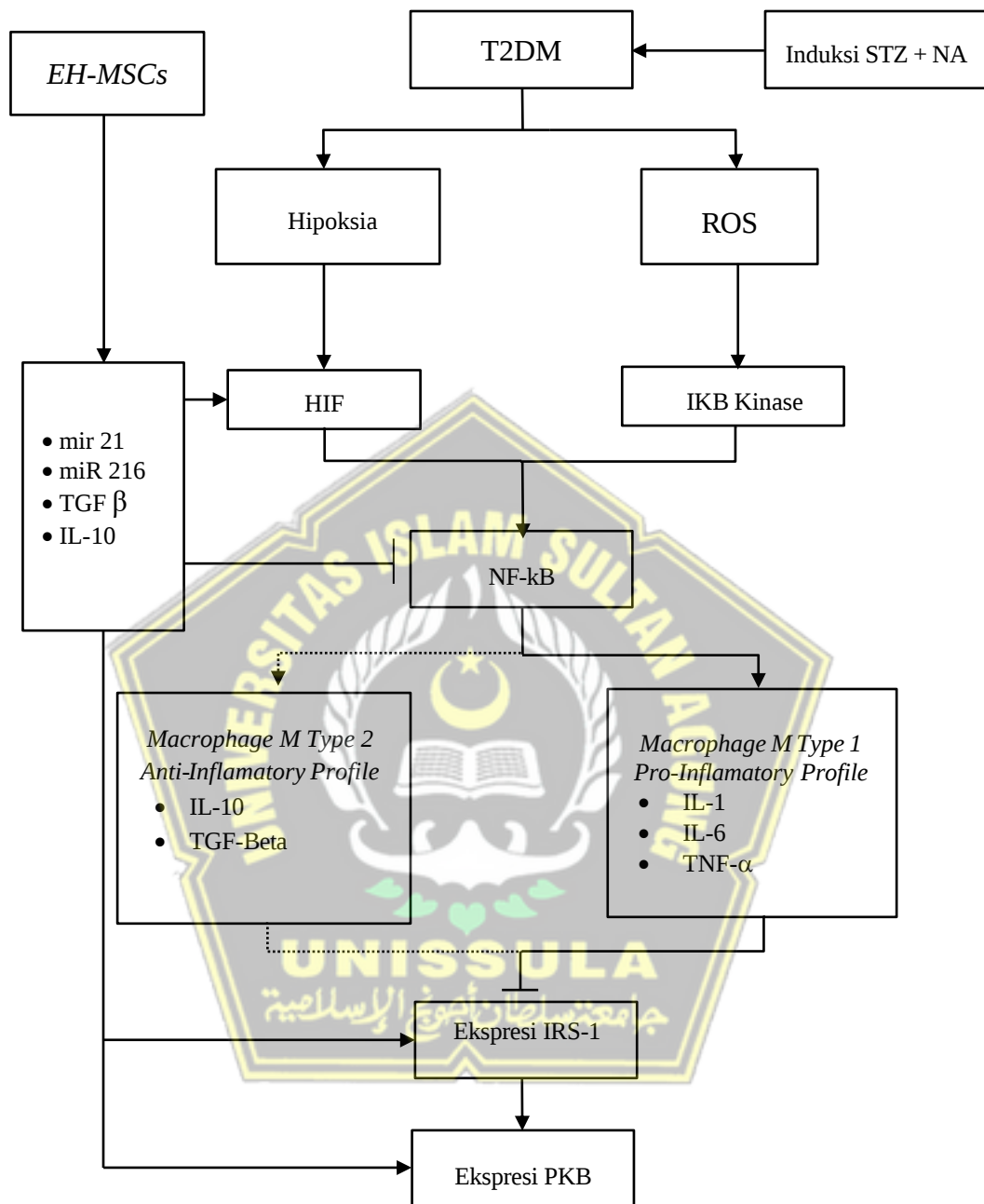
Pada T2DM, hiperglikemia meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), molekul yang bersifat reaktif dan dapat merusak komponen seluler seperti protein, DNA, dan lipid.⁷² ROS dapat mengaktifkan I κ B Kinase (IKK), molekul kunci dalam jalur inflamasi NF- κ B.⁷³ Akibatnya, NF- κ B teraktivasi dan masuk ke nukleus untuk menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi (seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6).

NF- κ B juga berperan dalam pematangan makrofag, menjadi makrofag pro-inflamasi (M1).⁷³

Dalam kondisi inflamasi, jaringan mengalami hipoksia lalu mengaktifkan HIF, sebuah faktor transkripsi yang merespons kondisi oksigen rendah dalam jaringan.⁷³ Aktivasi HIF menyebabkan peningkatan infiltrasi makrofag ke jaringan.⁷³ Dominasi makrofag M1 dalam jaringan adiposa menghasilkan mediator pro-inflamasi yang terus-menerus memperparah disfungsi jaringan.³⁴ Sitokin pro-inflamasi dari makrofag M1, seperti TNF- α dan IL-6, menghambat aktivitas IRS-1, komponen utama dalam jalur sinyal insulin, melalui peningkatan fosforilasi serin residu yang mengurangi efektivitas IRS1 dalam mengaktifkan PI3K-PKB yang penting untuk regulasi glukosa dan sensitivitas insulin.³⁴

EH-MSCs mengandung molekul bioaktif seperti miR-216 dan miR-21 yang dapat memodulasi pensinyalan seluler NF- κ B dan PI3K-PKB yang selanjutnya terjadi peningkatan ekspresi IRS1 dan memodulasi PKB sehingga dapat memperbaiki resistensi insulin, dan mengurangi stres oksidatif serta inflamasi.^{66,74,75} *EH-MSCs* juga dapat memicu polarisasi makrofag anti-inflamasi M2.⁷⁶ Makrofag M2 menghasilkan:

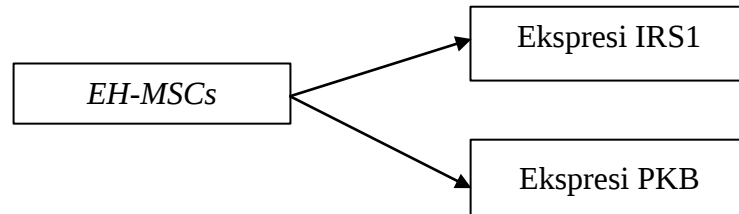
- IL-10 (*Interleukin-10*): Sitokin antiinflamasi yang menekan aktivitas NF- κ B.⁷⁷
- TGF- β (*Transforming Growth Factor-Beta*): Molekul yang mendukung perbaikan jaringan.⁷⁷



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 IRS1 pada tikus Wistar model diabetes mellitus tipe 2.
2. Terdapat pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi PKB pada tikus Wistar model diabetes mellitus tipe 2.

BAB IV

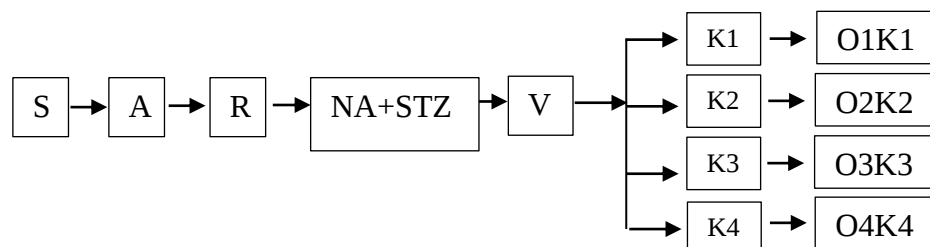
METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental *in vivo* dengan pendekatan *post-test only control group design* untuk menganalisa pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi IRS1 dan PKB pada model tikus Wistar yang diinduksi diabetes melitus tipe 2 menggunakan Streptozotocin-Nicotinamide. Model diabetes ini dipilih karena dapat mereplikasi kondisi hiperglikemia moderat dan resistensi insulin, yang relevan dengan patofisiologi diabetes melitus tipe 2 pada manusia.

Tikus percobaan dibagi menjadi empat kelompok perlakuan untuk mengidentifikasi pengaruh perlakuan yang berbeda. Kelompok kontrol negatif (K1) hanya menerima induksi Streptozotocin-Nicotinamide dan diberikan injeksi NaCl 0,9% sebanyak 300 µL secara intravena, 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 diabetes tipe 2 dan digunakan sebagai pembanding efektivitas *EH-MSCs*. Kelompok perlakuan pertama (K3) terdiri dari tikus yang diinduksi Streptozotocin-Nicotinamide dan menerima *EH-MSCs* dengan dosis 250 µL secara intravena yang diberikan pada hari ke-15, 18, dan 21 setelah induksi. Sementara itu, kelompok perlakuan kedua (K4) menerima *EH-MSCs* dengan dosis yang

lebih tinggi, yaitu 500 μ L secara intravena, pada wPKBu yang sama seperti K3.



Gambar 4.1 Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:

S: Sampel

A: Aklimatisasi

R: Randomisasi

V: Validasi diabetes dengan pengukuran kadar gula darah 90-130 mg/dL, tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 jika gula darah puasa ≥ 200 mg/dL

K1: Tikus diabetes dengan NaCl 0,9% intravena

K2: Tikus diabetes dengan metformin oral 300mg/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 IRS1 dan PKB pada kelompok 1

O2K2: Observasi ekspresi IRS1 dan PKB pada kelompok 2

O3K3: Observasi ekspresi IRS1 dan PKB pada kelompok 3

O4K4: Observasi ekspresi IRS1 dan PKB 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,

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

Di mana n adalah jumlah tikus per kelompok, dan t adalah jumlah kelompok. Pada penelitian ini, digunakan 4 kelompok tikus, maka minimal 6 tikus per kelompok diperlukan, dengan total sampel sebanyak 24 tikus. Sampel ditambah 1 tiap kelompok untuk mengantisipasi dropout. Pada penelitian ini digunakan 7 tikus dalam satu kelompok dengan total 28 tikus secara keseluruhan.

4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

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

1. Seleksi Awal

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

2. Aklimatisasi

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

3. Pembagian Kelompok

Tikus secara acak dibagi menjadi 4 kelompok:

- Kelompok 1: Kelompok normal

Tikus diinduksi Streptozotocin-Nicotinamide dan injeksi NaCl 0,9% 300uL intravena selama 14 hari

- Kelompok 2: Kelompok control

Kelompok kontrol positif yaitu kelompok tikus dengan induksi Streptozotocin-Nicotinamide dengan pemberian Metformin peroral 300mg/kgBB/hari selama 14 hari.

- Kelompok 3: *EH-MSCs*

Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok tikus dengan induksi Streptozotocin-Nicotinamide 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 Streptozotocin-Nicotinamide 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 (PKBif, nafsu makan baik, bulu bersih, dan tidak menunjukkan tanda-tanda penyakit).

4.2.5. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang tidak menunjukkan kadar glukosa darah puasa ≥ 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 inPKBivitas 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:

- Kadar IRS1: Diukur pada jaringan pankreas menggunakan metode RT-PCR untuk mengevaluasi pengaruh perlakuan terhadap regulasi jalur sinyal insulin dan respon adaptif terhadap hipoksia, yang mencerminkan efektivitas modulasi metabolisme glukosa dan sensitivitas insulin.
- Ekspresi PKB: Diukur pada jaringan pankreas menggunakan metode RT-PCR untuk menganalisis efek perlakuan terhadap PKBivasi jalur sinyal molekuler terkait

regulasi metabolisme energi dan peningkatan efektivitas transduksi sinyal insulin.

4.3.3. Variabel Prakondisi

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

4.3.4. Variabel Terkendali

Kondisi Lingkungan berupa aklimatisasi suhu 22–25°C, kelembapan 50–60%, siklus cahaya 12 jam terang/gelap, berat badan tikus, dan usia tikus.

4.3.5. Definisi Operasional

1. Pemberian *EH-MSCs*

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

Unit: Mikrogram (µg) per kilogram berat badan tikus.

Skala: Rasio

2. Ekspresi IRS1

IRS1 adalah protein adaptor utama dalam jalur sinyal insulin yang berperan sebagai indikator kemampuan sel untuk merespons insulin. Dalam penelitian ini, ekspresi IRS1 diukur pada jaringan pankreas menggunakan metode RT-PCR sebagai representasi PKBivitas jalur sinyal insulin, yang mempengaruhi metabolisme glukosa dan sensitivitas insulin.

Unit: CT value

Skala: Rasio

3. Ekspresi PKB

PKB adalah protein kinase yang menjadi elemen kunci dalam jalur PI3K/PKB yang berperan dalam regulasi metabolisme energi, proliferasi sel, dan kelangsungan hidup sel. Ekspresi PKB diukur pada jaringan pankreas menggunakan metode RT-PCR untuk mengevaluasi efektivitas perlakuan dalam meningkatkan transduksi sinyal insulin dan mendukung fungsi metabolik yang optimal.

Unit: Ct value

Skala: Rasio.

4.4 Bahan Penelitian

1. Tikus Wistar jantan usia 8–10 minggu, berat badan 200–250 gram.
2. Aquades
3. Streptozotocin (STZ)
4. Nicotinamide

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

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1. Perolehan *Ethical Clearance*

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

4.6.2 Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2

1. STZ dan NA masing-masing dilarutkan dalam larutan saline steril (0,9% NaCl) atau buffer sitrat (pH 4,5) untuk menjaga stabilitas larutan.
2. Larutan dibuat segar dan digunakan segera untuk mencegah degradasi kimia STZ maupun NA.
3. Larutan STZ dan NA diberikan dalam volume kecil (1-2 mL) untuk memastikan penyebaran efektif.
4. Tikus Wistar sehat (8 minggu, berat 200-250 gram) diinjeksi secara intraperitoneal dengan NA dengan dosis 65 mg/kg berat badan.
5. Setelah 15 menit, STZ diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 45 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 ≥ 135 mg/dL dianggap berhasil diinduksi diabetes.

4.6.3 Uji Validasi MSCs

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

4.6.4 Isolasi EH-MSCs

1. Preparasi *Condition Medium* dengan cara medium kultur dari passage 4 dikumpulkan dan disentrifugasi pada $300\times g$ 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+.

4.6.5 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.

4.6.6 Analisis Ekspresi IRS1 dan PKB

1. Ekspresi mRNA dari IRS1 dan PKB 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), 0,6 µl primer spesifik untuk masing-masing gen target (IRS1 dan PKB), baik forward maupun reverse, 8,3 µl Nuclease-Free Water.

3. Produk PCR yang dihasilkan dianalisis menggunakan qRT-PCR dengan sistem illumine untuk mendeteksi ekspresi IRS1 dan PKB.
4. Data ekspresi dianalisis dalam bentuk rasio peningkatan relatif terhadap housekeeping gene menggunakan software EcoStudy untuk memastikan keakuratan hasil pengukuran.

4.7 Analisis Data

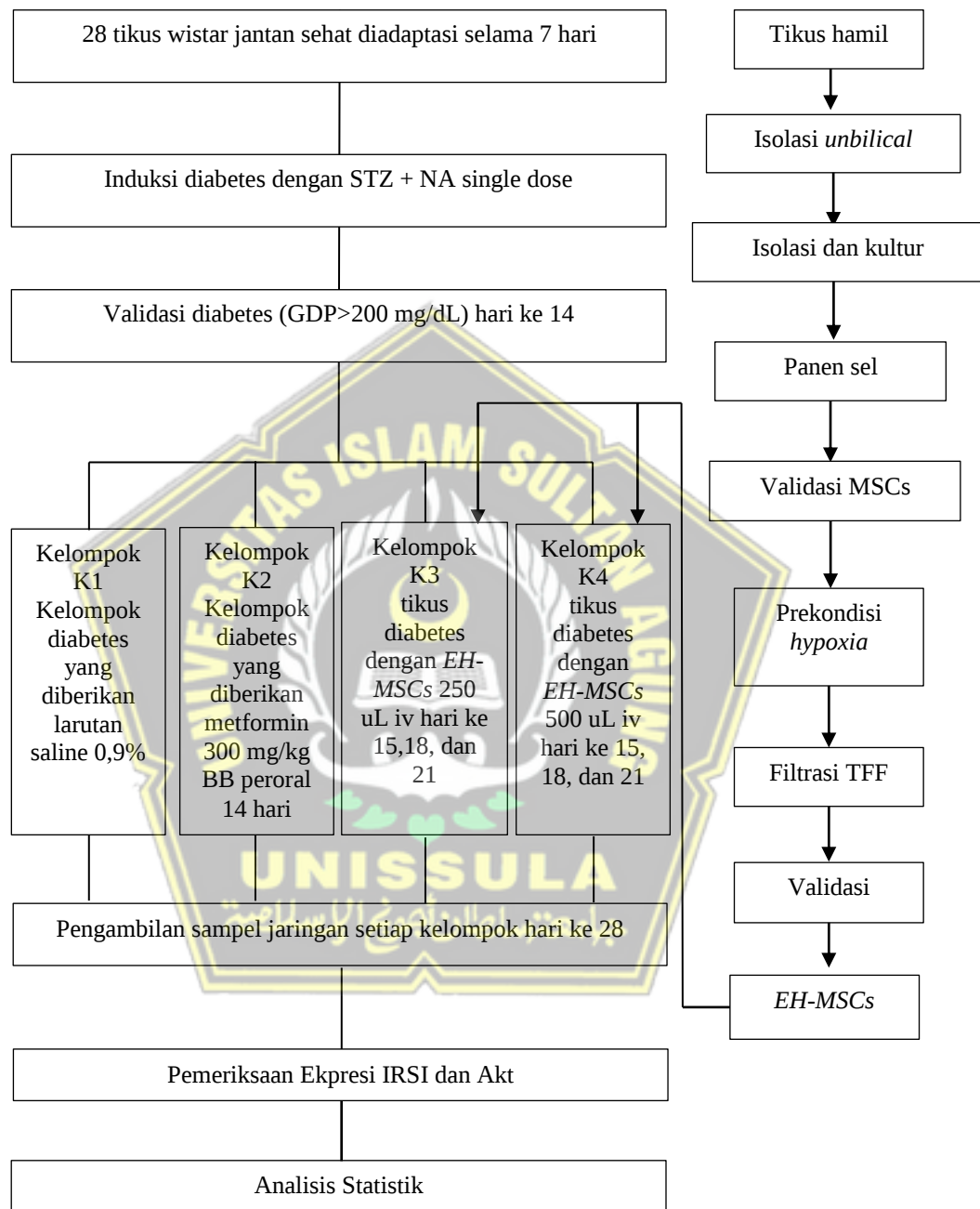
Data yang diperoleh dari penelitian dianalisis dengan metode statistik sebagai berikut:

1. Uji Normalitas: Data diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk memastikan bahwa data berdistribusi normal.
2. Uji Homogenitas: Homogenitas data diuji dengan Levene's test.
3. Analisis Statistik: Perbandingan 4 kelompok
 - Jika data berdistribusi normal: Menggunakan uji ANOVA one-Way
 - Jika data tidak berdistribusi normal: Menggunakan Kruskal-Wallis Test (alternatif non-parametrik)
4. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan software statistik, dan nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan.
 - Jika ANOVA one-Way signifikan, lanjutkan uji post hoc Tukey untuk menilai perbedaan spesifik antar kelompok
 - Jika Kruskal-Wallis Test signifikan, lanjutkan uji post hoc Dunn's untuk membandingkan pasangan kelompok
5. Interpretasi Data: data dianalisis untuk menguji hipotesis penelitian:

- Apakah pemberian *EH-MSCs* dapat meningkatkan ekspresi IRS1 secara signifikan dibandingkan kontrol.
- Apakah pemberian *EH-MSCs* dapat meningkatkan ekspresi PKB secara signifikan dibandingkan kontrol.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.9 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research*. Penelitian rencana akan mulai dilakukan pada Mei - Agustus 2025



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

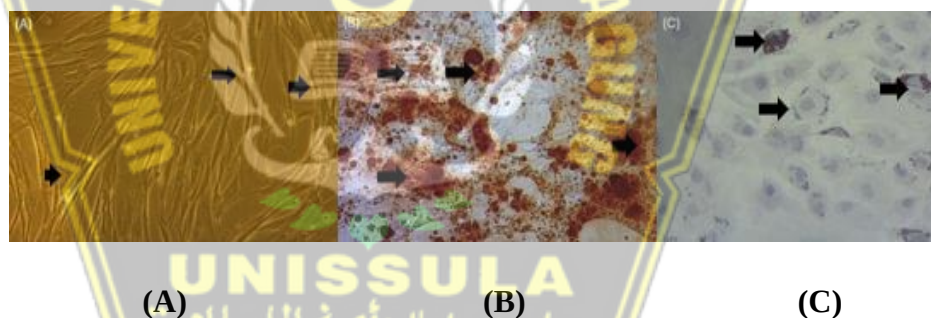
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh EH-MSCs terhadap ekspresi IRS1 dan PKB pada tikus wistar model diabetes melitus tipe 2 dibandingkan dengan kontrol. Studi eksperimental ini dilakukan secara *in vivo* dengan desain *Post-test Only Control Group* dilakukan selama bulan Mei-Juli 2025 di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang.

Penelitian dengan hewan coba tikus Wistar jantan berumur 8-10 minggu sebanyak 28 ekor dengan model diabetes mellitus tipe 2 dengan kriteria tikus sehat, Usia berkisar 2-3 bulan, dan berat badan 200-250 gram. Tikus jantan yang sesuai kriteria dilakukan pemeriksaan kadar gula darah sebelum induksi STZ-NA secara intraperitoneal. Tikus yang telah diinduksi kemudian randomisasi dan dibagi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif K1 (tikus diabetes dengan pemberian injeksi NaCl 0,9%300 μ L iv pada hari ke 15, 18, dan 21, kelompok kontrol positif K2 yang diberi metformin 300 mg/kgBB per oral selama 14 hari, kelompok K3 perlakuan injeksi intravena EH-MSCs dengan dosis 250 uL hari ke-15, 18, dan 21 , dan kelompok K4 perlakuan injeksi intravena tikus diabetes dengan EH-MSCs dosis 500 uL hari ke-15, 18, dan 2. Hasil penelitian ini sebagai berikut.

5.1 Hasil Penelitian

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

MSCs didapatkan dari jaringan tali pusat tikus bunting usia 21 hari yang kemudian dilakukan kultur pada medium khusus di Labtoratorium *Stem Cell and Cancer Research*. Selanjutnya, hasil kultur MSCs yang telah melewati pasase ke-4 dikondisikan hipoksia didapatkan MSCs yang melekat dan mencapai konfluensi lebih dari 80% dan menunjukkan gambaran sel berupa *spindle-shape* saat diamati dibawah 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



Gambar 5.1 (A) Validasi MSCs dengan pembesaran 40x didapatkan gambaran morfologi sel MSC berbentuk *spindle-like cell* setelah pasase ke 4 MSC (B) Gambaran deposit kalsium pada diferensiasi osteosit terlihat sebagai warna merah dengan pewarnaan *Alizarin Red* perbesaran 40x (C) Gambaran droplet lemak sebagai warna merah di sekitar sel setelah pewarnaan *Oil Red O Dye* pada perbesaran 40x

Uji diferensiasi dilakukan sebagai salah satu metode validasi MSCs dengan cara mengkultur MSCs hipoksia dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi sel osteosit dan adipogenik. Metode validasi lain yang

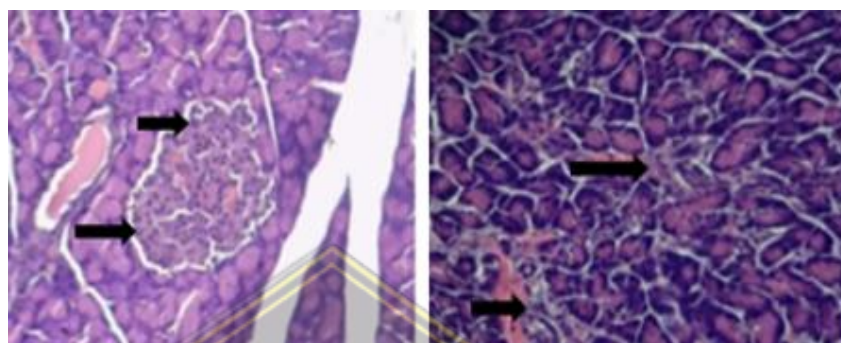
dilakukan adalah dengan menggunakan *flowcytometry* untuk menunjukkan kemampuan dalam mengekspresikan *surface marker* khusus, hasil menunjukkan ekspresi negatif CD45 (0.4%) dan CD31 (3.92%) serta ekspresi positif CD90 (98.7%) dan CD29 (99.9%). MSCs hipoksia selanjutnya dilakukan filtrasi dengan TFF untuk memperoleh *EH-MSCs* yang mengandung *soluable molecule*, *growth factor* dan berbagai miRNA. Hasil filtrasi didapatkan konsentrasi *EH-MSCs* sebanyak 7.5 ug/mL. *EH-MSCs* kemudian divalidasi melalui *surface marker* CD9 (9.1%).

5.1.2 Validasi Diabetes Melitus Tipe 2 pada Tikus Wistar Model

Diabetes Melitus Tipe 2

Subjek penelitian ini adalah tikus Wistar jantan model diabetes melitus tipe 2 yang diinduksi STZ dan NA masing-masing dilarutkan dalam larutan saline steril (0,9% NaCl) atau buffer sitrat (pH 4,5). Validasi T2DM dilakukan dengan memeriksa kadar gula darah sebelum induksi dan kadar gula darah puasa setelah induksi. Pada penelitian ini didapatkan hasil kadar gula darah menunjukkan hasil 111 mg/dL dan hasil gula darah puasa menunjukkan 334 mg/dL. Pemeriksaan sampel jaringan sebagai pemeriksaan mikroskopik juga dilakukan untuk mengetahui jaringan pankreas tikus Wistar model T2DM, didapatkan gambaran degenerasi sitoplasma, hilangnya granula sel dan bentuk kontur pulau langerhans yang tidak beraturan pada jaringan pankreas

tikus yang telah diinduksi STZ. Hal ini membuktikan bahwa tikus Wistar telah mengalami T2DM.



(A)

(B)

Gambar 5.2 Validasi Diabetes. (A) Histopatologi jaringan pankreas dengan pewarnaan H&E pembesaran mikroskopik 400x pada tikus sehat menunjukkan pulau Langerhans yang normal. Terlihat batas pulau yang jelas, inti sel berwarna ungu gelap dan sitoplasma sel yang tergranulasi berwarna merah muda, dan jaringan eksokrin di sekitarnya tampak padat dan teratur. (B) Histopatologi jaringan pankreas tikus diabetes pewarnaan H&E pembesaran mikroskopik 400x. Pulau Langerhans menunjukkan tanda-tanda degenerasi 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

Hasil analisis Pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi IRS1 pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 dianalisis pada hari ke-30

dengan nilai K1 1.12 ± 0.94 , K2 1.41 ± 1.20 , K3 3.03 ± 3.72 dan K4 2.52 ± 2.35 (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, dan Uji *Kruskal Wallis* pada Ekspresi IRS1

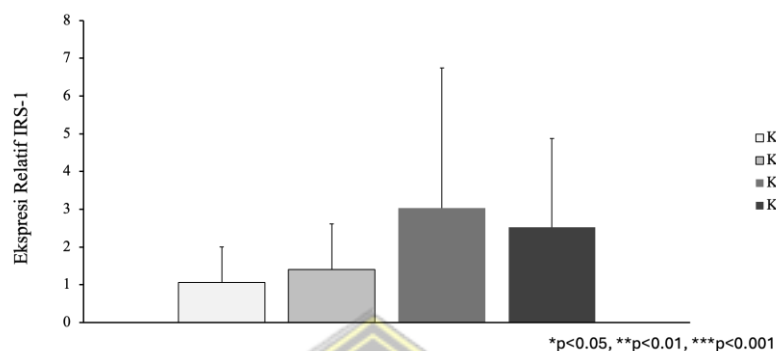
Variabel	Kelompok				Sig. (p)
	K1 n=7	K2 n=7	K3 n=7	K4 n=7	
Ekspresi IRS1					
Mean	1.12 ± 0.94	1.41 ± 1.20	3.03 ± 3.72	2.52 ± 2.35	
Shapiro Wilk	0.66*	0.47*	0.04	0.36*	
Kruskal Wallis					0.787

* $p > 0.05$ Normal ** $p < 0.05$ Signifikan

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi IRS1 tertinggi pada kelompok dengan perlakuan *EH-MSCs* yaitu kelompok K3 sebesar 3.03 ± 3.72 dan diikuti oleh kelompok K4 sebesar 2.52 ± 2.35 . Ekspresi IRS1 terendah terdapat pada kelompok K1 yaitu kelompok kontrol negatif sebesar 1.12 ± 0.94 . Rerata ekspresi IRS1 kemudian dilakukan uji normalitas dengan uji *shapiro wilk* dan didapatkan data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$).

Berdasarkan data diatas didapatkan hasil bahwa pengobatan konvensional seperti metformin maupun *EH-MSCs* dengan dosis 500 μ L dan 250 μ L tidak berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi IRS1 secara signifikan meskipun masing-masing kelompok menunjukkan perbedaan ekspresi IRS1. Nilai ekspresi IRS1 paling tinggi ditunjukkan

oleh kelompok K3 perlakuan *EH-MSCs* dengan dosis 500 μ L seperti yang ditampilkan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Pola Peningkatan Ekspresi IRS1

5.1.3 Interpretasi Ekspresi *Protein Kinase B* (PKB)

Hasil analisis Pengaruh *EH-MSCs* terhadap ekspresi PKB pada tikus Wistar model diabetes melitus tipe 2 dianalisis pada hari ke-30 dengan nilai K1 1.09 ± 1.01 , K2 1.55 ± 1.62 , K3 2.47 ± 0.92 dan K4 1.65 ± 1.18 (Tabel 5.4).

Tabel 5.4 Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan *Kruskal Wallis* pada Ekspresi PKB

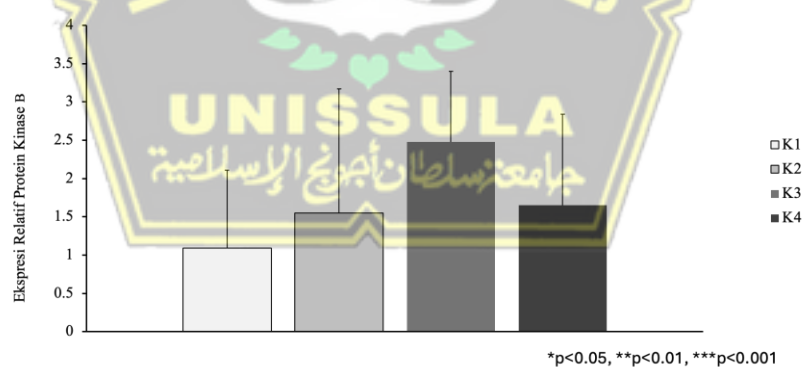
Variabel	Kelompok				Sig. (p)
	K1 n=7	K2 n=7	K3 n=7	K4 n=7	
Ekspresi PKB					
Mean	1.09±1.01	1.55±1.62	2.47±0.92	1.65±1.18	
Shapiro Wilk	0.67*	0.47*	0.95*	0.66*	
Kruskal Wallis					0.689*
					0.369

* $p > 0.05$ Normal * $p > 0.05$ Homogen * $p < 0.05$ Signifikan

Tabel 5.4 menunjukkan bahwa rerata ekspresi PKB tertinggi pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* yaitu kelompok K3 sebesar 2.47 ± 0.92 dan diikuti oleh kelompok K4 sebesar 1.65 ± 1.18 . Ekspresi

PKB terendah terdapat pada kelompok kontrol yaitu kelompok K1 sebesar 1.09 ± 1.01 dan K2 sebesar 1.55 ± 1.62 . Rerata ekspresi PKB pada semua kelompok berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ normal.

Berdasarkan data diatas didapatkan hasil bahwa pengobatan konvensional seperti metformin maupun *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi PKB secara signifikan meskipun masing-masing kelompok menunjukkan perbedaan ekspresi PKB seperti yang ditampilkan pada gambar 5.5 dimana nilai ekspresi PKB paling tinggi ditunjukkan oleh kelompok K3 perlakuan *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok K4 perlakuan *EH-MSCs* dengan dosis 500 μ L.



Gambar 5.5 Pola Peningkatan Ekspresi PKB

5.2 Pembahasan Hasil Penelitian

IRS1 memainkan peran utama dalam kaskade insulin dan memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks pensinyalan dengan reseptor pensinyalan intraseluler insulin.⁷⁸ Normalnya, setelah fosforilasi tirosin, IRS1

berinteraksi dengan subunit pengatur p85 dari PI3K yang menyebabkan aktivasi PKB.⁷⁸ Aktivasi PKB berikutnya menghasilkan peningkatan penyerapan glukosa, dan peningkatan sintesis glikogen dan protein.⁷⁹ Protein kinase B (PKB) adalah enzim utama yang terlibat dalam regulasi glukosa.⁷⁹ Maka itu penurunan fosforilasi tirosin pada IRS1 dan disfungsi aktivasi PKB yang tidak mencukupi dikaitkan dengan resistensi insulin.^{78,79} Inflamasi kronis yang terjadi akibat hiperglikemia menjadi salah satu kontributor terbesar terjadinya gangguan sinyal insulin yang menargetkan IRS1 dan jalur PKB.⁸⁰

Pada penelitian ini dilakukan analisa kemampuan *EH-MSCs* terhadap tikus Wistar model T2DM dalam memodulasi ekspresi IRS1 dan PKB. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa *EH-MSCs* memiliki kandungan molekul terlarut dan miRNA yang memiliki potensi terapeutik terutama pada penyakit yang melibatkan inflamasi. Hal tersebut memberi kesan bahwa *EH-MSCs* memiliki kemampuan untuk memodulasi inflamasi sehingga diharapkan dapat memperbaiki ekspresi IRS1 dan PKB pada kasus T2DM.

IRS1 merupakan mediator penting pada jalur pensinyalan insulin. Peningkatan fosforilasi serin pada IRS-1 berkorelasi pada resistensi insulin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengobatan konvensional seperti metformin maupun *EH-MSCs* dengan dosis 500 μ L dan 250 μ L tidak berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi IRS1 secara signifikan meskipun pada kelompok *EH-MSCs* menunjukkan hasil rerata nilai ekspresi IRS1 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Begitu pula pada hasil analisa

terhadap ekspresi Akt. Akt atau protein kinase B merupakan protein kinase spesifik serin/treonin yang memainkan peran penting dalam berbagai proses seluler, termasuk metabolisme pengambilan glukosa oleh insulin. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa pengobatan konvensional seperti metformin maupun *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L dan 500 μ L tidak berpengaruh dalam meningkatkan ekspresi Akt secara signifikan meskipun pada kelompok perlakuan *EH-MSCs* dengan dosis 250 μ L menunjukkan hasil rerata ekspresi Akt yang lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan *EH-MSCs* dengan dosis 500 μ L dan kelompok kontrol.

Pada penelitian sebelumnya, *MSCs* dapat meregulasi IRS1 dan Akt melalui berbagai mekanisme seperti meningkatkan fosforilasi IRS1, menekan inflamasi, meningkatkan polarisasi makrofag M2 anti-inflamasi hingga menurunkan ROS yang cukup berpengaruh pada jalur pensinyalan insulin.^{81,82} Berdasarkan hasil studi tersebut, terdapat banyak mekanisme yang dapat dikelola *EH-MSCs* agar dapat meningkatkan IRS1 dan Akt, namun beberapa studi lain juga menyatakan bahwa masih banyak faktor lain yang menjadi keterbatasan *EH-MSCs* dalam meningkatkan ekspresi IRS1 dan Akt. Salah satu faktor yang cukup berpengaruh adalah genetik, perkembangan resistensi insulin pada jaringan target insulin melibatkan faktor genetik dan faktor yang didapat.⁸³ Individu dengan risiko genetik untuk T2DM cenderung mengembangkan resistensi insulin beberapa tahun sebelum intoleransi glukosa.⁸³ Pada penelitian ini, pernyataan tersebut dapat dikaitkan dengan hewan coba, meskipun hewan coba telah menunjukkan karakteristik model

diabetes dan memberikan banyak informasi tentang mekanisme diabetes, model tersebut tidak dapat menjawab semua pertanyaan terkait perkembangan diabetes dalam jaringan manusia dan hubungan antara resistensi insulin, diabetes dan disfungsi sel β .⁸³

Faktor lain yang mempengaruhi yaitu dosis yang disuntikkan sebaiknya berkorelasi dengan kadar C-peptide dan HbA1c, metode pemberian sel dimana infus intrapankreas menunjukkan peningkatan yang lebih baik pada parameter laboratorium dibandingkan intravena dan diketahui bahwa *MSC-exos* dapat membawa beragam molekul bioaktif, termasuk miRNA, protein, dan lipid.^{84,85} Tergantung pada muatannya, *MSC-exos* dapat memiliki efek yang menguntungkan atau merugikan pada pensinyalan insulin termasuk fungsi IRS1 dan Akt, secara umum *MSC-Exos* dapat mencetuskan aktivitas pro dan anti diabetes.^{85,86} Sebagai contoh, miR-21 dan miR-216 banyak ditemukan pada *EH-MSCs*, ekspresi berlebihannya dapat meningkatkan fosforilasi yang diinduksi insulin di Akt dan translokasi GLUT4 pada jalur pensinyalan PI3K/Akt.^{87,88} Muatan lain pada *EH-MSCs* dapat meningkatkan regenerasi dan fungsi sel β melalui peningkatan tingkat ekspresi Pdx-1, TGF- β , Smad2, dan Smad3.^{85,86} Namun *EH-MSCs* dengan muatan yang berbeda dapat mencetuskan peningkatan metabolisme glukosa dan lipid.^{85,86} Maka itu diperlukan perlakuan lebih lanjut yang dapat meningkatkan muatan spesifik pada *EH-MSCs* untuk menyesuaikan kebutuhan atau kondisi penyakit tertentu.

5.3 Keterbatasan Penelitian

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

1. Model hewan terbatas pada tikus Wistar Dimana penelitian ini hanya menggunakan model hewan tikus wistar Jantan yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2, sehingga hasilnya belum tentu dapat digeneralisasi ke spesies lain, termasuk manusia
2. Durasi perlakuan yang relative singkat dimana waktu perlakuan pemberian exosome hypoxia MDCs relative singkat dan mungkin belum cukup untuk melihat efek jangka Panjang terhadap ekspresi IRS1 dan PKB secara sistemik.
3. Ukuran sampel yang relatif kecil ($n=7$ per kelompok) dapat menurunkan kekuatan statistik dan membuat hasil lebih rentan terhadap *outlier*, yang pada akhirnya menyebabkan variasi data yang besar dan deviasi standar yang tinggi.
4. Potensi *human error* dalam tahap laboratorium. *Handling sampel*, atau kualitas RNA dan *housekeeping gene* yang kurang stabil, juga dapat memperburuk kualitas data dan validitas hasil dari RT-qPCR

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemberian *EH-MSCs* tidak berpengaruh signifikan terhadap ekspresi IRS1 pada Tikus Galur Wistar model diabetes melitus tipe 2.
2. Tidak terdapat pengaruh signifikan pemberian *EH-MSCs* terhadap ekspresi PKB pada Tikus Galur Wistar model diabetes melitus tipe 2 pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.

6.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan dilakukan dengan :

1. Uji pada model hewan lain atau uji klinis awal pada manusia disarankan untuk melanjutkan penelitian ini dengan uji pre klinis pada hewan besar atau uji klinis fase awal pada manusia untuk melihat efektivitas dan keamanan *EH-MSCs* dalam konteks terapi diabetes melitus tipe 2
2. Perluasan parameter biokimia dan histologis dengan menyertakan parameter metabolik lain seperti kadar glukosa darah, insulin plasma, profil lipid, dan analisis histopatologi pankreas, hati dan jaringan adiposa.
3. Jumlah sampel dapat disarankan yang lebih besar guna meningkatkan kekuatan statistik dan mengurangi pengaruh outlier didalam penelitian ini
4. Validasi laboratorium perlu ditingkatkan dengan memastikan kualitas

RNA yang baik, pemilihan housekeeping gene yang stabil, serta penerapan standar operasional prosedur (SOP) yang lebih ketat dalam setiap tahapan RT-qPCR.



DAFTAR PUSTAKA

1. Webber S. *International Diabetes Federation*. Vol 102.; 2013. doi:10.1016/j.diabres.2013.10.013
2. Huang X, Liu G, Guo J, Su ZQ. The PI3K/PKB pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci*. 2018;14(11):1483-1496. doi:10.7150/IJBS.27173
3. White MF. Regulating insulin signaling and β -cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(7):725-737. doi:10.1139/Y06-008
4. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2010;25(2):119-129. doi:10.3904/kjim.2010.25.2.119
5. Soelistijo S. Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021. *Global Initiative for Asthma*. Published online 2021:46.
6. 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
7. 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
8. Yang M, Chen J, Chen L. The roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in diabetes mellitus and its related complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13(October):1-16. doi:10.3389/fendo.2022.1027686
9. Yuan N, Ge Z, Ji W, Li J. Exosomes Secreted from Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Prevent Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head by Promoting Angiogenesis in Rats. *Biomed Res Int*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/6655225

10. Laia B, Ginting RIB, Zebua JK, Sunarti. FPKBor-fPKBor yang mempengaruhi hambatan diet pada pasien diabetes melitus tipe 2. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*. 2023;5(1):171-178.
11. Laila S, Veronika E. FPKBor yang Berhubungan dengan Diabetes Melitus Tipe 2. *Surya Medika: Jurnal Ilmiah Ilmu Keperawatan dan Ilmu Kesehatan Masyarakat*. 2024;19(1):18-26. doi:10.32504/sm.v19i01.992
12. Dinas Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar. *Diabetes Mellitus*. Published online 2013:87-90. doi:1 Desember 2013
13. Wahidin M, Achadi A, Besral B,. Projection of diabetes morbidity and mortality till 2045 in Indonesia based on risk factors and NCD prevention and control programs. *Sci Rep*. 2024;14(1):1-17. doi:10.1038/s41598-024-54563-2
14. Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O. PI3K/PKB, MAPK and AMPK signalling: Protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Rev Mol Med*. 2012;14(January). doi:10.1017/S1462399411002109
15. 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
16. Susanti Vinski D, Cinta Vinski Borneo N. Therapeutic of Mesenchymal Stem Cells in Diabetes. *Journal of World Science*. 2023;2(11):1867-1884. doi:10.58344/jws.v2i11.497
17. Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Camacho-Cardenosa M, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Casado-Díaz A. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J Stem Cells*. 2022;14(7):453-472. doi:10.4252/wjsc.v14.i7.453
18. Shalaby MS, Abdel-Reheim ES, Almanaa TN, et al. 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

19. Y. Khalil D, H. Hussein R, M. El-Kholy W. ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-APOPTOTIC THERAPEUTIC EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELLS-DERIVED EXOSOMES ON THE PANCREAS OF STREPTOZOTOCIN-DIABETIC RATS. *Int J Adv Res (Indore)*. 2024;12(08):1188-1199. doi:10.21474/IJAR01/19362
20. Aierken A, Li B, Liu P,. Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of type II diabetes mellitus via the PI3K/PKB signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1). doi:10.1186/S13287-022-02832-0,
21. Chen G, Fan XY, Zheng XP, Jin YL, Liu Y, Liu SC. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance via PTEN-mediated crosstalk between the PI3K/PKB and Erk/MAPKs signaling pathways in the skeletal muscles of db/db mice. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):401. doi:10.1186/S13287-020-01865-7
22. Watad ShimaahH, Barakat N, Nassr A, Zahran F. Protective effects of *Balanites aegyptiaca* extract, MSCs and Exosome against Diabetic nephropathy induced in male albino rats. *Biochemistry Letters*. 2023;19(1):64-77. doi:10.21608/BLJ.2023.314430
23. Albeltagy RS, Hussein MM, Alazzouni AS,. Anti-Diabetic Effects of Metformin Nanoemulsion and Cell-Based Therapy on the Insulin Signaling Pathway (IRS1/PKB) and Apoptotic Related Genes in Type 2 Diabetic Rat Model. *Egypt Acad J Biol Sci C Physiol Mol Biol*. 2021;13(1):159-172. doi:10.21608/EAJBSC.2021.178255
24. Zheng T, Li S, Zhang T,. Exosome-shuttled miR-150–5p from LPS-preconditioned mesenchymal stem cells down-regulate PI3K/PKB/mTOR pathway via Irs1 to enhance M2 macrophage polarization and confer protection against sepsis. *Front Immunol*. 2024;15:1397722. doi:10.3389/FIMMU.2024.1397722/FULL
25. 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

26. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S,. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6275. doi:10.3390/ijms21176275
27. Westman EC. Type 2 Diabetes Mellitus: A Pathophysiologic Perspective. *Front Nutr.* 2021;8(August):1-5. doi:10.3389/fnut.2021.707371
28. Lu X, Xie Q, Pan X,. 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
29. Ojo OA, Ibrahim HS, Rotimi DE, Ogunlakin AD, Ojo AB. Diabetes mellitus: From molecular mechanism to pathophysiology and pharmacology. *Med Nov Technol Devices.* 2023;19(June):100247. doi:10.1016/j.medntd.2023.100247
30. Ojo OA, Ibrahim HS, Rotimi DE, Ogunlakin AD, Ojo AB. Diabetes mellitus: From molecular mechanism to pathophysiology and pharmacology. *Med Nov Technol Devices.* 2023;19:100247. doi:10.1016/J.MEDNTD.2023.100247
31. DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009;58(4):773-795. doi:10.2337/db09-9028
32. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2010;1(3):68. doi:10.4239/wjd.v1.i3.68
33. Hædersdal S, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(2):217-239. doi:10.1016/j.mayocp.2017.12.003
34. Falasca M, Maffucci T, Acosta-Martinez M, Cabail MZ. The PI3K/PKB Pathway in Meta-Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 15330. 2022;23(23):15330. doi:10.3390/IJMS232315330
35. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L,. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1(July):1-23. doi:10.1038/nrdp.2015.19

36. Mellitus D, Rumah D, Konawe S. FPKBor-FPKBor yang Berhubungan Dengan Kejadian Penyakit Diabetes Mellitus Tipe II Pada Pasien Rawat Jalan di Rumah Sakit Konawe Klasifikasi diabetes melitus (DM), Diabetes Association (ADA) dan World Lebih lanjut , data dari Laporan Gizi Global Menuru. 2024;3(3):202-213.
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. Schmitz-Peiffer C, Whitehead JP. IRS-1 Regulation in Health and Disease. *IUBMB Life*. 2003;55(7):367-374. doi:10.1080/1521654031000138569
39. Kovacs P, Hanson RL, Lee Y ho,. in Type 2 Diabetes in Pima Indians. *Clinical Diabetes*. Published online 2003:3005-3009.
40. Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 2011;10(11):1750. doi:10.4161/CC.10.11.15824
41. Machado-Neto JA, Fenerich BA, Rodrigues Alves APN,. Insulin substrate receptor (IRS) proteins in normal and malignant hematopoiesis. *Clinics*. 2018;73. doi:10.6061/CLINICS/2018/E566S
42. Adam Lassak, a, b Mathew Dean, a B, Dorota Wyczzechowska B, Anna Wilk, a, b E,. Molecular and Structural Traits of Insulin Receptor Substrate 1/LC3 Nuclear Structures and Their Role in Autophagy Control and Tumor Cell Survival. *Mol Cell Biol*. 2017;38(10):1-23.
43. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR,. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 1991;352(6330):73-77. doi:10.1038/352073a0
44. Ye J, Zheng R, Wang Q,. Downregulating SOCS3 with siRNA ameliorates insulin signaling and glucose metabolism in hepatocytes of IUGR rats with catch-up growth. *Pediatr Res*. 2012;72(6):550-559. doi:10.1038/pr.2012.123

45. Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 2011;10(11):1750-1756. doi:10.4161/cc.10.11.15824
46. Peng J, He L. IRS posttranslational modifications in regulating insulin signaling. *J Mol Endocrinol*. 2018;60(1):R1-R8. doi:10.1530/JME-17-0151
47. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of PKB/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005;9(1):59-71. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x
48. Molinaro A, Becattini B, Mazzoli A,. Insulin-Driven PI3K-PKB Signaling in the Hepatocyte Is Mediated by Redundant PI3K α and PI3K β Activities and Is Promoted by RAS. *Cell Metab*. 2019;29(6):1400-1409.e5. doi:10.1016/j.cmet.2019.03.010
49. Shi X, Wang J, Lei Y, Cong C, Tan D, Zhou X. Research progress on the PI3K/PKB signaling pathway in gynecological cancer (Review). *Mol Med Rep*. Published online April 3, 2019. doi:10.3892/mmr.2019.10121
50. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB / PKB Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;4(9):1-4.
51. Wang S, Basson MD. Identification of functional domains in PKB responsible for distinct roles of PKB isoforms in pressure-stimulated cancer cell adhesion. *Exp Cell Res*. 2008;314(2):286-296. doi:10.1016/j.yexcr.2007.08.005
52. Weako J, Jang H, Keskin O, Nussinov R, Gursoy A. The structural basis of PKB PH domain interaction with calmodulin. *Biophys J*. 2021;120(10):1994-2008. doi:10.1016/j.bpj.2021.03.018
53. Huang X, Liu G, Guo J, Su ZQ. The PI3K/PKB pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci*. 2018;14(11):1483-1496. doi:10.7150/ijbs.27173
54. Xu N, Lao Y, Zhang Y, Gillespie DA. PKB: A Double-Edged Sword in Cell Proliferation and Genome Stability. *J Oncol*. 2012;2012:1-15. doi:10.1155/2012/951724

55. Taheri R, Mokhtari Y, Yousefi A, Bashash D. The PI3K/PKB signaling axis and type 2 diabetes mellitus (T2DM): From mechanistic insights into possible therapeutic targets. *Cell Biol Int*. 2024;48(8):1049-1068. doi:10.1002/cbin.12189
56. Feng Y, Ren Y, Zhang X,. Metabolites of traditional Chinese medicine targeting PI3K/PKB signaling pathway for hypoglycemic effect in type 2 diabetes. *Front Pharmacol*. 2024;15(May):1-24. doi:10.3389/fphar.2024.1373711
57. Wa R, Bradley M, Elliott T. Diabetes,. *Diabetes Metab Syndr Obes*. Published online 2014:55-64.
58. Brendan DM, Toker A. PKB/PKB Signaling: Navigating the Network Brendan. *Physiol Behav*. 2011;176(10):139-148. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.PKB/PKB
59. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I,. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
60. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019;8(8):886. doi:10.3390/cells8080886
61. 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
62. Jiao YR, Chen KX, Tang X,. Exosomes derived from mesenchymal stem cells in diabetes and diabetic complications. *Cell Death Dis*. 2024;15(4). doi:10.1038/s41419-024-06659-w
63. Guan YT, Xie Y, Li DS,. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord and decidua parietalis. *Mol Med Rep*. 2019;20(1):633-639. doi:10.3892/mmr.2019.10286

64. 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
65. Liang W, Han B, Hai Y, Sun D, Yin P. Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Intervertebral Disc Degeneration Treatment and Bone Repair and Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:833840. doi:10.3389/FCELL.2021.833840/ENDNOTE
66. Thomaïdou AC, Goulielmaki M, Tsintarakis A,. miRNA-Guided Regulation of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Umbilical Cord: Paving the Way for Stem-Cell Based Regeneration and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9189. doi:10.3390/IJMS24119189
67. Hashimoto T, Shibasaki F. Hypoxia-Inducible Factor as an Angiogenic Master Switch. *Front Pediatr.* 2015;3(April):1-15. doi:10.3389/fped.2015.00033
68. Lei LM, Lin X, Xu F,. Exosomes and Obesity-Related Insulin Resistance. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9(March):1-11. doi:10.3389/fcell.2021.651996
69. Zheng T, Li S, Zhang T,. Exosome-shuttled miR-150–5p from LPS-preconditioned mesenchymal stem cells down-regulate PI3K/PKB/mTOR pathway via Irs1 to enhance M2 macrophage polarization and confer protection against sepsis. *Front Immunol.* 2024;15(June):1-13. doi:10.3389/fimmu.2024.1397722
70. Abdulmalek OAAY, Husain KH, AlKhalifa HKAA, Alturani MMAB, Butler AE, Moin ASM. Therapeutic applications of stem cell-derived exosomes in radiation-induced lung injury. *Cancer Cell Int.* 2024;24(1):403. doi:10.1186/s12935-024-03595-9
71. Almeria C, Weiss R, Roy M,. 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

72. Singh R, Ashish A, Shah A, Shekhar Pandey S. Interaction between oxidative stress and diabetes: a mini-review. *J Diabetes Metab Disord Control*. 2020;7(2):58-61. doi:10.15406/JDMDC.2020.07.00201
73. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S,. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6275. doi:10.3390/IJMS21176275
74. Yang S, Li J, Chen Y, et al. MicroRNA-216a promotes M1 macrophages polarization and atherosclerosis progression by activating telomerase via the Smad3/NF- κ B pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(7):1772-1781. doi:10.1016/j.bbadis.2018.06.016
75. 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
76. Song Y, Liang F, Tian W, Rayhill E, Ye L, Tian X. Optimizing therapeutic outcomes: preconditioning strategies for MSC-derived extracellular vesicles. *Front Pharmacol*. 2025;16. doi:10.3389/fphar.2025.1509418
77. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:816460. doi:10.1155/2015/816460
78. Caruso M, Ma D, Msallaty Z,. Increased Interaction With Insulin Receptor Substrate 1, a Novel Abnormality in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2014;63(6):1933-1947. doi:10.2337/DB13-1872
79. Miao R, Fang X, Wei J, Wu H, Wang X, Tian J. PKB: A Potential Drug Target for Metabolic Syndrome. *Front Physiol*. 2022;13:822333. doi:10.3389/FPHYS.2022.822333/XML/NLM
80. Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:508409. doi:10.1155/2015/508409
81. Gao S, Zhang Y, Liang K, Bi R, Du Y. Mesenchymal Stem Cells (MSCs): A Novel Therapy for Type 2 Diabetes. *Stem Cells Int*. 2022;2022:8637493. doi:10.1155/2022/8637493

82. Huang Q, Huang Y, Liu J. Mesenchymal Stem Cells: An Excellent Candidate for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol.* 2021;2021:9938658. doi:10.1155/2021/9938658
83. Elsayed AK, Vimalraj S, Nandakumar M, Abdelalim EM. Insulin resistance in diabetes: The promise of using induced pluripotent stem cell technology. *World J Stem Cells.* 2021;13(3):221. doi:10.4252/WJSC.V13.I3.221
84. Hamad FRB, Rahat N, Shankar K, Tsouklidis N. Efficacy of Stem Cell Application in Diabetes Mellitus: Promising Future Therapy for Diabetes and Its Complications. *Cureus.* 2021;13(2):e13563. doi:10.7759/CUREUS.13563
85. Ashrafizadeh M, Kumar AP, Aref AR, Zarrabi A, Mostafavi E. <p>Exosomes as Promising Nanostructures in Diabetes Mellitus: From Insulin Sensitivity to Ameliorating Diabetic Complications</p>. *Int J Nanomedicine.* 2022;17:1229-1253. doi:10.2147/IJN.S350250
86. Sood S, Devi S, Singh TG, Yadav N, Kumar P, Chatterjee A. Insulin Resistance and Obesity: Potential Therapeutic Approach. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance.* 2022;13(4):510-521. doi:10.25258/ijpqa.13.4.26
87. Natalicchio A, Montagnani M, Gallo M,. MiRNA dysregulation underlying common pathways in type 2 diabetes and cancer development: an Italian Association of Medical Oncology (AIOM)/Italian Association of Medical Diabetologists (AMD)/Italian Society of Diabetology (SID)/Italian Society of Endocrinology (SIE)/Italian Society of Pharmacology (SIF) multidisciplinary critical view. *ESMO Open.* 2023;8(3):101573. doi:10.1016/J.ESMOOP.2023.101573
88. Kou M, Huang L, Yang J,. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? *Cell Death & Disease* 2022 13:7. 2022;13(7):1-16. doi:10.1038/s41419-022-05034-x