

**PENGARUH OMENTOPLASTI DAN MSCs TERHADAP JUMLAH SEL
BETA PANKREAS DAN KADAR VEGF**
Studi Eksperimental Pada Tikus Obesitas yang Dilakukan *SleeveGastrectomy*

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Windy Listiana

30101800181

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2022

SKRIPSI

**PENGARUH OMENTOPLASTI DAN MSCs TERHADAP JUMLAH SEL BETA
PANKREAS DAN KADAR VEGF**

Studi Eksperimental Pada Tikus Obesitas yang Dilakukan *Sleeve Gastrectomy*

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Windy Listiana

30101800181

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal : 02 Februari 2022

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



dr. R. Vito Mahendra Ekasaputra
Sp.B.M.Si.Med.

Anggota Tim Penguji I



Dr.dr. Agung Putra M.Si.Med

Pembimbing II



dr. Arini Dewi Antari M.Biomed

Anggota Tim Penguji II



dr. Mohammad Akbaruddin Sholeh M.Si.

Semarang, 08 Maret 2022

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr.dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF.SH

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Windy Listiana

NIM : 30101800181

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi berjudul :

“PENGARUH OMENTOPLASTI DAN MSCs TERHADAP JUMLAH SEL BETA PANKREAS DAN KADAR VEGF (Studi Eksperimental Pada Tikus Obesitas yang Dilakukan SleeveGastrectomy)”

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Semarang, 9 Februari 2022
Yang menyatakan,



[Handwritten Signature]
Windy Listiana

PRAKATA

Dengan memanjatkan puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala limpah rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi ini yang berjudul “Pengaruh Omentoplasti dan MSCs Terhadap Jumlah Sel Beta Pankreas dan Kadar VEGF Studi Eksperimental Pada Tikus Obesitas yang Dilakukan *Sleeve Gastrectomy*” disusun untuk memenuhi persyaratan dalam mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.

Selesainya penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. R. Vito Mahendra Ekasaputra, Sp.B, M.Si.Med. dan dr. Arini Dewi Antari, M. Biomed, selaku Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II yang telah sabar dan penuh kesanggupan meluangkan waktu dan tenaga untuk memberikan bimbingan, saran, dan dorongan sehingga penyusunan skripsi ini dapat selesai.
3. Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med dan dr. M. Akbaruddin Sholeh, M.Si, selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan dalam perbaikan skripsi ini kepada penulis.
4. Orang tua saya Bapak Effendy dan Ibu Cholisoh. Saudara saya Fadil Adika Effendy serta sahabat saya M.Zidan Akhsanul Irsyad yang telah memberikan

doa,dukungan dan motivasi selama penyusunan karya tulis ilmiah ini.

5. Keluarga besar di Barupring. Kakek(Alm),Nenek,Made dan lilik, serta adik adik sepupu yang tidak bisa disebutkan Namanya satu persatu yang selalu memberi dukungan dan selalu mendoakan yang terbaik untuk keberhasilan penulis.
6. Kelompok skripsi saya (REMORA) yang sudah mau diajak bersusah payah untuk menyelesaikan penelitian.
7. Sahabat sekaligus keluarga saya (BERDELAPAN) yang telah menemani dan saling menyemangati disaat suka dan duka.
8. Keluarga Besar Avenzoar FK Unissula Angkatan 2018 yang sudah mengajarkan arti pentingnya kekeluargaan dan kebersamaan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat, civitas akademika FK UNISSULA dan menjadi salah satu sumbangan dunia ilmiah dan kedokteran.

Semarang, Februari 2022

Windy Listiana

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum.....	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Obesitas.....	7
2.1.1. Definisi.....	7
2.1.2. Patofisiologi.....	8
2.2. Omentoplasti.....	12
2.3. <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	13
2.4. Sel Beta Pankreas.....	14
2.5. <i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i>	15
2.6. Bedah Bariatrik.....	16
2.6.1. <i>Sleeve Gastrectomy</i>	16

2.6.2.	Hubungan Omentoplasti dan MSCs terhadap jumlah Sel Beta Pankreas dan Kadar VEGF	17
2.7.	Kerangka Teori.....	20
2.8.	Kerangka Konsep	21
2.9.	Hipotesis Penelitian.....	21
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....		22
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	22
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional	23
3.2.1.	Variabel Penelitian	23
3.2.2.	Definisi Operasional.....	23
3.3.	Populasi dan Sampel	24
3.3.1.	Populasi Penelitian.....	24
3.3.2.	Sampel Penelitian.....	25
3.3.3.	Cara Pengambilan Sampel	26
3.3.4.	Besar Sampel.....	26
3.4.	Instrumen dan Bahan.....	27
3.4.1.	Instrumen.....	27
3.4.2.	Bahan.....	28
3.5.	Cara Penelitian	28
3.5.1.	Penggemukan Tikus.....	28
3.5.2.	Induksi Diabetes Tipe 2	28
3.5.3.	Pengukuran Kadar Glukosa dan Insulin (HOMA-IR) untuk validasi	29
3.5.4.	Teknik Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	29
3.5.5.	Kultur Sel Punca	31
3.5.6.	Proses Pemanenan Sel.....	31
3.5.7.	Proses Perhitungan Sel.....	32
3.5.8.	Operasi <i>Sleeve Gastrectomy</i>	32
3.5.9.	Operasi Omentoplasti Pankreas	33

3.5.10. Operasi <i>Sleeve Gastrectomy</i> dan Injeksi <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	33
3.5.11. Prosedur Perawatan Pasca Operasi	34
3.5.12. Pengukuran jumlah sel Beta pankreas Pasca Perlakuan	35
3.5.13. Pengukuran Kadar VEGF Pasca Pengukuran	37
3.6. Alur Penelitian	42
3.7. Tempat dan Waktu	43
3.7.1. Tempat penelitian.....	43
3.7.2. Waktu penelitian	43
3.8. Analisis Hasil	43
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	45
4.1. Hasil Penelitian	45
4.1.1. Analisis Deskriptif	46
4.1.2. Analisis Bivariat.....	50
4.2. Pembahasan.....	53
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1. Kesimpulan	57
5.2. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	61

DAFTAR SINGKATAN

ADA	: <i>American Diabetes Association</i>
AD-MSCs	: <i>Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells</i>
BMI	: <i>Body Mass Index</i>
BM-MNCs	: <i>Bone Marrowderived Mononuclear Cells</i>
BM-MSCs	: <i>Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells</i>
CCK	: <i>Cholecystokinin</i>
CD29	: <i>Cluster of Differentiation 29</i>
CD31	: <i>Cluster of Differentiation 31</i>
CD45	: <i>Cluster of Differentiation 45</i>
CD90	: <i>Cluster of Differentiation 90</i>
Cdna	: <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CT	: <i>Cycle Threshold</i>
ddH ₂ O	: <i>Double-distilled water</i>
DEPC	: <i>Diethyl pyrocarbonat</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
Dtnp	: <i>Deoxynucleotide</i>
eAMV-RT	: <i>Enhanced Avian Reverse Transcriptase</i>
ESCs	: <i>Embryonic Stem Cells</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GLP-1	: <i>Glucagon Like Peptide-1</i>
HOMA-IR	: <i>Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance</i>
hUC-MSCs	: <i>Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-γ</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1β</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IMT	: <i>Indeks Massa Tubuh</i>
IPCs	: <i>Insulin Producing Cells</i>

IPSCs	: <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
IRS-1	: <i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
LPPT	: Lembaga Penelitian dan Pengujian terpadu
MDSCs	: <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MNCs	: <i>Mononuclear Cells</i>
Mrna	: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NaCl	: Natrium Chloride
NIDDM	: <i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>
NPY	: Neuropeptida Y
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
POMC	: Pro-opiomelanocortin
PPIs	: <i>Proton Pump Inhibitors</i>
PYY	: <i>Peptide Tyrosine Tyrosine</i>
qRT-PCR	: <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RISKESDAS	: Riset Kesehatan Dasar
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
SCCR	: <i>Stem Cell and Cancer Research</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solution</i>
SSPG	: <i>Steady State Plasma Glucose</i>
STZ	: Streptozocin
TNF- α	: <i>Tumour Necrosis Factor-α</i>
VSG	: <i>Vertical Sleeve Gastrectomy</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
\square - \square \square \square	: \square - <i>Minimum Essential Medium</i>

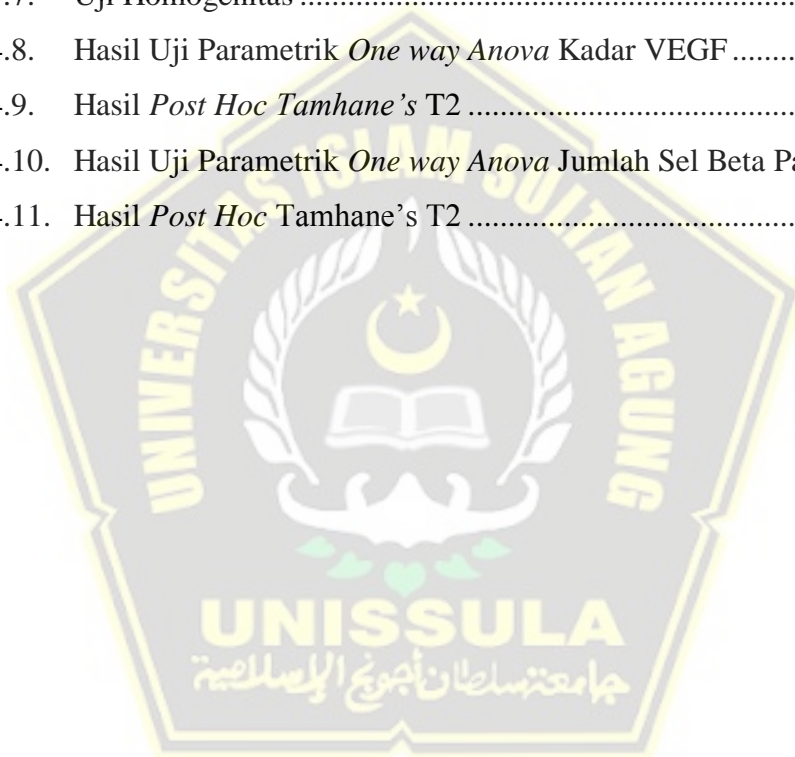
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Prosedur bariatrik : A. <i>Adjustable gastric band (AGB)</i> , B. <i>Sleeve gastrectomy</i> , C. <i>Roux-en-Y gastric bypass (RYGB)</i> , D. <i>Biliopancreatic diversion (BPD)</i> , E. <i>Biliopancreatic diversion with duodenal switch (BPD-DS)</i>	16
Gambar 2.2.	<i>Sleeve Gastrectomy</i>	17
Gambar 2.3.	Kerangka Teori.....	20
Gambar 2.4.	Kerangka Konsep	21
Gambar 3.1.	Alur Penelitian	42
Gambar 4.1.	Median Kadar VEGF	47
Gambar 4.2.	Median Jumlah Sel Beta Pankreas	48



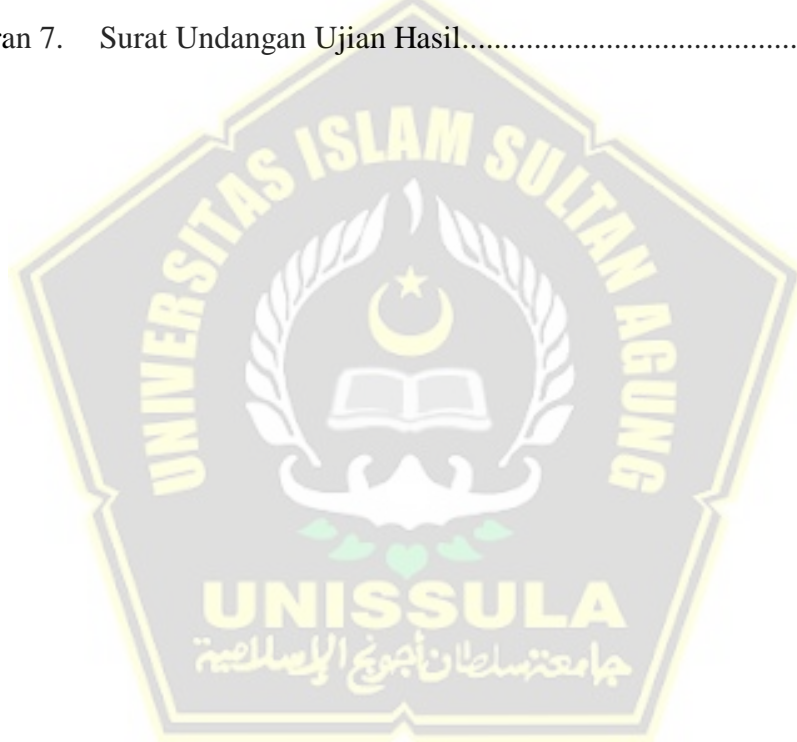
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Klasifikasi IMT (Lim <i>et al.</i> , 2017).....	8
Tabel 4.1.	Hasil Konfirmasi Kondisi Obesitas dan Resistensi Insulin.....	46
Tabel 4.2.	Hasil Rerata kadar VEGF.....	46
Tabel 4.3.	Hasil Rerata Jumlah Sel Beta Pankreas	47
Tabel 4.4.	Hasil Uji Normalitas Kadar VEGF	48
Tabel 4.5.	Uji Homogenitas	49
Tabel 4.6.	Uji normalitas sel beta pankreas	49
Tabel 4.7.	Uji Homogenitas	50
Tabel 4.8.	Hasil Uji Parametrik <i>One way Anova</i> Kadar VEGF.....	50
Tabel 4.9.	Hasil <i>Post Hoc Tamhane's T2</i>	51
Tabel 4.10.	Hasil Uji Parametrik <i>One way Anova</i> Jumlah Sel Beta Pankreas....	52
Tabel 4.11.	Hasil <i>Post Hoc Tamhane's T2</i>	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Analisis Deskriptif Jumlah Sel Beta Pankreas	61
Lampiran 2.	Hasil Analisis Deskriptif Kadar VEGF	63
Lampiran 3.	Hasil Analisis Normalitas, Homogenitas ,Uji Parametrik dan Post Hoc Jumlah Sel Beta Pankreas.....	65
Lampiran 4.	Hasil Analisis Normalitas, Homogenitas ,Uji Parametrik dan Post Hoc Kadar VEGF.....	67
Lampiran 5.	Ethical Clearance	70
Lampiran 6.	Dokumentasi penelitian.....	71
Lampiran 7.	Surat Undangan Ujian Hasil.....	73



INTISARI

Obesitas adalah ketidakseimbangan antara energi yang masuk dengan yang keluar, ditandai dengan penumpukan lemak dalam jaringan adipose. Obesitas berhubungan dengan sel beta pankreas, dikarenakan obesitas dapat menyebabkan resistensi insulin. Pada orang obesitas terjadi penurunan kemampuan angiogenesis di beberapa organ, mRNA berperan penting pada proses angiogenesis, dimana polimorfisme dari gen VEGF dapat mempengaruhi ekspresi dari mRNA. Kondisi tersebut dapat diatasi dengan tindakan bedah bariatrik *sleeve gastrectomy* dan pemberian omentoplasti serta injeksi MSCs pasca operasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh omentoplasty pankreas dan mesenchymal stem cells terhadap jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*.

Jenis penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan *posttest only control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Kelompok penelitian dibagi menjadi 4, yaitu kontrol sham, kontrol *sleeve gastrectomy*, kelompok pasca *sleeve gastrectomy* dilakukan omentoplasti, kelompok pasca *sleeve gastrectomy* dilakukan injeksi MSCs. Penelitian ini dilakukan selama 47 hari, kadar VEGF yang diperiksa menggunakan qRT-PCR sedangkan ekspresi jumlah sel Beta Pankreas dievaluasi dengan IHC.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian MSCs dapat meningkatkan kadar VEGF dan jumlah sel beta pankreas pada tikus obesitas kelompok *sleeve gastrectomy* dengan injeksi MSCs.

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa injeksi MSCs pasca *sleeve gastrectomy* lebih efektif dibandingkan omentoplasti pasca *sleeve gastrectomy* terhadap kadar VEGF dan jumlah sel beta pankreas pada tikus obesitas yang dilakukan *sleeve gastrectomy*.

Kata Kunci : Omentoplasti, MSCs, *Sleeve Gastrectomy*, Sel Beta Pankreas, VEGF

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Obesitas adalah ketidakseimbangan antara energi yang masuk dengan yang keluar, ditandai dengan penumpukan lemak dalam jaringan adipose (Safitri dan Rahayu, 2020) . Obesitas mendorong perubahan metabolik dan struktural yang membuat individu lebih rentan terhadap beberapa penyakit, seperti penyakit kardiovaskular dan respirasi (Melo *et al.*, 2014). Obesitas berhubungan dengan sel beta pankreas, dikarenakan obesitas dapat menyebabkan resistensi insulin. Istilah resistensi mengacu pada keadaan dimana insulin tidak dapat bekerja optimal pada jaringan target insulin, seperti otot lurik, adiposit, dan hati (Abdul-Ghani dan Ralp, 2010). Kondisi resistensi insulin mengakibatkan tubuh berusaha mengatasidefisiensi insulin dengan cara meningkatkan sekresi insulin oleh sel beta pankreas. Pada orang obesitas terjadi penurunan kemampuan angiogenesis di beberapa organ, mRNA berperan penting pada proses angiogenesis, dimana polimorfisme dari gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dapat mempengaruhi ekspresi darimRNA.VEGF juga dapat merangsang faktor jaringan protein trombogenik yang memiliki peran penting dalam proses angiogenesis.(Frisca *et al.*, n.d.)

Prevalensi obesitas di seluruh dunia makin meningkat. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdes) 2018, prevalensi obesitas di Indonesia pada usia di atas 18 tahun adalah sekitar 21,8%. Prevalensi

tertinggi terdapat pada Provinsi Sulawesi Utara (30,2%), DKI Jakarta (29,8%), Kalimantan Timur (28,7%), Papua Barat (26,4%), Kepulauan Riau (26,2%) dan diikuti provinsi- provinsi lainnya (Depkes, 2018). Penduduk Indonesia yang mengalami obesitas sentral pada usia ≥ 15 tahun berjumlah 26.6% dan meningkat 31% pada 2018. Sebanyak 6.9% mengalami diabetes melitus pada usia ≥ 15 tahun dan meningkat 10.9% ,ini dinilai dari hasil pemeriksaan kadar gula darah berdasarkan kriteria ADA & konsensus Perkeni 2015 (Badan Litbang Kemenkes RI, 2019, 2013).

Obesitas berhubungan erat dengan inflamasi kronik derajat rendah dan dapat berujung kepada resistensi insulin (Koca, 2017). Resistensi insulin adalah suatu kondisi dimana terjadi penurunan sensitivitas jaringan terhadap kerja insulin, sehingga terjadi peningkatan sekresi insulin sebagai bentuk kompensasi sel beta pankreas (Soegondo dan Purnamasari, 2015). Pada orang dengan metabolisme normal, insulin dilepaskan dari sel-sel beta (β) pulau Langerhans pankreas setelah makan (postprandial), dan mengirim sinyal ke jaringan target insulin (otot dan adiposa) untuk menyerap glukosa. Sehingga kadar glukosa darah menurun. Sel-sel beta pankreas mengurangi output insulin saat kadar glukosa darah turun, dengan kadar glukosa darah yang dijaga sekitar 5 mmol/L. Pada orang dengan resistensi insulin, kadar normal insulin tidak memiliki efek yang sama pada sel-sel otot dan adiposa, dengan hasil kadar glukosa tetap lebih tinggi dari biasanya. Untuk mengkompensasi hal ini, pankreas dalam individu resistensi insulin dirangsang untuk melepaskan lebih banyak insulin. (B. Mlinar et al. / Clinica

Chimica Acta 375, 2007). Studi terdahulu mengemukakan bahwa resistensi insulin berperan penting dalam patogenesis terjadinya diabetes melitus tipe 2 (DMT2). Pada beberapa penyandang diabetes melitus tipe 2 (DMT2), kerusakan awal tampak terjadi pada sel beta pankreas dan dimanifestasikan sebagai gangguan sekresi insulin. Bila sel beta pankreas tidak dapat memproduksi sekresi insulin dengan kecepatan yang tinggi untuk mengimbangi resistensi insulin, maka terjadi diabetes melitus tipe 2 (DMT2). (Abdul-Ghani dan Ralp, 2010)

Pasien dengan berat badan lebih, biasanya menggunakan olahraga atau program penurunan berat badan untuk menurunkan berat badannya. Hal tersebut juga dilakukan untuk menurunkan terjadinya resiko diabetes melitus tipe 2 (DMT2), serta menaikkan sensitivitas insulin. Namun, hal tersebut kurang maksimal karena kepatuhan pasien yang rendah. Tindakan bedah saat ini menjadi alternatif untuk menurunkan berat badan, salah satu contoh yaitu bedah bariatrik. Prinsip dari bedah bariatrik sendiri adalah melambatkan pengosongan lambung sehingga mengurangi asupan makanan. Pembedahan bariatrik meliputi *sleeve gastrectomy (SG)* per laparoskopi atau laparotomi, *gastric banding*, *Roux en Y gastric bypass*. Akan tetapi dicetuskan pada penelitian sebelumnya bahwa penurunan yang cepat dari berat badan tidak diiringi oleh penurunan dari ekspresi sitokin pro inflamasi dari jaringan adiposa (Chambers *et al.*, 2014). Mesenchymal Stem Cells (MSCs) merupakan terapi adjuvant dari pembedahan bariatrik. MSCs berperan penting untuk perkembangan, pertumbuhan, pemeliharaan, dan perbaikan sel

maupun jaringan di otak, tulang, otot, saraf, darah, kulit, dan organ-organ tubuh yang lain. Karena sifat tersebut, MSCs sangat potensial untuk dikembangkan sebagai pengobatan regeneratif pada berbagai penyakit (Kalra dan Tomas, 2014). Hasil penelitian terkini melaporkan bahwa MSCs berpotensi tinggi dalam meregenerasi kerusakan jaringan pankreas (Zakariya dan Agung, 2017). Pembentukan pembuluh darah baru dipengaruhi oleh kemampuan dari MSCs untuk berdiferensiasi menjadi sel endotel, mengeluarkan faktor soluble diantaranya faktor angiogenik dan pembentukan otot polos pembuluh yang berperan dalam menyatukan endotel dinding pembuluh. MSCs juga dapat meningkatkan proliferasi sel endotel dan permeabilitas pembuluh darah. Proliferasi sel endotel dan permeabilitas dari pembuluh darah akan dipengaruhi oleh faktor angiogenik diantaranya VEGF. VEGF merupakan glikoprotein yang berperan penting dalam vaskulogenesis selama embriogenesis dan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), adanya VEGF ini menjadi parameter untuk menilai pertumbuhan vaskuler di pankreas (Revilla, 2017). Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk menguji pengaruh omentoplasty pankreas dan mesenchymal stem cell terhadap sel beta pankreas dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*.

1.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah : “apakah omentoplasti dan MSCs berpengaruh terhadap jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*?”

1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang telah diuraikan di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh omentoplasti dan MSCs terhadap jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui perbedaan jumlah sel beta pankreas pada tikus obesitas kelompok kontrol, kelompok *sleeve gastrectomy*, kelompok *sleeve gastrectomy* dengan omentoplasti pankreas, dan kelompok *sleeve gastrectomy* dengan injeksi MSCs.

1.3.2.2. Mengetahui perbedaan kadar VEGF pada tikus obesitas kelompok kontrol, kelompok *sleeve gastrectomy*, kelompok *sleeve gastrectomy* dengan omentoplastipankreas, dan kelompok *sleeve gastrectomy* dengan injeksi MSCs.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan ilmu pengetahuan dan bahan kajian untuk penelitian selanjutnya tentang hasil aktivitas omentoplasti dan MSCs berpengaruh terhadap jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF

padatikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*.

1.4.2. Manfaat Praktis

Dapat menambah wawasan mengenai omentoplasti dan MSCs berpengaruh terhadap jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*. yang dapat digunakan untuk menurunkan obesitas.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Obesitas

2.1.1. Definisi

Overweight dan obesitas didefinisikan sebagai akumulasi lemak abnormal atau berlebihan yang menimbulkan risiko kesehatan (World Health Organization, 2020). Prevalensi obesitas di seluruh dunia makin meningkat, sejak tahun 1975 sampai 2016 diperkirakan terjadi kenaikan hampir tiga kali lipat. Pada 2016, lebih dari 1,9 miliar orang dewasa berusia di atas 18 tahun mengalami *overweight* dan lebih dari 650 juta di antaranya mengalami obesitas (WHO, 2019).

Mengukur lemak tubuh secara langsung sangatlah sulit dan sebagai pengukur pengganti dipakai *Body Mass Index* (BMI) atau Indeks Massa Tubuh (IMT). IMT merupakan indikator yang paling sering digunakan untuk menentukan status gizi seseorang. Menurut *World Health Organization* (WHO), Indeks Massa Tubuh (IMT) dan pengklasifikasiannya dihitung dengan menggunakan rumus berat badan dalam kilogram (kg) dibagi tinggi badan dalam meter kuadrat (m²) (Purnell, 2018).

Tabel 2.1. Klasifikasi IMT (Lim *et al.*, 2017)

	WHO (BMI)	Asia-Pacific (BMI)
Underweight	<18.5	<18.5
Normal	18.5–24.9	18.5–22.9
Overweight	25–29.9	23–24.9
Obese	≥30	≥25

Abbreviations: WHO, World Health Organization; BMI, body mass index.

Secara global, ada lebih banyak orang yang mengalami obesitas daripada kekurangan berat badan, sehingga obesitas dikaitkan dengan penyebab terbanyak kematian di seluruh dunia daripada kekurangan berat badan. (World Health Organization, 2020).

2.1.2. Patofisiologi

Obesitas bersifat multifaktorial, melibatkan interaksi kompleks antara genetika, hormon, dan lingkungan. Meskipun beberapa kandidat gen telah terlibat dalam patogenesis obesitas, temuan ini tidak konsisten. Gen-gen yang dimaksud yaitu gen reseptor beta-3-adrenergik, gen reseptor teraktivasi peroksisom-proliferasi- gamma 2, kromosom 10p, gen reseptor melanokortin-4 dan polimorfisme genetik lainnya (Kailadan Raman, 2008)

Beragam hormon terlibat dalam regulasi dan patofisiologi obesitas, termasuk hormon yang berhubungan dengan usus, adipokin, dan lainnya. Ghrelin adalah hormon peptida dalam sirkulasi yang berasal dari lambung. Ini adalah satu-satunya hormon orexigenic yang bekerja secara perifer dan bertanggung jawab untuk merangsang nafsumakan. Dalam studi *cross-over double-blind*, infus

ghrelin intravena pada sukarelawan sehat menyebabkan peningkatan 30% asupan makanan, tanpa perubahan pengosongan lambung. Semua hormon derivat usus lainnya berfungsi sebagai agen anorektik yang bertanggung jawab untuk membatasi asupan makanan untuk mencapai pencernaan dan penyerapan yang optimal sembari menghindari konsekuensi dari makan berlebih, seperti hiperinsulinemia dan resistensi insulin (Kaila dan Raman, 2008).

Peptida YY (PYY) ditemukan di seluruh usus dengan kadar yang semakin tinggi ke arah distal, dengan tingkat tertinggi di kolon dan rektum. PYY disekresikan oleh sel-sel usus halus distal dan kolon. PYY dilepaskan post-prandial, dan memberisinyal ke hipotalamus, menghasilkan pengosongan lambung yang tertunda, sehingga mengurangi sekresi lambung. (Kaila dan Raman, 2008).

Cholecystokinin (CCK), diproduksi di kantong empedu, pankreas dan lambung, dan terkonsentrasi di usus halus, dilepaskan sebagai respons terhadap makanan berlemak. CCK mengatur kontraksi kandung empedu, sekresi eksokrin pankreas, pengosongan lambung dan motilitas usus. CCK juga bertindak secara terpusat dengan meningkatkan rasa kenyang dan mengurangi nafsu makan dan bekerja pada sinyal rasa kenyang melalui reseptor subtype CCK-A pada serat vagal aferen ke otak, hal ini menyebabkan penghentian nafsu makan (Kaila dan Raman, 2008).

Terminasi makan juga diatur oleh pelepasan oksintomodulin post-prandial. Peptida ini disekresikan oleh sel-sel usus yang juga mensekresi PYY. Infus tunggal oksintomodulin menekan nafsu makan dan mengurangi asupan makanan selama 12 jam. Hal ini terkait dengan penurunan kadar ghrelin puasa (Kaila dan Raman, 2008). *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) merupakan segmen asam amino 6 hingga 29 glukagon. GLP-1 meningkatkan rasa kenyang dan mengurangi asupan makanan ketika diberikan secara intravena kepada manusia (Kaila dan Raman, 2008).

Beberapa hormone yang secara kolektif disebut sebagai adipokin, diproduksi oleh adiposit. Produk sekretori kunci adalah *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), leptin dan adiponektin. Peran TNF- α dalam obesitas telah dikaitkan dengan resistensi insulin melalui pembebasan asam lemak bebas, penurunan sintesis adiponektin dan gangguan pensinyalan insulin. TNF- α juga mengaktifkan faktor-kappa B nuklir, yang mengarah ke serangkaian perubahan inflamasi pada jaringan pembuluh darah (Kaila dan Raman, 2008). IL-6 adalah sitokin yang bersirkulasi pleiotropic dan mengakibatkan peradangan, gangguan pertahanan host dan cedera jaringan. IL-6 disekresikan oleh banyak jenis sel, termasuk sel imun dan endotel, fibroblas dan adiposit. Kerjanya dengan menghambat transduksi sinyal reseptor insulin dalam hepatosit, meningkatkan sirkulasi asam lemak bebas dari jaringan adiposa dan mengurangi

sekresi adiponektin (Kaila dan Raman, 2008).

Leptin bertindak sebagai sinyal jangka panjang yang dominan yang bertanggung jawab untuk memberi tahu otak cadangan energi adiposa. Leptin diangkut melintasi sawar darah-otak dan berikatan dengan reseptor spesifik pada neuron pemodulasi- nafsu makan dan nukleus arkuata dalam hipotalamus, menghambat nafsu makan. Percobaan pada mencit yang kekurangan reseptor leptin menunjukkan keadaan hiperfagi dan obesitas. Defisiensi leptin mengurangi pengeluaran energi. Kekurangan leptin sejati pada manusia jarang terjadi; namun, orang yang obesitas sebagian mengalami resistensi leptin (Kaila dan Raman, 2008). Adiponektin adalah adipokin yang berasal dari protein plasma. Adiponektin adalah insulin-*sensitizing*, anti- inflamasi dan antiatherogenik. Berbeda dengan adipokin lain, kadar *messenger* RNA (mRNA) adiponektin berkurang pada jaringan adiposa pada individu dengan obesitas dan diabetes, dan kadar adiponektin kembali ke level normal setelah penurunan berat badan (Kaila dan Raman, 2008).

Peningkatan lemak visceral menghasilkan peningkatan kadar IL-6, TNF- α dan protein C-reaktif, serta penurunan kadar adiponektin dan interleukin-10, menghasilkan lingkungan proinflamasi yang mengarah pada resistensi insulin dan disfungsi endotel hingga memicu sindroma metabolik, diabetes dan aterosklerosis. Adipositas visceral memodulasi pengatur utama inflamasi ini, dan memiliki

potensi proinflamasi yang setara atau lebih besar dari makrofag (Kailadan Raman, 2008).

2.2. Omentoplasti

Omentoplasty adalah prosedur pembedahan yang mempunyai tujuan menempelkan omentum pada organ-organ tertentu, untuk menutup defek, anti inflamasi, regenerasi sirkulasi arteri, vena dan meningkatkan drainase limfatik. Omentum mempunyai potensi sebagai terapi pasien diabetes dan perbaikan resistensi berdasarkan penelitian oleh Ferguson dan Scothorne yang melakukan tranplantasi sel islet pankreas di omentum mayus pada tahun 1977 (Di Nicola, 2019).

Studi pertama dilakukan oleh grup Dr. Altman, Bethoux, Cugnenc dan Chertien pada tahun 1988-1989 pada 3 pasien dengan DM tipe 1, yang menerima allogenik islet tranplantasi melalui embolisasi pada cabang arteri gastroepiploicacanan. pendekatan bedah lain dikembangkan untuk implantasi islet pankreas pada omentum, oleh karena islet yang tertanam di oemntum bertahan lebih lama dibandingkan dengan tranplantasi di hepar. Omentum juga berhubungan langsung dengan porta hepatic sehingga dapat memberikan jalur fisiologis yang baik untuk insulin yang dihasilkan sel pankreas tersebut. Perkembangan yang baik dari sel β pankreas ini memberikan perbaikan insulin sebesar 10^6 per sel-nya (Bartholomeus *et al.*, 2013).

2.3. *Mesenchymal Stem Cell*

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) atau sel punca mesensimal (SPM) merupakan salah satu jenis sel punca dewasa yang bersifat multipoten.

Menurut Caplan (2019), sel punca mesensimal adalah nama yang pada awalnya diberikan kepada sekelompok sel yang melekat pada kultur dari sumsum tulang manusia dewasa, yang dapat diekspansi dan diinduksi untuk membentuk tulang keras, tulang rawan, otot dan jaringan kerangka lainnya dalam kultur. Kemampuan multipotensi, aksi reparatif, kemampuan homing, dan sifat immunoregulator meningkatkan harapan penggunaan sel punca dalam pengobatan regeneratif dan mendorong banyak uji klinis yang dilakukan di seluruh dunia (Azapira *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2013).

MSCs ini mampu memproduksi protein dan sitokin untuk perbaikan jaringan, zat imunomodulator yang dapat menekan inflamasi karena luka maupun karenapenolakan transplantasi jaringan oleh tubuh (Azapira *et al.*, 2015; Kay *et al.*, 2017), serta sifat proangiogenik yang berpotensi untuk terapi (Xi dan Bu, 2014). Pernyataantersebut memperkuat hasil penelitian yang pernah dilakukan oleh Murphy *et al.*, (2013) yang menyebutkan bahwa MSCs dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan, termasuk tulang keras, kartilago, dan adiposa. Namun yang berperan besar adalah fungsi trofik, parakrin dan imunomodulatornya (Kim *et al.*, 2013).

Stem sel mempunyai kekuatan dapat berdiferensiasi menjadi sel islet pankreas yang memproduksi insulin. Injeksi *stem cells* intra pankreatik dapat

meregulasi kondisi glikemik dan kadar insulin. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) dapat meningkatkan fungsi sel islet dan mengontrol resistensi insulin pada DM tipe 2. Kemajuan yang signifikan telah berhasil dilakukan dalam upaya memahami mekanisme biokimia dan metabolik, serta reaksi umpan balik yang terkait dengan respon MSCs. Pemberian MSCs secara alogenik telah dikategorikan sebagai obat dan telah banyak diaplikasikan. Penelitian terbaru menggunakan terapi MSCs autolog menunjukkan kemanjuran terapi di berbagai tingkatan keparahan penyakit. MSCs merupakan pilihan menarik untuk diaplikasikan dalam terapi regeneratif, antiinflamasi, dan autoimun (Murphy *et al.*, 2013).

2.4. Sel Beta Pankreas

Secara anatomis pankreas adalah kelenjar yang terletak pada kuadran kiri atas abdomen atau perut dan bagian kaput atau kepalanya menempel pada organ duodenum (Scalon, 2010). Kelenjar pankreas memiliki dua fungsi utama, adalah untuk mengatur kadar glukosa dalam aliran darah melalui hormon insulin dan glucagon (fungsi endokrin), dan membantu dalam proses pencernaan makanan dengan mensekresi enzim pencernaan (fungsi eksokrin) (Sridianti, 2015). Fungsi endokrin pankreas terdapat pada sekelompok sel yang ditemukan oleh Langerhans pada tahun 1869, sehingga sekelompok sel tersebut dinamakan sebagai pulau Langerhans. Pada tikus dewasa, pankreas berisi kira-kira 1-2% pulau-pulau Langerhans dengan diameter antara 100-200 μm (Banerjee *et al.*, 2005).

Terdapat empat tipe sel, masing-masing memiliki kemampuan sekresi hormon yang berbeda-beda, yaitu (Stumvoldet *al.*, 2008):

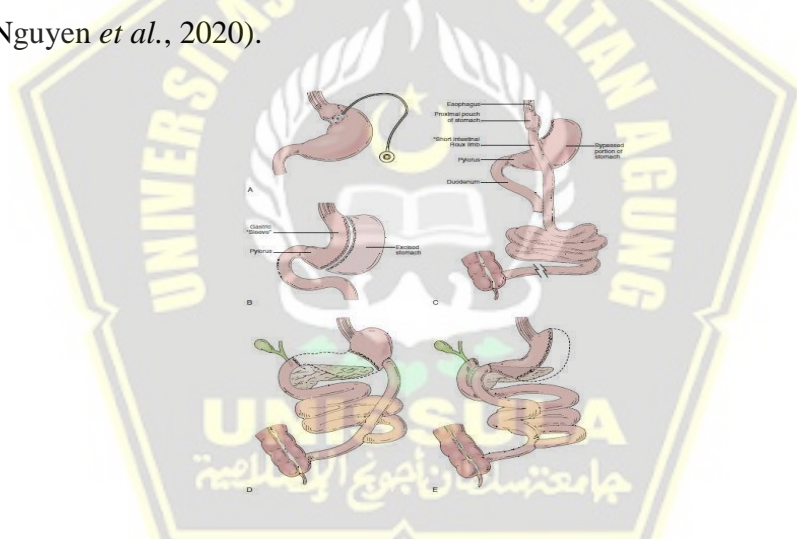
1. Sel Alfa, yaitu sel yang menghasilkan glucagon. Sel ini merupakan sel terbanyak kedua yang ditemukan di pulau Langerhans setelah sel beta (20%).
2. Sel Beta, yaitu sel yang menghasilkan hormon insulin. Sel β terletak di dalam pulau Langerhans dan memenuhi sekitar 70% dari volume pulau Langerhans.
3. Sel Delta, sel ini menghasilkan somatostatin
4. Sel F, sel ini menghasilkan *pancreatic polypeptide* yang diduga berfungsi dalam membantu proses pencernaan makanan terutama protein.

2.5. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Angiogenesis adalah sebuah proses fisiologis yang melibatkan pertumbuhan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang lama. Angiogenesis merupakan suatu proses normal dan penting dalam pertumbuhan dan pengembangan, serta dalam penyembuhan luka. Pada proses angiogenesis diperlukan VEGF yang merupakan peptida angiogenik yang sangat berpotensi dalam mengendalikan pengembangan *hematopoietic stem cells* dan perubahan matriks ekstrasel. In vitro VEGF merangsang degradasi matriks ekstrasel dan proliferasi, migrasi dan pembentukan rongga pembuluh pada sel endotel pembuluh darah. In vivo mengatur permeabilitas dinding kapiler yang merupakan hal penting dalam proses awal angiogenesis. Yang, et al (2006)

2.6. Bedah Bariatrik

Pembedahan bariatrik bertujuan untuk merubah fisiologi dan anatomi saluran cerna untuk menurunkan berat badan dan memperbaiki fungsi metabolik. Terapi ini terbukti menjadi terapi yang menghasilkan penurunan berat badan jangka panjang yang signifikan pada pengobatan pasien obesitas dibandingkan dengan program penurunan berat badan atau terapi non-bedah. Beberapa terapi pembedahan bariatrik yang sudah umum digunakan ialah *sleeve gastrectomy*, *Roux-en-Y gastric bypass* (RYGB), *biliopancreatic diversion* (BPD), dan *laparoscopic adjustable gastric banding* (LAGB), namun untuk saat ini metode *sleeve gastrectomy* yang umumnya digunakan (Nguyen *et al.*, 2020).



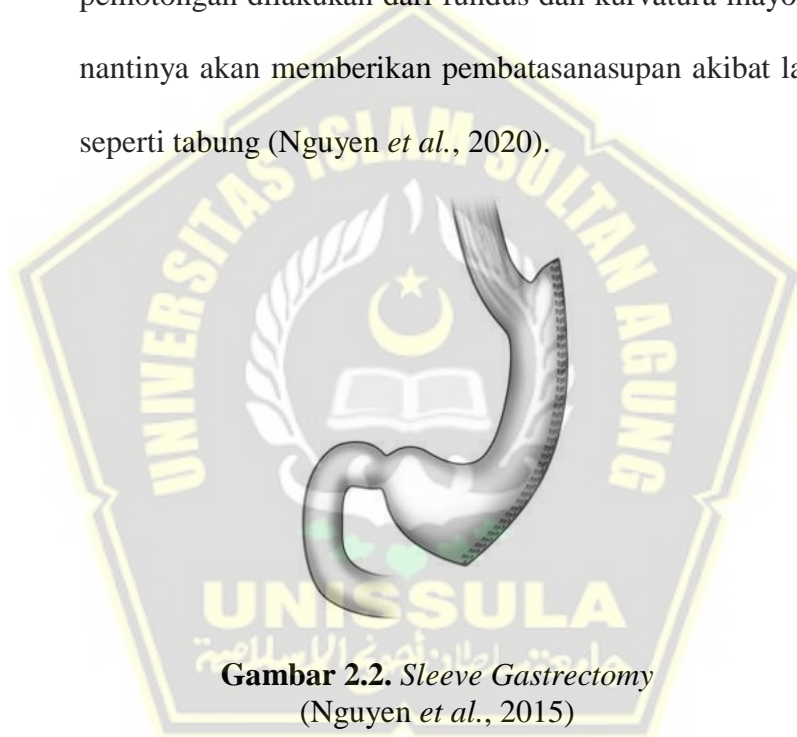
Gambar 2.1. Prosedur bariatrik : A. *Adjustable gastric band (AGB)*, B. *Sleeve gastrectomy*, C. *Roux-en-Y gastric bypass (RYGB)*, D. *Biliopancreatic diversion (BPD)*, E. *Biliopancreatic diversion with duodenal switch (BPD-DS)*.

2.6.1. Sleeve Gastrectomy

Gold standar dari pembedahan bariatrik ialah *sleeve gastrectomy* (SG). karena memberikan hasil yang maksimal dengan komplikasi yang lebih minimal dibandingkan dengan prosedur yang

lain. Akan tetapi BMI yang harus dipenuhi oleh pasien yang akan melakukan terapi ini yaitu BMI antara 35 – 40 kg/m² dengan komorbid seperti diabetes melitus tipe 2 atau faktor risiko kardiovaskular, atau pasien dengan BMI \geq 40 kg/m². (Nguyen *et al.*, 2020).

Untuk prosedur SG sendiri dapat dilakukan perlaparoskopik dengan membentuk lambung seperti tabung secara vertikal, pemotongan dilakukan dari fundus dan kurvatura mayor gaster yang nantinya akan memberikan pembatasan asupan akibat lambung yang seperti tabung (Nguyen *et al.*, 2020).



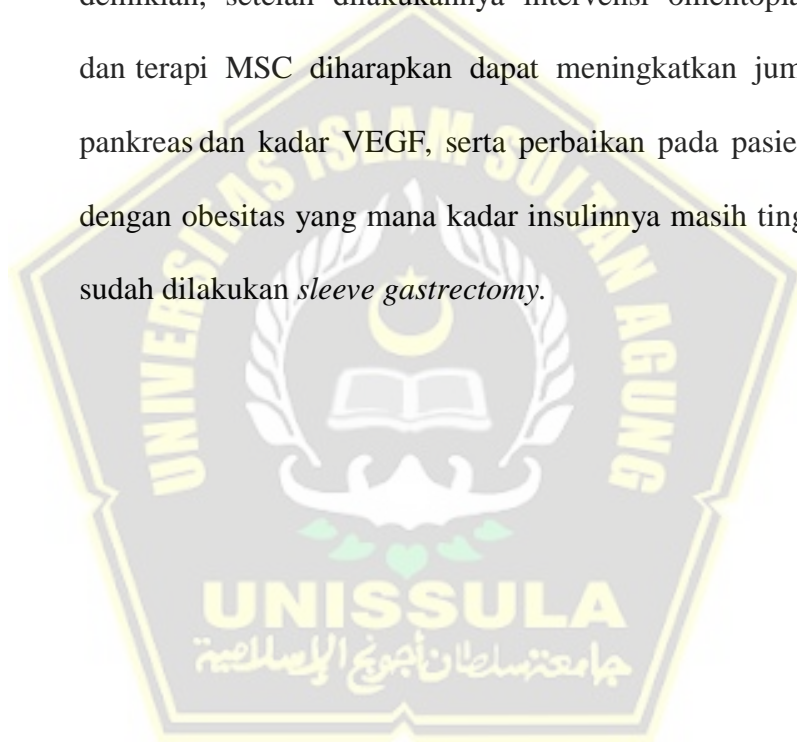
Gambar 2.2. *Sleeve Gastrectomy*
(Nguyen *et al.*, 2015)

2.6.2. Hubungan Omentoplasti dan MSCs terhadap jumlah Sel Beta Pankreas dan Kadar VEGF

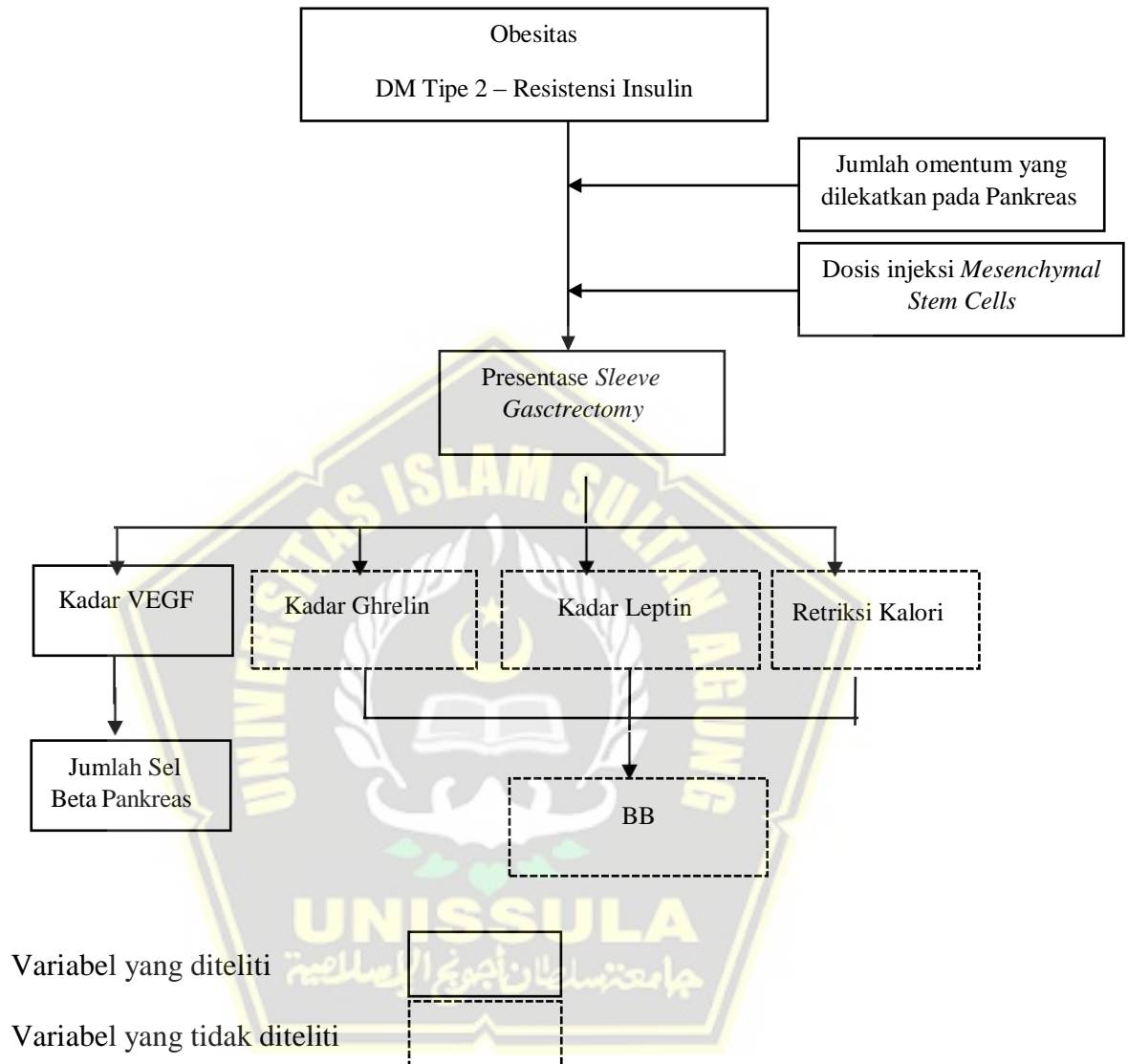
Obesitas adalah suatu kondisi medis yang digambarkan sebagai kelebihan berat badan dalam bentuk lemak. Kondisi lemak yang terakumulasi dalam tubuh tersebut dapat menyebabkan terjadinya gangguan kesehatan yang berat (BPPSDMK, 2018).

Obesitas berhubungan erat dengan inflamasi kronik derajat rendah dan dapat berujung kepada resistensi insulin, kondisi resistensi insulin mengakibatkan tubuh berusaha mengatasi defisiensi insulin dengan cara meningkatkan sekresi insulin oleh sel beta pankreas. Pasien dengan berat badan lebih, biasanya menggunakan olahraga atau program penurunan berat badan untuk menurunkan berat badannya. Hal tersebut juga dilakukan untuk menurunkan terjadinya resiko diabetes melitus tipe 2 (DMT2), serta menaikkan sensitivitas insulin. Namun, hal tersebut kurang maksimal karena kepatuhan pasien yang rendah. Tindakan bedah saat ini menjadi alternatif untuk menurunkan berat badan, salah satu contoh yaitu bedah bariatrik *sleeve gastrectomy*. Prinsip dari bedah bariatrik sendiri adalah melambatkan pengosongan lambung sehingga mengurangi asupan makanan. *Omentoplasty* merupakan terapi adjuvant dari pembedahan bariatrik, dengan memanfaatkan potensi dari omentum untuk menutup defek, regenerasi sirkulasi arteri, vena dan meningkatkan drainase limfatik. Omentum memiliki potensi sebagai terapi pasien diabetes dan perbaikan resistensi. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) juga bisa menjadi terapi adjuvant dari pembedahan bariatrik, pembentukan pembuluh darah baru dipengaruhi oleh kemampuan dari MSCs untuk berdiferensiasi menjadi sel endotel, mengeluarkan faktor soluble di antaranya faktor angiogenik dan pembentukan otot polos pembuluh yang berperan dalam menyatukan endotel dinding pembuluh. MSCs

juga dapat meningkatkan proliferasi sel endotel dan permeabilitas pembuluh darah. Proliferasi sel endotel dan permeabilitas dari pembuluh darah akan dipengaruhi oleh factor angigenik diantaranya VEGF. VEGF merupakan glikoprotein yang berperan penting dalam vaskulogenesis selama embriogenesis dan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), adanya VEGF ini menjadi parameter untuk menilai pertumbuhan vaskuler di pankreas (Revilla, 2017). Dengan demikian, setelah dilakukannya intervensi omentoplasti pankreas dan terapi MSC diharapkan dapat meningkatkan jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF, serta perbaikan pada pasien DM tipe 2 dengan obesitas yang mana kadar insulinnya masih tinggi walaupun sudah dilakukan *sleeve gastrectomy*.

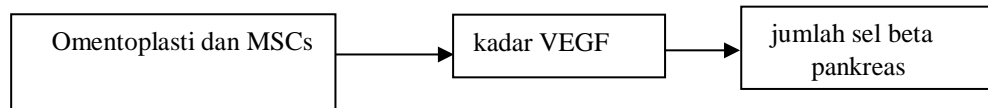


2.7. Kerangka Teori



Gambar 2.3. Kerangka Teori

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Kerangka Konsep

2.9. Hipotesis Penelitian

Pemberian omentoplasti dan *Mesenchymal stem cells* meningkatkan kadar VEGF dan jumlah sel beta pankreas pada tikus obesitas yang dilakukan *sleeve gastrectomy*.



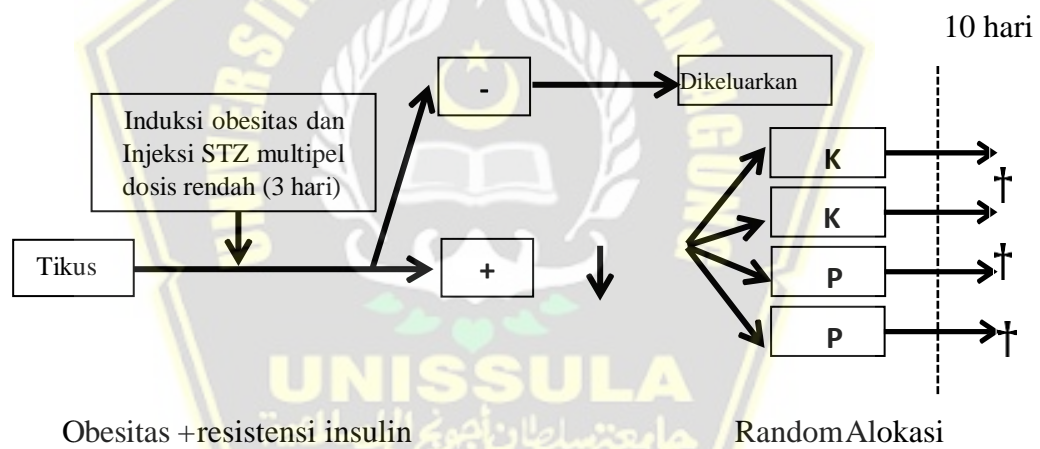
BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni menggunakan rancangan *posttest only group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Kelompok penelitian dibagi menjadi 4, yaitu 1 kelompok kontrol (sham), kelompok perlakuan 1 (K2), kelompok perlakuan 2 (P1), dan kelompok perlakuan 3 (P2). Pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut.

Skema rancangan penelitian :



Obesitas + resistensi insulin

Random Alokasi

Keterangan:

(-): Kriteria Eksklusi

(+): Kriteria Inklusi

K1: Kelompok kontrol, Tikus obesitas dilakukan Laparotomy (Sham)

K2 : Kelompok perlakuan 1, tikus obesitas yang dilakukan laparotomy *sleevegastrectomy*.

P1 : Kelompok perlakuan 2, tikus obesitas yang dilakukan laparotomy *sleevegastrectomy* dan omentoplasti pankreas.

P2 : Kelompok perlakuan 3, tikus obesitas yang dilakukan laparotomy *sleevegastrectomy* dan pemberian MSCs dosis 1×10^6 intraperitoneal +: Terminasi

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel Penelitian

3.2.1.1. Variabel Bebas

Omentoplasti dan MSCs

3.2.1.2. Variabel Tergantung

Kadar VEGF dan Jumlah sel beta pancreas

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Omentoplasti

Suatu tindakan bedah untuk menempelkan seluruh omentum mayor pada pankreas, dilakukan pada hari ke-30.

Skala data: Nominal.

3.2.2.2. MSCs

Stem cells yang berasal dari *umbilical cord* yang diperoleh dari *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)*.

Yang sudah memenuhisyarat Anti-Rat CD90 PerCP, Anti-

Rat CD29 Alexa Fluor 647, Anti-Rat CD31 PE, dan Anti-Rat CD45 FITC, Media Basal Diferensiasi Osteogenik MesenCult, Media Basal Diferensiasi Adipogenik. Dengan dosis 1×10^6 sel secara intraperitoneal. Dilakukan pada hari ke-30 Skala data: Rasio

3.2.2.3. Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Kadar VEGF didapatkan dari qRT-PCR, yang diambil dari RNA later jaringan pankreas dan ditimbang 50-100 mg kemudian dipotong sampai kecil-kecil dan halus. Diukur dalam satuan *FoldChange* pada penelitian hari ke-40

Skala data: Rasio

3.2.2.4. Jumlah Sel Beta Pankreas

Jumlah sel beta pankreas yang diukur dengan imunohistokimia. Sel beta pankreas akan terlihat positif bila pada preparat timbul kecoklatan. Pemeriksaan diukur pada hari ke-40, diidentifikasi dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan diukur dalam 5 lapang pandang.

Skala data: Rasio

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi Penelitian

Hewan coba pada penelitian ini berupa tikus putih galur wistar berkelamin jantan. Adapun menggunakan wistar jantan dikarenakan

agar tidak terpengaruh hormonal dan kehamilan. Hewan coba dipelihara di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU UGM Yogyakarta.

3.3.2. Sampel Penelitian

Hewan coba tikus putih wistar jantan yang mengalami obesitas dengan usia 2 minggu dikarenakan lama perlakuan selama 6 minggu sehingga umur tikus saat pengambilan data adalah 8 minggu yang mana jika dikonversikan adalah 10 – 12 hari usia tikus sama dengan 1 tahun usia manusia. Tikus yang digunakan memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

3.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar jantan berusia 2 minggu dengan berat badan 150 – 200 gram.
2. Sehat pada penampilan luar
3. Belum pernah digunakan pada penelitian sebelumnya.
4. Tikus obesitas dengan indeks Lee $> 0,3$.
5. Tikus dengan diabetes melitus tipe II setelah diinduksi injeksi streptozocin (STZ) secara intravena (diambil dari vena lateralis atau pembuluh darah ekor)

3.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus tidak aktif ataupun tampak sakit
2. Tikus obesitas dengan indeks Lee $> 0,3$ dan tidak mencapai status diabetes melitus setelah diinjeksi Streptozocin.

3.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang mati selama penelitian.

3.3.3. Cara Pengambilan Sampel

Menggunakan metode *simple random sampling*, kemudian 24 sampeltikus dibagi kedalam 4 kelompok.

3.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ditentukan menggunakan rumus

Frederer:

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

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

$$3n-5 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

t = banyak kelompok perlakuan

n = jumlah sampel minimal per kelompok

Pada penelitian ini untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen, dilakukan koreksi dengan $1/(1-f)$ dimana f adalah proporsi unit eksperimen yang hilang atau mengundurkan diri atau drop out. Berdasarkan perhitungan dibutuhkan minimal jumlah sampelsebanyak 20 ekor tikus. Antipasti kepada kelompok drop out sebanyak10% sehingga total jumlah sebanyak 24 ekor tikus. Masing masing tikus akan diletakkan di kandang masing-masing dengan

temperature dibuat konstan, kelembapan 55% dan 12:12 jam siklus gelap terang. Setelah itu tikus dimasukkan ke dalam satu dari 4 kelompok secara random. Masing-masing kelompok akan menjalani diet induksi obesitas yang sudah ditentukan selama 4 minggu sampai mencapai nilai indeks Lee $> 0,3$ dimana nilai ini merupakan hasil bagi dari akar berat badan dalam gram dikali sepuluh dikalikan dengan panjang naso anal dalam milimeter (Firdaus *et al.*, 2016)

Selanjutnya dilakukan pemberian injeksi streptozocin dalam natrium sitrat buffer pH 4,5 intraperitoneal dosis tunggal 45 mg/kgBB untuk menginduksi model diabetes pada tikus wistar. Setelah 3 hari kemudian dilakukan perlakuan serta perawatan selama 10 hari, selamapenelitian dilakukan tikus akan dipantau berat badannya dan juga dilihat apakah ada komplikasi.

3.4. Instrumen dan Bahan

3.4.1. Instrumen

1. Set bedah *sleeve gastrectomy* dan omentoplasti pankreas
2. Set alat pemeriksaan jumlah sel beta pankreas dan kadar vgef
3. Timbangan berat badan untuk tikus
4. Kassa steril
5. Doek steril
6. Handschoen steril
7. Benang jahit polyglycolic acid 4.0 dan polypropylene 3.0
8. Spuit 1 cc dan jarum 27G

9. Lampu operasi
10. Nampan steril
11. Linen steril

3.4.2. Bahan

1. Infus NaCl 0.9%
2. Povidone-iodine
3. Alcohol 70%

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Penggemukan Tikus

1. Penggemukan tikus dilakukan dengan cara diberikan diettinggi kalorigan tinggi lemak selama 4 minggu yang terdiri dari comfeed pars 60%, terigu 27,8%, kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, lemak babi 10% danfruktosa 2ml/ekor/hari.
2. Pemberian diet tinggi kalori dan lemak ini dilakukan selama4 minggudengan diet diberikan dalam bentuk bubuk.

3.5.2. Induksi Diabetes Tipe 2

Semua tikus dalam penelitian ini akan diinjeksi STZ intravena (pembuluh darah ekor) dengan dosis 45 mg/kgBB selama 5 hari berturut-turut dengan spuit 1cc, dan juga diberikan minum yang berisi larutan sukrosa 30% secara ad libitum.

Untuk pengukuran glukosa darah puasa dilakukan selama 4-6 jamsetelah tikus puasa (diambil dari vena lateralis atau pembuluh

darah ekor) dan untuk penimbangan berat badan tikus akan dilakukan 5 hari setelah tikus disuntikan STZ yang terakhir. Tikus dinyatakan diabetes bila kadar glukosa darah puasa >126mg/dL (Marliyati dan Roosita, 2016).

3.5.3. Pengukuran Kadar Glukosa dan Insulin (HOMA-IR) untuk validasi

1. Mengukur kadar glukosa darah puasa dan insulin serum yang dievaluasi dengan *kit* glukosa dan insulin.
2. Prosedur kerja *kit* glukosa dan insulin dilakukan mengikuti standar yang sudah disiapkan pada instruksi yang tersedia di dalam *kit*.
3. Pengukuran kadar glukosa dan insulin dilakukan untuk validasi dengan cara mengukur resistensi insulin menggunakan teknik *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR) dengan rumus :

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Gula darah puasa (mg/dl)} \times \text{Insulin puasa } (\mu\text{U/ml})}{405}$$

3.5.4. Teknik Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Seluruh proses akan dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2* dengan menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan Teknik sterilisasi yang tinggi.

1. Kumpulkan tali pusar lalu simpan dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0,9%. Apabila tidak langsung diproses, maka

akan disimpan pada suhu 4°C.

2. Dengan menggunakan pinset letakkan tali pusar ke petri dish dan cuci tali pusar hingga bersih dengan *phosphate buffered saline* (PBS)
3. Potong tali pusar dengan pisau steril menjadi 3-5 cm
4. Buang pembuluh darah yang berada dalam potongan tali pusar
5. Pindahkan potongan tali pusar 3-5cm ke cawan petri yang bersih
6. Dengan gunting mata tajam atau dengan bisturi hancurkan tiap potongan tali pusar hingga menjadi potongan-potongan kecil 1mm
7. Tempatkan hasil potongan tali pusar pada cawan kultur jaringan 60mm menggunakan pinset dengan susunan titik-titik yang tersebar rata pada permukaan cawan kultur jaringan
8. Bersihkan medium komplit (MEM yang ditambahkan dengan fungizone, penstrep, dan FBS) sebanyak 2-3ml
9. Inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂
10. Amati tiap 24 jam untuk melihat adanya sel yang keluar dari spot penanaman explant (kira-kira 14 hari akan muncul sel dari explant)
11. Tiap 2-3 hari sekali ganti medium dengan membuang separuh medium menggunakan mikropipet diganti dengan fresh medium komplit sebanyak yang dibuang
12. Tambahkan medium komplit menjadi 5ml setelah sel explant muncul

13. Setelah 24-72jam dari munculnya sel explan, pindahkan sel yang mengapung ke cawan petri jaringan yang baru dengan cara:
14. Ambil seluruh medium dan kemudian masukkan ke *conical tube* 15ml
15. Sentrifuge 200rpm selama 10 menit
16. Buang supernatant
17. Resuspensi pellet dengan medium komplit

3.5.5. Kultur Sel Punca

1. Tanam pada cawan petri jaringan
2. Inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂
3. Ganti setengah medium tiap 2-3 hari sekali sampai sel konfluens 80%

3.5.6. Proses Pemanenan Sel

1. Pemanenan sel dilakukan dengan menggunakan panen selketiga yang dipindahkan pada *coverslip*
2. Bersihkan wadah medium menggunakan PBS 1ml dan tripsin 1ml untuk memisahkan antara medium dengan sel
3. Inkubasi dalam incubator dengan suhu 37°C selama 3 menit
4. Pastikan sel sudah lepas melalui mikroskop
5. Jika sudah lepas, ambil tripsin dan PBS menggunakan mikropipet
6. Kemudian ganti dengan medium komplit

3.5.7. Proses Perhitungan Sel

1. Siapkan 10µl sel dan masukkan pada *cryotube*
2. Tambahkan triptofan blue 90µl ke dalam *cryotube*
3. Ambil 10µl menggunakan pipet dan taruh di bilik hitung yang sudahdi tutup dengan menggunakan *deck glass*
4. Lihat menggunakan mikroskop inverted pada 4 bilik hitung
5. Hitung jumlah sel dengan menggunakan rumus:

$$\sum n \times 10^4 \times \text{Pengenceran}^4$$

3.5.8. Operasi *Sleeve Gastrectomy*

1. Tikus dipuasakan selama 10 jam sebelum dilakukan operasi
2. Injeksikan ketamin dengan dosis 0,5mg/kgBB secara intramuskular dipaha tikus
3. Bersihkan bulu di bagian perut menggunakan pencukur rambut hinggatampak kulit tikus
4. Dilakukan aseptis dan antiseptis pada daerah operasi
5. Dilakukan insisi transversal subcosta sinistra mulai dari processus xyphoideus hingga ke lateral abdomen
6. Perdalam lapis demi lapis cutis, subcutis, musculus hingga peritoneum dan cavum intraperitoneal
7. Identifikasi gaster dan lakukan *partial gastrectomy* 80 % dari volume normal dengan pengangkatan sebagian gaster pada kurvatura mayor, menggunakan klem terlebih dahulu untuk

meminimalisir perdarahan

8. Jahit gaster menggunakan *polyglycolic acid* 4.0
9. Bersihkan cavum abdomen menggunakan NaCl 0,9%
10. Jahit luka operasi menggunakan *polypropylene* 3.0

3.5.9. Operasi Omentoplasti Pankreas

1. Puasakan tikus selama 10 jam sebelum dilakukan operasi
2. Dilakukan injeksikan ketamine dengan dosis 0,5mg/kgBB secara intramuskular di paha tikus
3. Bersihkan bulu pada bagian perut menggunakan pencukur rambut hingga tampak kulit tikus
4. Lakukan aseptis dan antiseptis pada daerah operasi
5. Lakukan insisi transversal subcostal sinistra mulai dari processus xiphoideus hingga ke lateral abdomen
6. Perdalam lapis demi lapis cutis, subcutis, musculus hingga peritoneum dan cavum intraperitoneal
7. Identifikasi omentum dan lakukan penjahitan omentum mayor ke pankreas menggunakan *polyglycolic acid* 4.0
8. Bersihkan cavum abdomen menggunakan NaCl 0,9%
9. Jahit luka operasi menggunakan *polypropylene* 3.0

3.5.10. Operasi Sleeve Gastrectomy dan Injeksi Mesenchymal Stem Cell

1. Puasakan tikus selama 10 jam sebelum dilakukan operasi
2. Injeksikan ketamin dengan dosis 0,5mg/kgBB secara

intramuskular dipaha tikus

3. Bersihkan bulu pada bagian perut menggunakan pencukur rambuthingga tampak kulit tikus
4. Lakukan asepsis dan antisepsis pada daerah operasi
5. Lakukan insisi transversal subcosta sinistra mulai dari processus xyphoideus hingga ke lateral abdomen
6. Perdalam lapis demi lapis cutis, subcutis, musculus hingga peritoneumdan cavum intraperitoneal
7. Identifikasi gaster dan lakukan *partial gastrectomy* sepanjang *curvatura mayor* menggunakan klem terlebih dahulu untuk meminimalisir perdarahan
8. Jahit gaster menggunakan *polyglycolic acid* 4.0
9. Bersihkan cavum abdomen menggunakan NaCl 0,9%
10. Jahit luka operasi menggunakan *polypropylene* 3.0
11. Injeksikan *Mesenchymal Stem Cell* dengan dosis 1×10^6 sel secara intraperitoneal

3.5.11. Prosedur Perawatan Pasca Operasi

1. Setelah dilakukan operasi, letakkan tikus pada kendang hangat dantutupi menggunakan selimut untuk mencegah hipotermia
2. Ganti balutan luka operasi setelah 3 hari kemudian bersihkan denganmenggunakan NaCl dan berikan gentamycin salep

3.5.12. Pengukuran jumlah sel Beta pankreas Pasca Perlakuan

1. Ekspresi jumlah sel Beta pankreas dievaluasi dengan *Immunohistokimia*
2. Ambil *slide* sampel dari kulkas 4 °C dan diamkan pada suhu ruang selama ±30 menit, kemudian dilakukan proses deparafinisasi dengan merendam sampel masing masing selama 5 menit dilakukan proses rehidrasi dengan mencelupkan *slide* sampel pada rak *staining* logam kedalam etanol masing selama 3 menit,dan cuci pada air mengalir selama 5 menit
3. Proses selanjutnya yaitu *Antigen retrieval* dengan merendam *slide* dalam *citrate buffer* 1x pH 6,5 dan masukkan dalam Decloaking Chamber (Biogear) selama 30 menit pada suhu 90⁰C Keluarkan *glass jar* dari *microwave* dan diamkan hingga mencapai suhu ruang (±30 menit). Setelah selesai keluarkan ke suhu ruang hingga *slide* dingin
4. *slide* dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali
5. blocking peroksidase endogen dengan H₂O₂ selama 5 menit
6. *slide* dicuci kembali dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali
7. *blocking background* dengan meneteskan larutan *Background Sniper* (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) pada jaringan per *slide* dan diinkubasi selama 20 menit
8. *slide* dikeringkan dengan menggunakan tisu pada permukaan

bawahnya dan sekitar jaringan tanpa merusak jaringan dan ditambahkan *first Antibody* sebanyak 70-100 μL

9. Tutup *humidity chamber* dan simpan di dalam kulkas 4 $^{\circ}\text{C}$ *overnight*.
10. Ambil *slide* sampel dari kulkas 4 $^{\circ}\text{C}$ dan diamkan pada suhu ruang selama ± 30 menit hingga mencapai suhu ruang
11. cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, bersihkan jaringan dan tetesi secondary antibody Trekkie Universal Link
12. inkubasi selama 60 menit pada suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit
13. tetesi TreAvidin-HRP Label
14. inkubasi selama 45 menit pada suhu ruang
15. cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi DAB 1:400 (1 μL Betazoid DAB Chromogen + 400 μL Betazoid DAB)
16. inkubasi 3 menit dalam ruangan gelap
17. cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit
18. lakukan counterstaining dengan mencelupkan dalam Mayer Hematoksilin (Bio-Optica Milano S.p.A) selama 3 menit
19. cuci slide menggunakan air mengalir selama selama 5 menit
20. lakukan dehidrasi dengan mencelupkan *slide* sampel pada rak *staining* logam kedalam etanol, masing-masing 3 menit

21. proses clearing dengan mencelupkan slide pada xylene masing masingselama 5 menit
22. mounting jaringan dengan entellan
23. identifikasi dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan dihitungdala 5 lapang pandang.

3.5.13. Pengukuran Kadar VEGF Pasca Pengukuran

1. Ekspresi kadar VEGF dievaluasi dengan *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR).
2. Sampel pankreas diambil dari RNA later dan ditimbang 50-100 mg kemudian dipotong sampai kecil-kecil dan halus, kemudian dimasukkan kedalam tabung yang telah berisi 1 mL Tri Reagen (*Sigma-Aldrich, MO, USA*)
3. Potongan organ ditumbuk menggunakan *micropastle*, ditambahkan lagi Tri Reagen (*Sigma-Aldrich, MO, USA*) sebanyak 0,5 mL dan inkubasi di suhu ruang selama 5 menit.
4. Tambahkan 0,2 mL khloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit
5. Sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4⁰C hingga larutan dalam tabung terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris- debris sel.

6. Lapisan paling atas diambil 0,6 mL dan dipindahkan ke tabung sentrifus baru dan ditambahkan isopropanolol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
 7. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C.
 8. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasartabung.
 9. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (*Diethyl pyrocarbonat*) DEPC lalu bolak balikkan berulang kali dan disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4⁰C
 10. Kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30- 50 µL
 11. Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit.
 12. Didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C.
 13. RNA dikuantifikasi dengan *fluorometer Quantus (Promega, Madison, WI, USA)* dengan cara membuat *TE buffer* 1x dengan menambahkan 1ml 20X *TE buffer* dengan 19 ml *Nuclease Free Water, Mix* dengan *vorteks /spin down* dan kemudian disimpan pada suhu ruang
2. Siapkan larutan kerja dengan *High standard calibration* (10- 500 ng/ul) dan *Low standard calibration* (0,1 – 10 ng/ul), untuk

standar tinggi dengan menambahkan 10 μ l *Quantifluor RNA dye* dengan 3990 μ l 1X TE buffer, *mix* dengan *vorteks /spindown*, sedangkan *low* standar dengan menambahkan 2 μ l *Quantifluor RNA dye* dengan 3998 μ l 1xTE buffer, *mix* dengan *vorteks /spindown*, dan simpan di es / suhu - 20°C untuk penyimpanan jangka panjang selain itu juga disiapkan *blank* dengan menambahkan 200 μ l larutan kerja *Quantifluor RNA dye* dalam 0.5 ml *Tube PCR*.

3. sampel standar RNA tinggi dengan menambahkan 5 μ l RNA standar dengan 200 μ l larutan *Quantifluor RNA* dalam 0.5 ml *Tube PCR*, *mix* dengan *vortex*, inkubasi dalam keadaan gelap selama 5 menit, ukur nilai standar, untuk *low standard calibration*, buat 10mg *standard* dengan mengencerkan 10 μ l RNA standar dengan 990 μ l 1X TE Buffer, *mix* dengan *vortex*, ambil 10 μ l dari larutan RNA diatas dan tambah dengan 200 μ l *Quantifluor RNA dye* dalam 0.5 ml *tube*, *mix* dengan *vortex*, inkubasi dalam keadaan gelap selama 5 menit, ukur nilai standar.

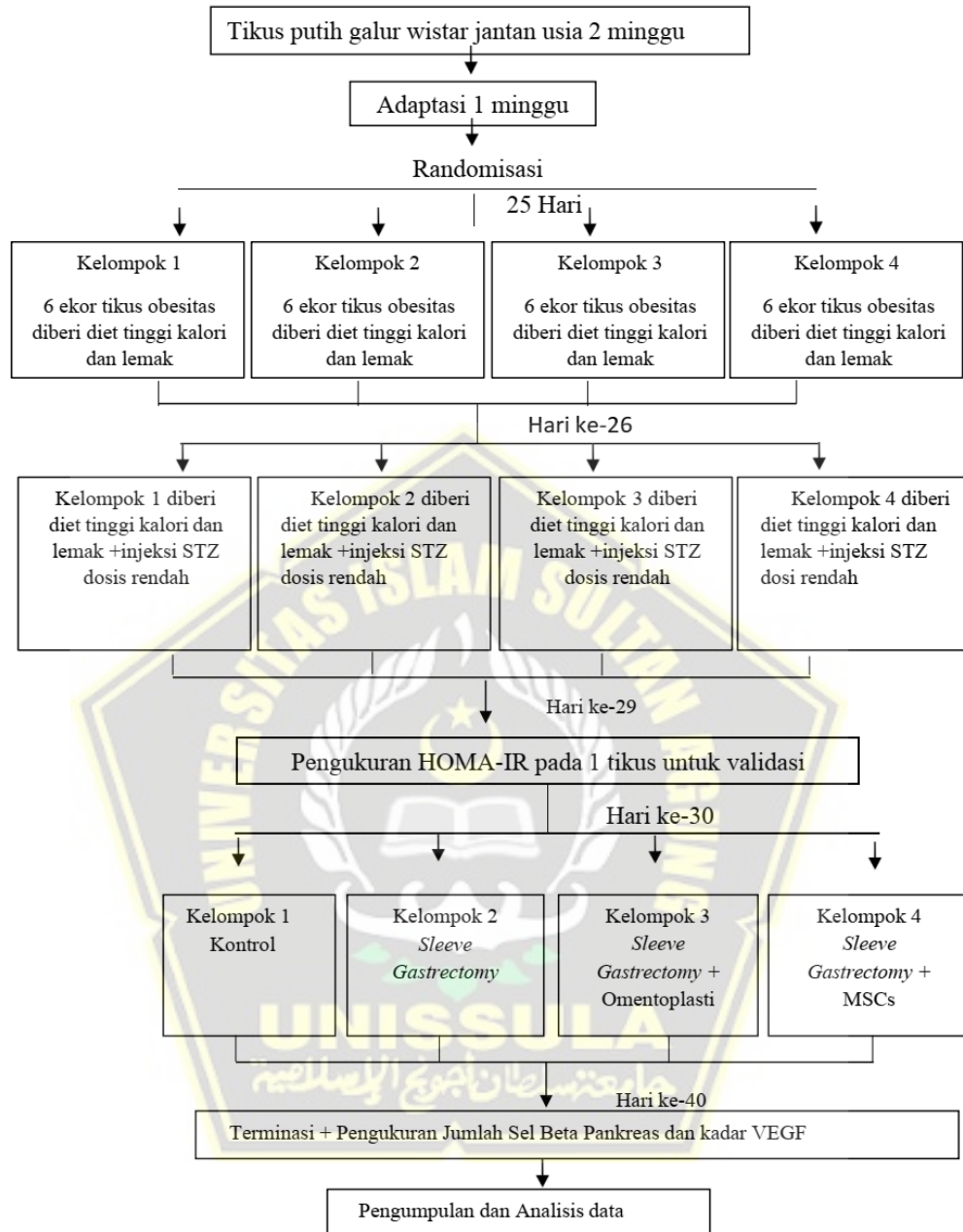
4. pengukuran sampel RNA dilakukan dengan menambahkan 1-20 μ l sampel RNA dalam 200 μ l *Quantifluor RNA dye* dalam 0.5ml PCR *tube mix* dengan *vortex*, inkubasi dalam keadaan gelap selama 5 menit ukur konsentrasi sampel. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 mg.

5. Sintesis cDNA dengan cara menambahkan reagen ke dalam *tubemikrosentrifuge* 200 / 500 μL .
6. Resuspensi perlahan dan sentrifuge singkat dengan *spinner*, masukkan *tube* ke *thermal cycler* (PCR) dan inkubasi dengan suhu 70°C selama 10 menit kemudian ambil *tube*, taruh pada *freezing block* dan tambahkan 10X *buffer for eAMV-RT*, *Enhanced avian RT*, *RNase inhibitor*, *Water PCR reagent* / *Nuclease Free Water*.
7. masukkan *tube* ke *thermal cycler* (PCR) dan inkubasi dengan suhu $45-50^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. keluarkan *tube*, dan sampel dalam *tube ready* untuk dianalisis atau disimpan di -20°C .
8. Ekspresi mRNA VEGF dianalisis menggunakan *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)* menggunakan *Kappa SYBR Fast Master Mix 2 \times* (KAPA Biosystem, KK4600, MassachusettsUSA)
9. Campuran dari 2 μL cDNA sampel, *primer forward* dan *reverse* masing masing 0,6 μL , *SYBR Fasn masrer mix universal* sebanyak 10 μL dan *PCR water* 6,8 μL atau sampai volume total mix sebanyak 20 μL
10. *Assay master mix* yang telah mengandung cDNA kemudian dimasukkan ke dalam mesin qPCR *Illumina's Eco Real-Time PCR System* dengan program amplifikasi 40 siklus yaitu :
 - a. denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit,

- b. denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit,
 - c. *annealing* disesuaikan dengan gen target selama 1 menit,
 - d. *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit.
11. Sinyal *fluorescence* diukur selama amplifikasi dan hasil diperoleh berupa nilai *cycle of threshold (CT)* pada setiap sampel yang diperiksa.



3.6. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

3.7. Tempat dan Waktu

3.7.1. Tempat penelitian

Perawatan, perlakuan tindakan pembedahan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU UGM Yogyakarta. Sedangkan pemeriksaan jumlah Sel Beta Pankreas dan kadar VEGF dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

3.7.2. Waktu penelitian

Penelitian dengan pemeliharaan hewan percobaan dilakukan pada bulan Agustus – November 2021.

3.8. Analisis Hasil

Data hasil penelitian dikumpulkan kemudian diolah. Analisis data hasil penelitian menggunakan program komputer Statistical Product dan ServiceSolution (SPSS) meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis.

Uji normalitas Shapiro-Wilk untuk menguji abnormalitas data dan sebagai syarat uji parametri. Jika data terdistribusi normal perbedaan jumlah sel beta pankreas terhadap kadar VEGF akan diuji menggunakan uji *One Way ANOVA* antar masing-masing kelompok. Jika syarat ujian parametrik tidak terdistribusi normal atau tidak terpenuhi, data akan diuji menggunakan data non parametrik *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan *Mann Whitney*.

Batas derajat kemaknaan apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan.



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian “pengaruh omentoplasti pankreas dan *mesenchymal stem cells* terhadap jumlah sel beta pankreas dan kadar VEGF pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*” telah dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU UGM Yogyakarta dan Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang pada bulan September hingga bulan Oktober 2021. Penelitian dilakukan terhadap 24 tikus putih jantan galur wistar yang telah dibagi menjadi 4 kelompok. Penelitian ini dilakukan selama 47 hari dan dilanjutkan dengan pengolahan data dan dianalisis. Disini tikus penelitian adalah tikus putih galur wistar jantan usia 2 minggu yang sudah diadaptasi terlebih dahulu selama 1 minggu kemudian dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok pertama (K1) diberi perlakuan laparatomi (Sham), kelompok kedua (K2) diberi perlakuan *sleeve gastrectomy*, untuk kelompok ketiga (P1) pada post tindakan *sleeve gastrectomy* dilakukan tindakan omentoplasti, dan kelompok keempat (P2) pada post tindakan *sleeve gastrectomy* dilakukan pemberian MSCs.

Jumlah sel Beta Pankreas dievaluasi dengan *Immunohistokimia* (IHC) sedangkan kadar VEGF yang diperiksa kadarnya menggunakan qRT-PCR

4.1.1. Analisis Deskriptif

4.1.1.1. Konfirmasi Tikus Sampel Penelitian

Tabel 4.1. Hasil Konfirmasi Kondisi Obesitas dan Resistensi Insulin

Kondisi	Parameter	Hasil
Obesitas	BB (gram)	260
	Panjang Nasoanal (cm)	19,75
	Indeks Lee	323,16
Resistensi Insulin	Kadar Insulin Puasa	123,79
	Kadar GDP	259
	Nilai <i>cut-off</i> HOMA-IR	84,92

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa tikus telah terkonfirmasi positif obesitas, dilihat dari Indeks Lee yang menunjukkan nilai lebih dari 300. Tikus juga terkonfirmasi positif resistensi insulin dengan DM tipe 2 yang terlihat dari nilai *cut-off* HOMA-IR.

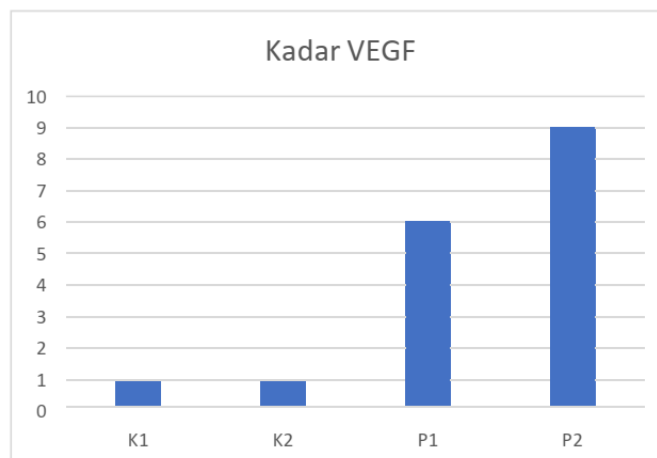
4.1.1.2. Deskriptif Data

1. Kadar VEGF

Data kadar VEGF yang diperoleh akan diolah datanya terlebih dahulu sebelum dilanjutkan uji analisis menggunakan SPSS. Hasil olah data dilampirkan dalam bentuk tabel dan grafik berikut.

Tabel 4.2. Hasil Rerata kadar VEGF

Kelompok	Mean \pm SD	Median
K1	0,7233 \pm 0,31411	0,7150
K2	1 \pm 0	1
P1	6,5050 \pm 1,41435	6.1950
P2	8,1500 \pm 2,47397	9.1600



Gambar 4.1. Median Kadar VEGF

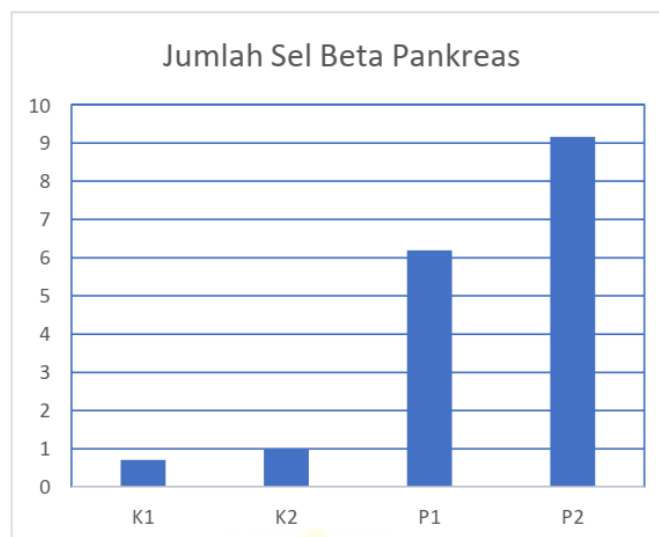
Dari tabel 4.2 dan gambar 4.1 disimpulkan terjadi peningkatan kadar VEGF pada kelompok perlakuan dibandingkan kontrol. Hasil median kadar VEGF apabila dilihat pada grafik kelompok K1 merupakan kelompok terendah dan tertinggi pada kelompok P2.

2. Jumlah Sel Beta Pankreas

Data jumlah Sel Beta Pankreas yang diperoleh akan diolah datanya terlebih dahulu sebelum dilanjutkan uji analisis menggunakan SPSS. Hasil olah data dilampirkan dalam bentuk tabel dan grafik berikut.

Tabel 4.3. Hasil Rerata Jumlah Sel Beta Pankreas

Kelompok	Mean ± SD	Median
K1	0,7233±0,31411	0,7150
K2	1±0	1
P1	6,5050±1,41435	6,1950
P2	8,1500±2.47397	9,1600



Gambar 4.2. Median Jumlah Sel Beta Pankreas

Dari tabel 4.3 dan gambar 4.2 disimpulkan terjadi peningkatan jumlah sel beta pankreas pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil median jumlah Sel Beta Pankreas apabila dilihat pada grafik kelompok K1 merupakan kelompok terendah dan tertinggi pada kelompok P2.

4.1.1.3. Distribusi Data

1. Kadar VEGF

Data yang telah diperoleh selanjutnya akan dianalisis dengan uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilk. Berikut adalah uji normalitas kadar VEGF

Tabel 4.4. Hasil Uji Normalitas Kadar VEGF

Kelompok	P
K1	0,962*
K2	0,878*
P1	0,467*
P2	0,191*

Ditemukan bahwa distribusi data yang normal ($p>0,5$) pada semua kelompok setelah dilakukan tranformasikan data. Dikarenakan distribusi normal, kita menggunakan tes parametrik. Maka dilakukan uji homogenitas terlebih dahulu.

Tabel 4.5. Uji Homogenitas

C	P
K1	0,000
K2	
P1	
P2	

Signifikansi menunjukkan 0,000 ($p>0,05$) maka ditarik kesimpulan bahwa tidak terdapat varian data yang homogen dari keempat kelompok penelitian.

2. Jumlah Sel Beta Pankreas

Tabel 4.6. Uji normalitas sel beta pankreas

Kelompok	P
K1	0,609*
K2	0,902*
P1	0,180*
P2	0,285*

Dikarenakan sampel perkelompok kurang dari 50, maka *Test of Normality* yang digunakan adalah *Shapiro-WilkTest*. Ditemukan bahwa distribusi data yang normal ($p>0,05$) hanya pada semua kelompok.

Dikarenakan distribusi normal, kita menggunakan tesparametrik. Maka dilakukan uji homogenitas terlebih dahulu.

Tabel 4.7. Uji Homogenitas

Kelompok	P
K1	0,170*
K2	
P1	
P2	

**Test of Homogeneity of Variances ($p>0,05$)*

Signifikansi menunjukkan 0,170 ($p>0,05$) maka ditarik kesimpulan bahwa terdapat varian data yang homogendari keempat kelompok penelitian.

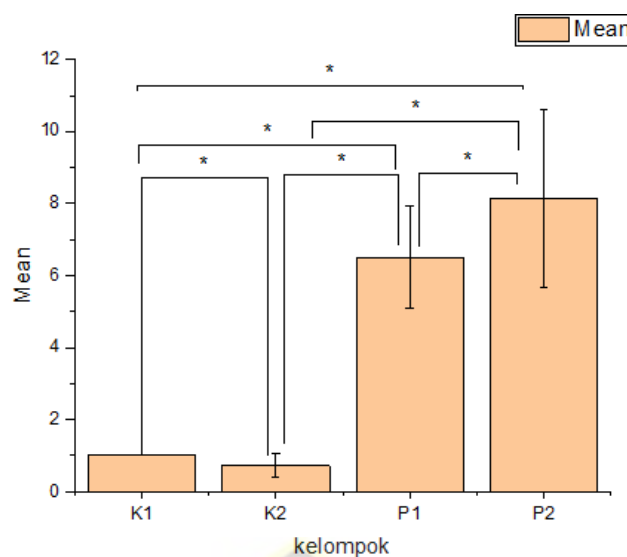
4.1.2. Analisis Bivariat

4.1.2.1. Kadar VEGF

Dari hasil distribusi data kadar VEGF dapat ditarik kesimpulan bahwa setidaknya terdapat varian data yang homogen dari keempat kelompok penelitian. Data masih tetap dapat diuji dengan uji parametrik *One Way Anova* dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 4.8. Hasil Uji Parametrik *One way Anova* Kadar VEGF

Kelompok	P
K1	0,000*
K2	
P1	
P2	



Signifikansi menunjukkan 0,000 ($p < 0,05$) maka ditarik kesimpulan bahwa setidaknya terdapat perbedaan rerata kadar VEGF yang signifikan dari keempat kelompok penelitian. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc *Tamhane's T2* dikarenakan data normal tetapi tidak homogen dan didapatkan hasil pada tabel berikut.

Tabel 4.9. Hasil Post Hoc Tamhane's T2

Kelompok	Uji	P
K1	P1	0,001*
	P2	0,004*
K2	P1	0,001*
	P2	0,005*

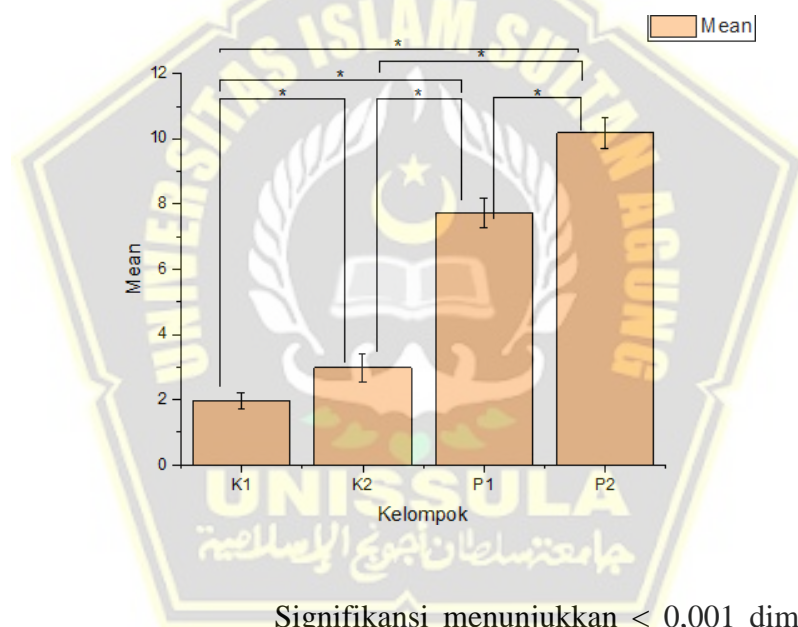
Berdasarkan tabel diatas, dapat disimpulkan bahwa hasil dari *Post Hoc Tamhane's T2* terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K1 dengan kelompok K2.

4.1.2.2. Jumlah Sel Beta Pankreas

Dari hasil distribusi data jumlah Sel Beta Pankreas terdapat varian data yang homogen dari keempat kelompok penelitian. Data diuji dengan uji parametrik *One Way Anova* dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 4.10. Hasil Uji Parametrik *One way Anova* Jumlah Sel Beta Pankreas

Kelompok	P
K1	0,000*
K2	
P1	
P2	



Signifikansi menunjukkan $< 0,001$ dimana ($p < 0,05$) maka ditarik kesimpulan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel beta pankreas yang signifikan dari keempat kelompok penelitian. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane's T2* dandidapatkan hasil pada tabel berikut.

Tabel 4.11. Hasil *Post Hoc* Tamhane's T2

Kelompok Uji		<i>P</i>
K1	K2	0,000*
	P1	0,000*
	P2	0,000*
K2	P1	0,000*
	P2	0,000*
P1	P2	0,000*

Berdasarkan tabel diatas, dapat disimpulkan bahwa hasil dari *Post Hoc Tamhane's T2* terdapat perbedaan yang signifikan pada semua kelompok.

4.2. Pembahasan

Penelitian dilaksanakan dengan tujuan untuk membuktikan pengaruh omentoplasty pankreas dan mesenchymal stem cells terhadap sel beta pankreas dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada tikus obese yang dilakukan *sleeve gastrectomy*. Penelitian ini mengambil 4 kelompok, Kelompok pertama (K1) diberi perlakuan laparatomi (Sham), kelompok kedua (K2) diberi perlakuan *sleeve gastrectomy*, untuk kelompok ketiga (P1) pada post tindakan *sleeve gastrectomy* dilakukan tindakan omentoplasti, dan kelompok keempat (P2) pada post tindakan *sleeve gastrectomy* dilakukan pemberian MSCs.

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah sel beta pankreas pada kelompok yang diberi MSCs. Peningkatan jumlah sel beta pankreas terjadi akibat MSCs memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri dan berdiferensias menjadi sel yang lebih spesifik termasuk menjadi sel beta pankreas. hal ini sesuai dengan penelitian Agung Putra *et al* yang menyatakan

bahwa sel beta pankreas mampu menunjukkan pencapaian hasil yang baik dalam memperbaiki resistensi insulin pada penderita DM (Putra *et al.*, 2018).

Pada kelompok omentoplasti juga terjadi peningkatan namun tidak seperti pada kelompok P2. Dikarenakan Omentum memiliki sifat imunomodulator yang dapat menurunkan terjadinya inflamasi dan menyebabkan perbaikan pada sel beta pankreas sehingga resistensi insulin dapat menurun. Meskipun pemberian omentoplasti post tindakan *sleeve gastrectomy* tidak terlalu signifikan dibandingkan dengan pemberian MSCs, tetapi terbukti dapat menyebabkan perbaikan pada sel beta pankreas.

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan kadar VEGF pankreas pada kelompok yang diberi MSCs. MSCs juga dapat mensekresi berbagai molekul bioaktif secara parakrin seperti VEGF. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan pada orang obesitas terjadi penurunan kemampuan angiogenesis di beberapa organ, mRNA berperan penting pada proses angiogenesis, dimana polimorfisme dari gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dapat mempengaruhi ekspresi dari mRNA. VEGF juga dapat merangsang faktor jaringan protein trombogenik yang memiliki peran penting dalam proses angiogenesis. (Frisca *et al.*, n.d.). VEGF sangat berperan dalam peningkatan regenerasi vaskuler, angiogenesis, dan pengurangan jumlah sel apoptosis. Jadi apabila terdapat perbaikan sel, MSCs akan melepaskan beberapa growth factor yang umumnya digunakan sebagai indikator pertumbuhan sel islet di pankreas.

Pada orang dengan obesitas kondisi lemak yang terakumulasi dalam

tubuh dapat menyebabkan terjadinya inflamasi kronik derajat rendah dan dapat berujung kepada resistensi insulin, kondisi resistensi insulin mengakibatkan tubuh berusaha mengatasi defisiensi insulin dengan cara meningkatkan sekresi insulin oleh sel beta pankreas, sel beta dari Langerhans pankreas juga berperan penting dalam sekresi insulin. Insulin disintesa oleh sel β dari islet pankreas Langerhans sebagai proinsulin. Sel-sel pulau langerhans dipersarafi oleh saraf adenergenik dan kolinergenik yang dapat menghambat sekresi insulin.

Hasil pengukuran dapat ditarik kesimpulan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok yang mendapatkan *sleeve gastrectomy* dan pemberian MSCs dengan kelompok perlakuan lain. Hal ini membuktikan pemberian MSCs secara intravena terbukti efektif dalam menurunkan mediator inflamasi pada obesitas. Pemberian MSCs post *sleeve gastrectomy* mampu menimbulkan sinyal homing yang menyebabkan MSCs mampu bermigrasi ke organ pankreas. MSCs akan bertransmigrasi melalui *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) dan *G-protein-coupled receptor signalling*. Sel yang telah bertransplantasi dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel yang menggantikan sel yang mengalami kerusakan dan menginduksi restorasi dari fungsi organ pankreas. Hal ini sejalan dengan didapatkannya peningkatan kadar VEGF pada kelompok K2. Membuktikan bahwa penurunan sitokin pro inflamasi diikuti dengan peningkatan sitokin anti inflamasi. VEGF merupakan glikoprotein yang berperan penting dalam vaskulogenesis selama embriogenesis dan pembentukan pembuluh darah

baru (angiogenesis), adanya VEGF ini menjadi parameter untuk menilai pertumbuhan vaskuler di pankreas (Revilla, 2017). efek MSC meningkatkan kadar VEGF secara signifikan dibandingkan kelompok sleeve tanpa diinduksi apapun, maka ditarik kesimpulan bahwa MSCs mampu mensekresi *growth* atau *bioactive factors*, yang memiliki potensi regeneratif dan perbaikan fungsi fisiologis secara lokal maupun sistemik.

Pemberian MSCs post tindakan *sleeve gastrectomy* dapat membuat MSCs berdiferensiasi menjadi sel beta pankreas yang matur, dan efek immunomodulator dari MSC dapat mengatur keseimbangan antara kerusakan sel beta langerhans pankreas dan regenerasinya. Sel beta pankreas juga memproduksi IL-10 yang dapat mengontrol inflamasi, IL-10 dapat mempengaruhi fungsi sel mast dan secara signifikan memperluas aktivitas pertumbuhan faktor stem cells.

Penelitian ini memiliki keterbatasan antara lain penelitian tidak menilai ekspresi sitokin anti inflamasi seperti IL-10 dimana pada orang obesitas memiliki keterkaitan yang erat dengan terjadinya proses inflamasi kronis dalam derajat rendah. Pada penelitian ini juga tidak menilai jumlah sel beta pulau langerhans yang juga memiliki peran penting dalam terjadinya resistensi insulin.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Omentoplasti pankreas dan injeksi MSCs dapat meningkatkan kadar VEGF pada tikus obesitas kelompok *sleeve gastrectomy* dibandingkan kelompok kontrol.
- 5.1.2. Omentoplasti pankreas dan injeksi MSCs dapat meningkatkan jumlah sel beta pankreas pada tikus obesitas kelompok *sleeve gastrectomy* dibandingkan kelompok kontrol.
- 5.1.3. Injeksi MSCs memberikan peningkatan lebih besar terhadap kadar VEGF dan Jumlah Sel Beta Pankreas pada tikus obesitas yang dilakukan *sleeve gastrectomy* dibandingkan dengan omentoplasti pankreas

5.2. Saran

- 5.2.1. Dilakukan penelitian untuk menilai ekspresi sitokin anti inflamasi seperti IL-10
- 5.2.2. Dilakukan penelitian untuk menilai sel langerhans

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-Ghani, M.A., Ralph A.D. (2010). Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol.(1):1-19. Available from: <https://doi.org/10.1155/2010/476279> (Accessed 20 April 2021)
- Asri, S. (2015). Hubungan Indeks Massa Tubuh Dengan Kadar Leptin dan Adiponektin. *Jurnal Undip*. Vol.4(4):428–434. Available from: <https://doi.org/10.14710/jnc.v4i4.10121> (Accessed 25 April 2021)
- Azapira, N., Kaviani, M., Salehi, S. (2015). The Role of Mesenchymal Stem Cells in Diabetes Mellitus. *Int J Stem Cell Res Ther*. Vol.2(2): 1-5. (Accessed 25 April 2021)
- Badan Litbang Kemenkes RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar (National Health Survey). *Ministry of Health Republic of Indonesia*, (1), hal.1–303. (Accessed 25 April 2021)
- Badan Litbang Kemenkes RI. 2019. Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar. *Kementrian Kesehatan Republik Indonesia*, hal.1–100. (Accessed 25 April 2021)
- Bartholomeus, K., Jacobs-Tulleneers-Thevissen, D., Shouyue, S., Suenens, K., In't Veld, P.A., Pipeleers-Marichal, M., Pipeleers, D.G. dan Hellemans, K. 2013. Omentum Is Better Site Than Kidney Capsule for Growth, Differentiation, and Vascularization of Immature Porcine β -Cell Implants in Immunodeficient Rats. *Transplantation*, 96 (12), hal.1026–1033. Available from: <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e3182a6ee41> (Accessed 27 April 2021)
- BPPSDMK. 2018. Dietitik Penyakit Tidak Menular. hal.117-99 شماره 8; (Accessed 25 April 2021)
- Chambers, A.P., Smith, E.P., Begg, D.P., Grayson, B.E., Sisley, S., Greer, T., Sorrell, J., Lemmen, L., LaSance, K., Woods, S.C., Seeley, R.J., D'Alessio, D.A., Sandoval,
- D.A. 2014. Regulation of gastric emptying rate and its role in nutrient- induced GLP-1 secretion in rats after vertical sleeve gastrectomy. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 306 (4), hal.424–432. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00469.2013> (Accessed 26 April 2021)
- Dehghanifard A, Shahjehani M, Soleimani M, Saki N. The emerging role of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Int J Hematol Oncol Stem*

Cell Res. 2013;7(1):46-7. Available from: PMID: 24505518; PMCID:PMC3913134.. (Accessed 26 April 2021)

Departemen Kesehatan Republik Indonesia RI. (2018). *Riset Kesehatan Dasar: Laporan Nasional 2018*. Jakarta: Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. (Accessed 25 April 2021)

Frisca, F., Sardjono, C.T., Sandra, F. n.d. ANGIOGENESIS : Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. *Angiogenesis*, hal.174–189. Available from: <https://journal.uui.ac.id/khazanah/article/view/3725/3301> (Accessed 27 April 2021)

Hoeben A., Landuyt B., Highley MS, Wildiers, Oosterom HA., Bruijn EA. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev.* Vol.56(4):549–580. Available from: <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.3> (Accessed 27 April 2021)

Kaila, B., Raman, M. 2008. Obesity: A Review of Pathogenesis and Management Strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 22 (1), hal.61–68. Available from: <https://doi.org/10.1155/2008/609039> (Accessed 27 April 2021)

Kalra, K., Tomar, P.C. (2014). Stem Cells: Basics, Classification and Applications. *Am J Phytomed Clin Ther.* Vol.2(7):919-930. Available from: <https://doi.org/10.22270/ajprd.v7i5.558> (Accessed 27 April 2021)

Koca, T.T. 2017. Does obesity cause chronic inflammation? The association between complete blood parameters with body mass index and fasting glucose. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 33 (1). Available from: <https://doi.org/10.12669/pjms.331.11532> (Accessed 26 April 2021)

Lim, J.U., Lee, J.H., Kim, J.S., Hwang, Y. Il, Kim, T.-H., Lim, S.Y., Yoo, K.H.,

Jung, K.-S., Kim, Y.K. dan Rhee, C.K. 2017. Comparison of World Health Organization and Asia-Pacific body mass index classifications in COPD patients. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, Volume 12, hal.2465–2475. Available from: <https://doi.org/10.2147/copd.s141295> (Accessed 27 April 2021)

Maharaj ASR, D'Amore PA. (2007). Roles for VEGF in adult. *Microvasc Res.* Vol.74(2-3): 100–113. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.03.004> (Accessed 27 April 2021)

Marliyati, S.A., Roosita, K. 2016. Model tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin-sukrosa untuk pendekatan penelitian diabetes. *Jurnal Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 12 (1), hal.29–34. (Accessed

2 May 2021)

- Melo, L.C., Silva, M.A.M. da Calles, A.C. do N. 2014. Obesity and lung function: systematic review. *Einstein (São Paulo)*, 12 (1), hal.120–125. Available from: <https://doi.org/10.1590/s1679-45082014rw2691> (Accessed 25 April 2021)
- Nguyen, N.T., Blackstone, R.P., Morton, J.M., Ponce, J. dan Rosenthal, R.J. 2020. *The ASMBS Textbook of Bariatric Surgery. The ASMBS Textbook of Bariatric Surgery*. (Accessed 26 April 2021)
- Panuganti KK, Kshirsagar RK. 2019. *Obesity*. StatPearls. (Accessed 25 April 2021)
- Purnell JQ. 2018. Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. In: Feingold KR, Anawalt B dan Boyce A, ed. *Endotext [Internet]*. South Dartmouth: MDText.com, Inc. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905390/> (Accessed 26 April 2021)
- Sofa, I.M. 2018. Kejadian Obesitas, Obesitas Sentral, dan Kelebihan Lemak Viseral pada Lansia Wanita. *Amerta Nutrition*, 2 (3), hal.228. Available from: <http://dx.doi.org/10.20473/amnt.v2i3.2018.228-236> (Accessed 5 May 2021)
- Suwinawati, E., Hanifah A., Riska R. (2020). Hubungan Obesitas dengan Kejadian Diabetes Melitus Tipe 2 di Pos Pembinaan Terpadu Penyakit Tidak Menular Puskesmas Kendal Kabupaten Ngawi. *Journal of Health Science and Prevention*. Vol.4(2):80-84. Available from: <https://doi.org/10.29080/jhsp.v4i2.388> (Accessed 17 May 2021)
- World Health Organization. 2020a. *Obesity*. (Accessed 10 May 2021)
- World Health Organization. 2020b. *Obesity and overweight*. (Accessed 8 May 2021) Xi, Y., & Bu, S. (2014). Stem Cells Therapy in Diabetes Mellitus. *J Stem Cell Res Ther*. 4: 199. Available from: DOI: 10.4172/2157-7633.1000199 (Accessed 3 June 2021)
- Zakariya, HS., Agung P. (2018). Peran *Mesenchymal Stem Cells* dalam Regulasi PDGF dan Sel Islet pada Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol.30(2):98-102. Available from: <http://jkb.ub.ac.id/index.php/jkb/article/download/2274/658> (Accessed 5 May 2021)