

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM SEL PUNCA  
MESENKIMAL HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI GEN  
TNF- $\alpha$  DAN MCP 1  
(Studi Eksperimental *In vivo* Pada Tikus Obesitas yang diinduksi  
*Streptozotocin* (STZ))**

**Tesis**

Untuk Memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



**Magister Ilmu Biomedik**

**Ihdina Hanifa H. I.**

**MBK. 19.14.01.0153**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG 2023**

**PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM SEL PUNCA  
MESENKIMAL HIPOKSIDA TERHADAP EKSPRESI GEN  
TNF- $\alpha$  DAN MCP-1**

**(Studi Eksperimental In Vivo Pada Tikus Obesitas yang diinduksi  
Streptozotocin (STZ))**

disusun oleh :

**Ihdina Hanifa H. I.**

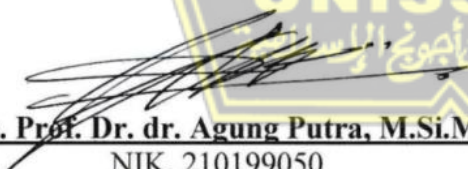
MBK. 19.14.01.0153

Yang dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal \_\_\_\_\_  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima,

Menyetujui,  
Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,

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

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

Mengetahui,

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

  
Assoc. Prof. Dr. Agung Putra, M.Si. Med.  
NIK. 210199050

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan ataupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam dan daftar Pustaka.

Semarang, 07 Agustus 2023

Yang menyatakan,



(Ihdina Hanifa H. I.)

## RIWAYAT HIDUP

### 1. Identitas

Nama : Ihdina Hanifa Hasanah Ibrahim  
Tempat/tanggal lahir : Surabaya, 14 Desember 1995  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Perempuan

### 2. Riwayat Pendidikan

SD Al Azhar : Lulus Tahun 2008  
SMP Negeri 1 Kuta : Lulus Tahun 2011  
SMA Negeri 1 Kuta : Lulus Tahun 2014  
S1 Kedokteran Umum UNISSULA : Lulus tahun 2018  
Profesi Dokter FK UNISSULA : Lulus Tahun 2020  
Magister Biomedik FK UNISSULA : 2019 - sekarang

### 3. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua  
Ibu : Vini Widiastuti  
Ayah : Drs. Bambang Widjanarko

## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa, atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga proposal tesis dengan judul “Pengaruh Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Ekspresi Gen TNF- $\alpha$  Dan MCP-1 (Studi Eksperimental *In vivo* Pada Tikus Obesitas Yang Diinduksi *Streptozotocin* (Stz)” ini dapat diselesaikan.

Proposal tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada :

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. Gunarto, S.H., M.Hum
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med.
4. Bapak Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.

5. Ibu Dr.Ir.Hj.Titiek Sumarawati, M.Kes atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing kedua.
6. Ibu Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH. selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Bapak Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku dosen penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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



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

Semarang, 07 Agustus 2023  
Penulis,



(Ihdina Hanifa H. I.)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN .....	iii
RIWIYAT HIDUP .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR SINGKATAN .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
ABSTRAK .....	xvi
<i>ABSTRACT</i> .....	xvii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Umum .....	4
1.4. Tujuan Khusus .....	4
1.5. Manfaat Penelitian .....	4
1.5.1. Manfaat Teoritis .....	4
1.5.2. Manfaat Praktis .....	4
1.6. Originalitas Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1. <i>Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	8
2.1.1. Definisi TNF- $\alpha$ .....	8
2.1.2. Faktor yang Mempengaruhi Peningkatan TNF- $\alpha$ .....	8
2.1.3. Mekanisme Metabolik TNF- $\alpha$ .....	10
2.2. <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP 1)</i> .....	12
2.2.1. Definisi MCP 1 .....	12
2.2.2. Makrofag .....	14



2.2.3.	Bentuk dan Histologi Makrofag .....	15
2.2.4.	Fungsi Makrofag.....	16
2.2.5.	Peran Makrofag dalam Inflamasi.....	16
2.3.	Diabetes Melitus .....	18
2.3.1.	Definisi .....	18
2.3.2.	Epidemiologi .....	19
2.3.3.	Klasifikasi.....	20
2.3.4.	Patogenesis Diabetes Tipe 2.....	20
2.3.5.	Diagnosis DM Tipe 2.....	25
2.4.	Obesitas .....	27
2.4.1.	Definisi.....	27
2.4.2.	Epidemiologi .....	28
2.4.3.	Etiologi Obesitas.....	28
2.5.	Hipoksia.....	34
2.5.1.	Definisi.....	34
2.5.2.	Penyebab Hipoksia Berdasarkan Mekanismenya.....	34
2.5.3.	Jenis Hipoksia.....	36
2.6.	Sel Punca Mesenkimal ( <i>Mesenchymal Stem Cell</i> ).....	37
2.6.1.	Definisi.....	37
2.6.2.	Karakteristik Sel Punca.....	38
2.6.3.	Jenis-Jenis dan Manfaat-Manfaat Sel Punca .....	39
2.7.	Sekretom Sel Punca Mesenkimal.....	41
2.7.1.	Definisi.....	41
2.7.2.	Keunggulan Sekretom Sel Punca Mesenkimal.....	42
<b>BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....</b>		<b>44</b>
3.1.	Kerangka Teori .....	44
3.2.	Kerangka Konsep.....	47
3.3.	Hipotesis .....	47
<b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>		<b>48</b>
4.1.	Jenis Penelitian.....	48
4.2.	Populasi Penelitian .....	49

4.2.1. Teknik Pengambilan Sampel.....	49
4.2.2. Kriteria Inklusi.....	49
4.2.3. Kriteria Eksklusi.....	50
4.2.4. Kriteria <i>Drop Out</i> .....	50
4.2.5. Jumlah Sampel.....	50
4.3. Variabel dan Definisi Operasional .....	51
4.3.1. Variabel Penelitian.....	51
4.3.2. Definisi Operasional .....	51
4.4. Instrumen dan Bahan Penelitian .....	52
4.4.1. Instrumen Penelitian .....	52
4.4.2. Bahan Penelitian .....	53
4.5. Cara Penelitian .....	53
4.5.1. Cara Persiapan Sebelum Perlakuan .....	53
4.5.2. Cara Penggemukan Tikus.....	54
4.5.3. Induksi Diabetes .....	54
4.5.4. Perhitungan Resistensi Insulin (HOMA-IR) .....	55
4.5.5. Teknik Isolasi Sel Punca Mesenkimal dari <i>Umbilical Cord</i> .....	55
4.5.6. Validasi dan Karakteristik SPM .....	56
4.5.7. Uji Diferensiasi SPM .....	57
4.5.8. Perlakuan hipoksia pada SPM .....	59
4.5.9. Metode Filtrasi menggunakan TFF pulse .....	59
4.5.10. Validasi Sekretom SPM Hipoksia .....	60
4.6. Perlakuan Pada Hewan Coba .....	60
4.6.1. Pengambilan Sampel Darah Tikus.....	60
4.6.2. Pembacaan ekspresi gen TNF- $\alpha$ dan gen MCP 1 dengan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i> .....	61
4.7. Alur Penelitian .....	63
4.8. Tempat dan Waktu Penelitian.....	64
4.9. Analisis Data.....	64
4.10. Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	64
4.11. <i>Ethical Clearance</i> .....	65

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	66
5.1. Hasil Penelitian .....	66
5.1.1. Perbedaan Ekspresi TNF- $\alpha$ Antar Kelompok.....	68
5.1.2. Perbedaan Ekspresi MCP 1 Antar Kelompok .....	69
5.2. Pembahasan .....	71
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	74
6.1. Kesimpulan.....	74
6.2. Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA .....	76
LAMPIRAN .....	85

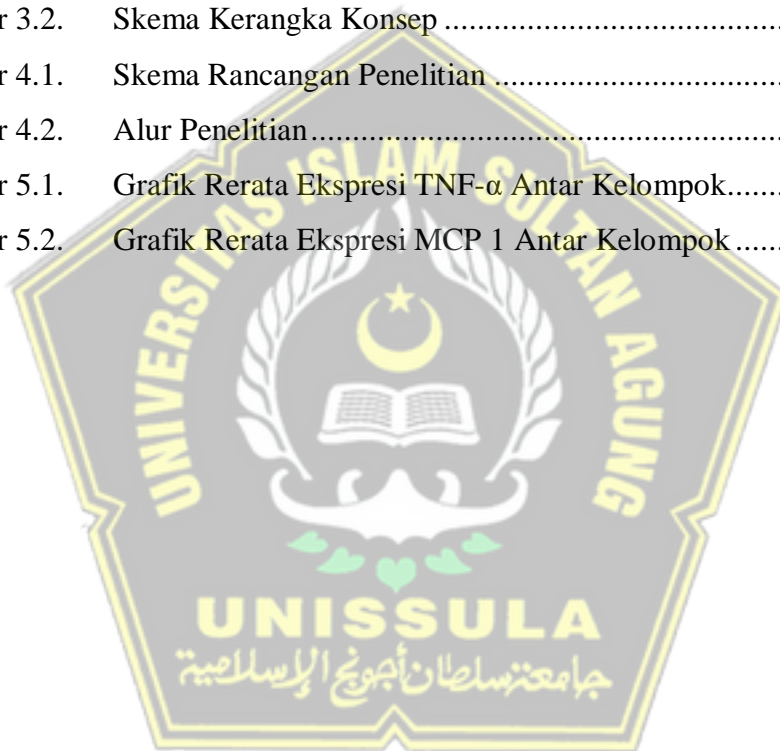


## DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>Allophycocyanin</i>
bFGF	: <i>Basicfibroblast growth factor</i>
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
CM	: <i>Conditioned medium</i>
ECM	: <i>Extra cellular matrix</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	: <i>Fetal bovine serum</i>
FITC	: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HIF	: <i>Hypoxia-inducible factor</i>
HLA-DR	: <i>Human leukocyte antigen – antigen drelated</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IL	: <i>Interleukin</i>
ISCT	: <i>International Society of Cellular Therapy</i>
MSC	: <i>Sel Punca Mesenkimal</i>
MSC-CM	: <i>Sel Punca Mesenkimal conditioned medium</i>
PBS	: <i>Phospat buffer saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PE:	: <i>Phycoerythrin</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Riskesdas	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SCCR	: <i>Stem Cell &amp; Cancer Research</i>
TGF	: <i>Transforming growth factor</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Pengaruh MCP 1 terhadap disfungsi endotel .....	13
Gambar 2.2.	Struktur MCP 1 <sup>28</sup> .....	14
Gambar 2.3.	Sel Makrofag <sup>30</sup> .....	16
Gambar 2.4.	Mekanisme molekuler yang mendasari inflamasi jaringan adiposa <sup>37</sup> .....	17
Gambar 3.1.	Skema Kerangka Teori` .....	46
Gambar 3.2.	Skema Kerangka Konsep .....	47
Gambar 4.1.	Skema Rancangan Penelitian .....	48
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	63
Gambar 5.1.	Grafik Rerata Ekspresi TNF- $\alpha$ Antar Kelompok.....	68
Gambar 5.2.	Grafik Rerata Ekspresi MCP 1 Antar Kelompok.....	70





## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian .....	5
Tabel 2.1.	Klasifikasi Etiologi Diabetes Mellitus .....	20
Tabel 2.2.	Kadar Tes Laboratorium Darah untuk Diagnosis Diabetes dan Prediabetes <sup>57</sup> .....	26
Tabel 5.1.	Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Ekspresi TNF- $\alpha$ dan MCP 1.....	66
Tabel 5.2.	Perbedaan Ekspresi TNF- $\alpha$ Antar 2 Kelompok .....	68
Tabel 5.3.	Perbedaan Ekspresi MCP 1 Antar 2 Kelompok.....	69



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i> .....	85
Lampiran 2. Analisis Statistika.....	86



PENGARUH PEMBERIAN SEKRETOM SEL PUNCA MESENKIMAL  
HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI GEN TNF- $\alpha$  DAN MCP-1  
(Studi Eksperimental *In vivo* Pada Tikus Obesitas yang diinduksi *Streptozotocin*  
(STZ))

**ABSTRAK**

Latar Belakang : *Diabetes melitus (DM) tipe 2* merupakan Gangguan metabolisme dengan terjadinya resistensi reseptor insulin dan berkurangnya kemampuan sel  $\beta$ - pankreas dalam mensekresikan insulin, akan terjadi peningkatan jaringan adiposa yang menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia. Keadaan ini memicu terjadinya inflamasi yang melibatkan peran sitokin dan kemokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-Alpha) dan MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1). Terapi berbasis sel seperti pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia menawarkan paradigma baru dalam pengelolaan DMT2. Tujuan : mengetahui pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP-1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ.

Metode : Penelitian ekperimental dengan pendekatan *post test only control group design*. Subyek penelitian berjumlah 20 ekor tikus jantan galur wistar yang dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok K1 pemberian pakan standard dan aquadest. Kelompok K2 subyek obesitas melitus tipe 2 dengan NaCl 0,9 %. Kelompok K3 dan K4 subyek obesitas melitus tipe 2 perlakuan sekretom dosis 250  $\mu$ l dan 500  $\mu$ l. Penelitian dilakukan di Laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung selama 21 hari dengan pengambilan darah untuk pemeriksaan ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP-1 menggunakan metode PCR.

Hasil : Rerata ekspresi TNF- terendah yaitu kelompok K4 (3.19 pg/ml) dan rerata ekspresi MCP-1 terendah pada kelompok K4 (1.57 %). Uji One way anova menunjukkan perbedaan bermakna pada ekspresi TNF- dengan nilai  $p=0,006$  dan pada ekspresi MCP- 1 menunjukkan perbedaan yang bermakna  $p=0,000$  ( $p<0.05$ ). Uji Tamhane ekspresi TNF pada K1 menunjukkan perbedaan signifikan terhadap K3 dengan nilai  $p$ -value 0.039 ( $p<0,05$ ). Hasil uji Tamhane ekspresi MCP-1 antar tiap kelompok pada P1 menunjukkan perbedaan signifikan terhadap K+ ( $p<0,05$ ).

Kesimpulan: Pemberian sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia menurunkan secara signifikan terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP-1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ.

Kata Kunci : TNF- $\alpha$ , MCP-1, SSPM

*EFFECT OF SECRETOM ADMINISTRATION OF HYPOXIC CHEMICAL  
MESEN STEM CELLS ON TNF- $\alpha$  AND MCP-1 GENE EXPRESSION*

*(Studi In vivo Experimentation In Streptozotocin-Induced Obese Ity Rats (STZ))*

**ABSTRACT**

*Background: Diabetes mellitus (DM) type 2 is a metabolic disorder with the occurrence of insulin receptor resistance and reduced ability of  $\beta$ -pancreatic cells to secrete insulin, there will be an increase in adipose tissue causing hypertrophy and hyperplasia. This situation triggers inflammation involving the role of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-Alpha) and MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1). Cell-based therapies such as the administration of hypoxic mesenchymal stem cell secretomes offer a new paradigm in the management of T2DM.*

*Objective: determine the effect of hypoxic mesenchymal stem cell (SSPM) secretome administration on TNF- $\alpha$  and MCP-1 gene expression in STZ-induced obese mice.*

*Method: Experimental research with post test only control group design approach. The subjects of the study amounted to 20 male rats of the wistar strain which were randomly divided into 4 groups. Group K1 standard feeding and aquadest. Group K2 subjects of type 2 obesity mellitus with NaCL 0.9%. The K3 and K4 groups of type 2 obese mellitus subjects secretome treatment doses were 250  $\mu$ l and 500  $\mu$ l. The study was conducted at the Sultan Agung Stem Cell Research Institute Laboratory for 21 days with blood collection for TNF- $\alpha$  and MCP-1 gene expression examination using PCR method.*

*Results: The lowest mean TNF-expression was in the K4 group ( 3.19 pg/ml) and the lowest average expression of MCP-1 in the K4 group (1.57%). The One way anova test showed a significant difference in TNF- expression with a value of  $p = 0.006$  and in MCP-1 expression showed a significant difference in  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ). The TNF- $\alpha$  expression test on K1 showed a significant difference from K3 with a pvalue of 0.039 ( $p < 0.05$ ). Tamhane test results of MCP-1 expression between each group at P1 showed significant differences in K+ ( $p < 0.05$ ).*

*Conclusions: Hypoxic administration of mesenchymal stem cell secretomes (SSPM) significantly decreased TNF- $\alpha$  and MCP-1 gene expression in STZ-induced obese mice.*

*Keywords : TNF- $\alpha$ , MCP-1, SPPM*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

DMT 2 didefinisikan sebagai sakit jangka panjang yang ditandaitingginya jumlah glukosa akibat ketidakmampuan tubuh memproduksi insulin.<sup>1</sup> Gangguan metabolisme dengan berkembangnya resistensi reseptor insulin dan sekresi insulin menurun karena sel  $\beta$ -pankreas, jaringan adiposa akan meningkat yang menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia.<sup>2</sup> Kondisi ini menginduksi inflamasi terkait peran sitokin dan kemokin pro inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan MCP-1.<sup>3</sup> Terapi farmakoterapi dan suntik insulin pasien DMT2 saat ini hanya menurunkan kadar glikemik tetapi tidak dapat memperbaiki kerusakan sel  $\beta$  pankreas yang terjadi. Terapi berbasis sel seperti pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia menawarkan paradigma baru dalam pengelolaan DMT2.<sup>4</sup> Sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia memiliki manfaat sebagai *immunosupresor* dan *immunomodulator* yang dapat memperbaiki fungsi sel  $\beta$  pankreas, masih sedikit penelitian mengenai sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 terhadap obesitas DM tipe 2.<sup>5</sup>

Berdasarkan informasi dari Global Diabetes League (IDF) pada tahun 2021, prevalensi diabetes secara keseluruhan adalah 536,6 juta orang, atau 10,5%, hidup dengan diabetes. Pada tahun 2045, diperkirakan akan mencapai 783,2 juta jiwa, atau 12,2% dari populasi dunia.<sup>6</sup> Data IDF tahun



2021 menyatakan jumlah penderita diabetes di Indonesia mengalami peningkatan, di mana Indonesia berada diperingkat ke-5 dunia serta peringkat ke 3 di Asia Tenggara 11,3% pasien berusia 20 hingga 79 tahun.<sup>6,7</sup> Berdasarkan pemeriksaan gula darah, Badan Riset Kesehatan Dasar (Rikesdas) melakukan penelitian pada tahun 2018 yang mengumpulkan data penderita diabetes di atas usia 15 tahun dan menemukan bahwa prevalensi diabetes meningkat sekitar 20,4 juta dibandingkan hingga 2013 atau 6,9%.<sup>8</sup>

Sekresi sel induk mesenkim (MSSC) yang diperoleh dari jaringan adiposa mempunyai kepadatan lebih tinggi dibandingkan dengan sumsum tulang belakang.<sup>9</sup> Sel-sel ini termasuk anggota yang berpotensi dan efektif untuk memodulasi lingkungan peradangan dan sel kekebalan karena SSPM dapat menghasilkan zat antifibrotik, imunomodulator, serta antiapoptosis.<sup>5,10</sup> Beberapa penelitian menunjukkan SSPM dosis 40% dari tikus DM tipe 2 memiliki sekresi unik dengan sifat angiogenik yang berbeda dalam penurunan inflamasi dan perbaikan fungsi pankreas.<sup>11</sup> Penelitian pemberian SSPM dapat meningkatkan kadar IL-6 dan IL-2, IL-4 berkurang dalam menginduksi ekspresi PDX-1 pankreas dan dapat menurunkan gula darah.<sup>12</sup> Studi metabolit bioaktif sek punca mesenkim dengan dosis 0,1 ml/200 g BB setiap 3 hari dalam media 10 kali lipat bisa digunakan untuk pengobatan regeneratif DM tipe dua.<sup>13</sup>

Asupan energi yang tidak seimbang dan energi yang terbakar saat melakukan aktifitas fisik akan meningkatkan pengendapan jaringan adiposa yang menyebabkan berat badan berlebih dan penumpukan adiposa visceral.<sup>20</sup>

Penumpukan adiposa visceral menyebabkan otot mengecil, lemak dan menginduksi hipoksia pada sel retikulum endoplasma, kematian adiposa, dan infiltrasi MCP 1. Apabila hal tersebut terjadi berulang kali, maka pelepasan sitokin proinflamasi dari MCP 1 akan meningkatkan, yaitu TNF- $\alpha$ , pada akhirnya menyebabkan peradangan lokal dan sistemik sehingga mengganggu proses produksi insulin<sup>14,15</sup>. Pengobatan ini membuat kadar glukosa menurun namun tidak bisa 100 persen menurunkan penyebab penyumbatan insulin dan tidak bisa memperbaiki kerusakan yang terjadi pada sel  $\beta$  pankreas. Dengan cara ini, pengobatan DMT2 yang lebih baik, yang mungkin dapat meningkatkan kesadaran akan insulin dan meningkatkan kemampuan sel  $\beta$ , akan bermanfaat bagi individu dengan DMT2. Penelitian mengenai kemungkinan penerapan SSPM hipoksia selama perbaikan inflamasi melalui MCP 1 dan TNF- $\alpha$  untuk mengembalikan sensitivitas insulin dan perbaikan sel  $\beta$  pankreas pada DMT2 belum dilakukan secara luas, berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini dilakukan mengenai pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi *Streptozotocin* (STZ).

## 1.2. Perumusan Masalah

Adakah pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ?

### **1.3. Tujuan Umum**

Membuktikan pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ.

### **1.4. Tujuan Khusus**

1. Membuktikan dan menganalisis pengaruh pemberian SSPM Hipoksia pada dosis 250  $\mu$ l dan dosis 500  $\mu$ l terhadap penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$  antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.
2. Membuktikan dan menganalisis pengaruh pemberian SSPM Hipoksia pada dosis 250  $\mu$ l dan dosis 500  $\mu$ l terhadap penurunan ekspresi gen MCP 1 antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

### **1.5. Manfaat Penelitian**

#### **1.5.1. Manfaat Teoritis**

Penelitian ini dapat membuktikan pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ.

#### **1.5.2. Manfaat Praktis**

Mengembangkan pemanfaatan pemberian SSPM Hipoksia dalam pencegahan yang berperan sebagai anti inflamasi.

## 1.6. Originalitas Penelitian

Originalitas penelitian mencerminkan perbedaan dan persamaan bidang penelitian antara peneliti dengan peneliti terdahulu, guna menghindari pengulangan penelitian pada tema yang sama dapat dilihat dalam tabel 1.1.

**Tabel 1.1. Originalitas Penelitian**

Peneliti	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
Jonathan Ribot, 2016 <sup>11</sup>	<i>Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition angiogenic Properties</i>	Penelitian menggunakan <i>-postest only control group design</i>	Penurunan inflamasi dan perbaikan fungsi pankreas
Stefani Santi Widhiastuti, 2018 <sup>13</sup>	Pengaruh media terkondisi sel punca mesensimal (MT-SPM) terhadap histopatologi pankreas tikus model DM tipe 2	Penelitian menggunakan <i>-postest only control group design</i>	Ada peningkatan sel-sel islet pankreas
Yudi Her Oktaviono, 2020 <sup>16</sup>	<i>Human Umbilical Cord Blood-derived Secretome Enhance Endothelial Progenitor Cells Migration on Hyperglycemic Conditions</i>	Penelitian menggunakan <i>-postest only control group design</i>	Peningkatan migrasi sel progenitor endotel
Isabelle Dias, Daphne	<i>Secretome effect of adipose tissue-</i>	Penelitian menggunakan	Peningkatan kadar IL-6 dan IL-2, IL-

Pinheiro, 2021 <sup>12</sup>	<i>derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes</i>	<i>-postest only control group design</i>	4 mengurangi induksi ekspresi PDX-1 pankreas dan dapat menurunkan gula darah
---------------------------------	--	---	---

Penelitian ini berjudul “Pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi *Streptozotocin* (STZ)”. Menggunakan metode eksperimen dengan jenis *post test only control group design* yang dilakukan selama 14 hari. Dosis sekretom sel punca mesenkimal hipoksia yang digunakan adalah 250  $\mu$ l dan 500  $\mu$ l.

Penelitian ini berbeda dengan penelitian terdahulu yang pernah dilaksanakan yaitu : Ribot *et al*, 2016 membuktikan bahwa pemberian *bone marrow mesenchymal stem cell* (BMMSC) dapat mempengaruhi fungsi sel endotel secara *in vitro* dengan menginduksi peningkatan (3,5 kali lipat) pembentukan struktur seperti tubulus. Penelitian dari Widhiastuti *et al* (2018), melakukan studi eksperimen dengan desain *post-test only control group*. Dosis media terkondisi sel induk mesenkim (MT-SPM) dosis menunjukkan gambaran histopatologi pankreas mengalami perbaikan serta sel normal mengalami peningkatan di pulau Langerhans di kelompok yang menerima MT-SPM dibandingkan kelompok tikus Sprague Dawley yang diinduksi diabetes tipe 2 (kontrol positif). Penelitian lain yang dilakukan Oktaviono (2020) menunjukkan sekretome pada konsentrasi 2%, 10% dan



20% meningkatkan migrasi EPC dalam keadaan hiperglikemik Penelitian yang dilakukan Diaz et al, 2021 membuktikan medium sel dari adiposa stem sel peningkatan kadar IL-6 dan IL-2, IL-4 menurun, ekspresi PDX-1 pankreas dan mampu mengurangi glikemia ketika diinduksi pada tikus dengan suntikan streptozocin.. Sehingga perbedaan dari penelitian-penelitian pada tabel 1.1 adalah belum ada yang meneliti tentang pengaruh pemberian secretom sel punca mesenkimal (SSPM) hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. *Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF- $\alpha$ )***

##### **2.1.1. Definisi TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  suatu media peradangan penting yang dihasilkan oleh monosit, makrofag, limfosit T, dan limfosit B. TNF- $\alpha$  merupakan sel NK yang mengaktivasi dan menginduksi inflamasi seperti gumpalan darah. Sitokin dikarakterisasi menjadi subtype Th1 dan Th2. TNF-, IL-1, IL-6, serta interferon adalah cytokine utama yang memicu peradangan pada sel Th1. TNF- $\alpha$  bersifat multifungsi dan merupakan sitokin pembakar yang cocok untuk mengarahkan berbagai kemampuan alami. Kemampuan organik TNF- $\alpha$  secara keseluruhan adalah kemampuannya untuk mendorong keluarnya produk-produk berkualitas yang tak terhitung jumlahnya, seperti reseptor, protein, suplemen, dan lain-lain. TNF- $\alpha$  adalah sitokin penting yang mengontrol iritasi, penjagaan, apoptosis, dan reaksi resisten. Kemampuan super alami TNF- $\alpha$  adalah menciptakan kejengkelan dengan memperluas duplikat keturunan.<sup>17</sup>

##### **2.1.2. Faktor yang Mempengaruhi Peningkatan TNF- $\alpha$**

Kadar TNF- $\alpha$  dapat meningkat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:<sup>18,19</sup>

1) Usia

Peningkatan kadar TNF- $\alpha$  selama penuaan disebabkan oleh peningkatan sinyal apoptosis dan penurunan sinyal kelangsungan hidup.

2) Stress

Saat stress respons antiinflamasi sistem kekebalan dipicu oleh hormon glukokortikoid dan kortisol yang menyebabkan peningkatan jumlah TNF- $\alpha$ .

3) Peningkatan konsentrasi gula darah ekstraseluler dapat menginduksi produksi spesies oksigen reaktif (ROS) lebih banyak, yang akhirnya ekspresi TNF- $\alpha$  meningkat dan memperburuk stres oksidatif.

4) Kurangnya aktivitas fisik yang dapat menyebabkan penumpukan kadar lemak dalam tubuh sehingga dapat meningkatkan prevalensi jumlah TNF- $\alpha$  meningkat.

5) Adanya paparan polusi berulang pada orang yang merokok, dikarenakan partikel serta gas dalam asap rokok mengandung komponen yang sangat berpotensi untuk memicu radikal bebas yang di dalam kandungannya terdapat bahan yang bersifat karsinogenik, sehingga dapat memicu timbulnya kadar prooksidan meningkat ataupun radikal bebas meningkat.

6) Stress oksidatif adalah ketidakseimbangan antara antioksidan dan prooksidan didalam tubuh. Kegemukan sangat erat kaitannya

dengan tekanan oksidatif, dengan mempertimbangkan tugas cyclic AMP (CAMP) dalam mengatur keseimbangan energi pada kegemukan. Stres oksidatif suatu kondisi di mana radikal bebas meningkat tidak sebanding dengan antioksidan di dalam tubuh yang mengakibatkan disfungsi seluler dan kerusakan lemak, protein dan DNA.

- 7) Adiposa merupakan organ yang melepaskan adipokin serta memicu ROS. Jaringan berminyak dipandang sebagai penghitungan mandiri usia ROS dasar.

### **2.1.3. Mekanisme Metabolik TNF- $\alpha$**

Ekspresi gen akan mempengaruhi TNF- $\alpha$  pada jaringan adiposa dan jaringan hati. Lemak menghambat TNF- $\alpha$  yang mengatur pengambilan dan penyimpanan Asam Lemak Non-Esterifikasi (NEFAS) dan glukosa, sehingga dapat menghambat gen yang ditranskripsi dalam adipogenesis dan lipogenesis, yang akan mengubah ekspresi beberapa adipokin, termasuk adiponectin serta Interleukin-6. TNF- $\alpha$  menekan deklarasasi kualitas yang mengarahkan pengambilan glukosa dan pencernaan di hati serta oksidase lemak tak jenuh, sehingga meningkatkan aliran keluar kualitas yang berhubungan dengan penggabungan kolesterol dan lemak tak jenuh. Selain itu, karena aktivasi serin kinase menyebabkan peningkatan fosforilasi substrat serin Reseptor Insulin 1 dan 2 (IRS-1 dan IRS-2) TNF- dapat mengubah sinyal insulin.<sup>20,21</sup>

TNF- $\alpha$  secara tidak langsung juga memperburuk pensinyalan insulin, menginduksi resistensi insulin di banyak jaringan, dan dapat meningkatkan *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- $\kappa$ B), salah satu faktor transkripsi utama TNF memodulasi aktivasi rantai pensinyalan dengan memasukkan rangkaian protein pengatur, beberapa diantaranya yang merupakan target potensial utama untuk intervensi dalam pengobatan kondisi inflamasi yang dapat menyebabkan aterosklerosis. NF- $\kappa$ B adalah faktor kelompok transkrip spektrum efek kinerja yang luas termasuk induksi sitoproteksi, proliferasi dan berguna dalam sistem regulasi kekebalan serta respon peradangan. Aktivasi NF- $\kappa$ B pada sel normal mengaktifkan beberapa genetik yang ikut serta dalam penghambatan kematian sel melewati jalur mitokondria dan kematian reseptor. Aktivasi NF- $\kappa$ B memerlukan rangsangan dari luar, beberapa diantaranya adalah TNF- $\alpha$  dan LPS. Stimulasi TNF- $\alpha$  dan (liposakarida) LPS ini akan menginduksi fosforilasi NF- $\kappa$ B sehingga menyebabkan I $\kappa$ B terdegradasi agar NF- $\kappa$ B dapat berfungsi, sehingga jika TNF- $\alpha$  ditingkatkan maka NF- $\kappa$ B juga akan meningkat dan terstimulasi aktif. Hal ini akan sangat mempengaruhi peningkatan stress oksidatif dalam tubuh.<sup>22,23</sup>

## 2.2. *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP 1)*

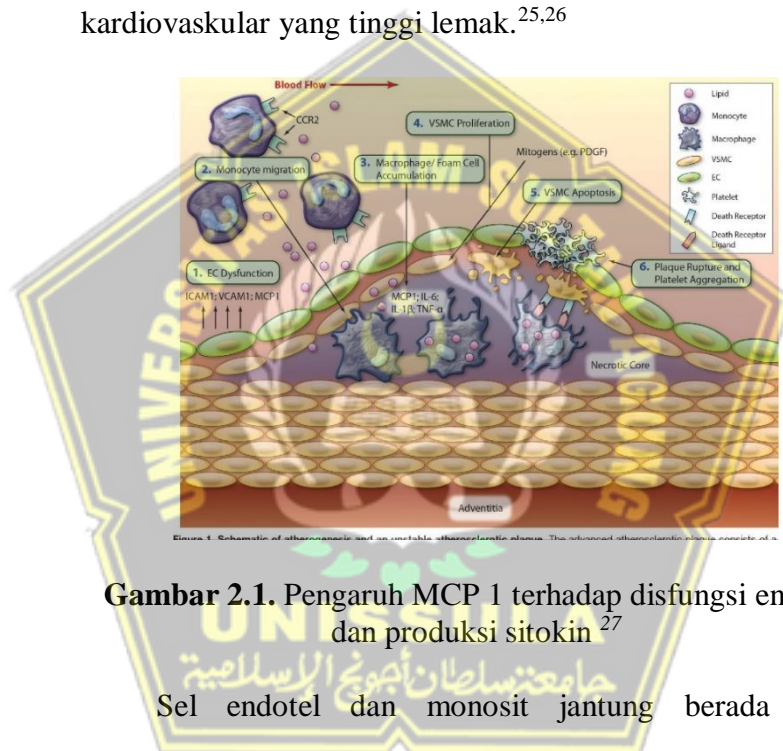
### 2.2.1. Definisi MCP 1

MPC-1 atau *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, merupakan polipeptida molekul tunggal dengan berat molekul 13 kDa adalah sebagian dari kemokin yang dihasilkan sel endotel vaskuler, dan sel otot polos pembuluh darah, keratinosit, fibroblas, sel mesenkim, sel epitel tubulus, limfosit dan makrofag. Kadarnya meningkat bila distimulasi oleh sitokin pro inflamasi *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , liposakarida (*LPS*), interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), *PDGF*, dan LDL teroksidasi.<sup>24</sup>

Monosit Chemoattractant Protein-1 (MCP 1) adalah penanda aktifnya monosit pada iritasi persisten. Cedera pembuluh darah yang ditandai dengan kerusakan endotel akan menyebabkan tumpahan LDL dari lumen vena ke dinding pembuluh darah, dimana LDL diubah sepenuhnya menjadi LDL teroksidasi, juga meningkatkan pelepasan sel endotel, mengeluarkan MCP 1 dan sel otot polos pembuluh darah. Kompleks CXCR2 (reseptor kemokin CXC 2) terbentuk ketika monosit berikatan dengan CCR2 pada membran sel darah putih selama kerusakan pembuluh darah. Kerja sama antara MCP 1 dan CCR2 akan mengaktifkan reseptor protein G yang membuat monosit menumpuk di sel endotel. Sel mononuklear akan memasuki ruang subendotel dan berpisah menjadi makrofag yang akan mengikat LDL yang teroksidasi menjadi sel berbusa. Kondisi ini akan disertai dengan keluarnya MCP 1 dan sitokin lain yang



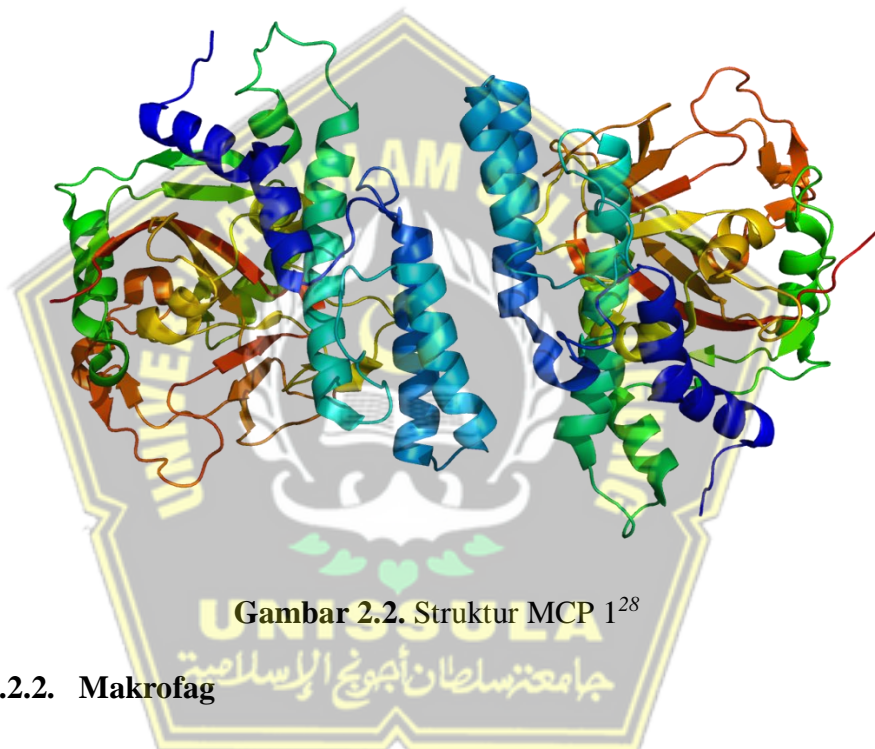
bersifat memprovokasi ke dalam sel endotel yang akan memperparah akumulasi adiposa pada dinding vaskular. Itu menunjukkan bahwa MCP 1 berperan penting dalam penyakit kardiovaskular. Penelitian pada kelinci, yang diberi penghambat MCP 1 mengurangi kejengkelan plak, menghambat perbaikan plak, dan mencegah kerusakan plak yang stabil, namun berdampak pada status infeksi kardiovaskular yang tinggi lemak.<sup>25,26</sup>



**Gambar 2.1.** Pengaruh MCP 1 terhadap disfungsi endotel dan produksi sitokin<sup>27</sup>

Sel endotel dan monosit jantung berada didalam sel kardiovaskular, bisa menginduksi MCP 1 menjadi respons terhadap berbagai rangsangan dengan adanya pemicu akumulasi leukosit yang akan menyebabkan peradangan kronis. Penderita infark miokard akut dan penderita arteri koroner jumlah tingkat MCP 1 juga diamati mengalami peningkatan. Kadar MCP 1 yang tinggi dalam sirkulasi berhubungan sebanding dengan resiko kardiovaskuler yang signifikan dengan aterosklerosis koroner yang nyata dan peningkatan

insiden penyakit jantung koroner. Dalam percobaan pada hewan coba, MCP 1 terbukti menjadi faktor utama dalam induksi iskemia miokard selama lima jam pertama setelah reperfusi. Dalam penelitian infark miokard pada mencit yang diberi antibodi MCP 1 secara signifikan menurunkan risiko pelebaran infark, penurunan dilatasi ventrikel serta peningkatan kinerja jantung.<sup>28</sup>



### 2.2.2. Makrofag

Makrofag adalah sel fagositik pada dari sistem imun bawaan yang berada di beberapa jaringan. Makrofag terletak di di sumsum tulang orang dewasa yang berasal dari sel induk hematopoetik, kemudian pada janin dari sel prekursor kantung kuning telur dan hati.<sup>29</sup>

Sel induk granulosit-monosit distimulasi oleh sitokin seperti IL-3 dan faktor perangsang koloni makrofag granulosit (GM-CSF)

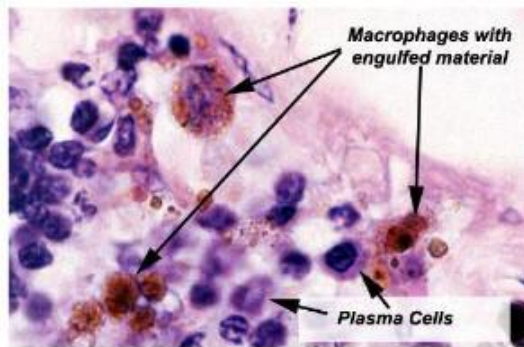
untuk menghasilkan makrofag yang berasal dari sumsum tulang. Ekspresi reseptor membran spesifik sitokin berkaitan dengan diferensiasi sel induk.<sup>30</sup>

Makrofag bersama dengan neutrofil memasuki daerah ulserasi dalam rentang waktu 24 jam setelah cedera dan menetap di sana selama 5 hari. Sejak awal fase proliferasi hingga hari ke 5, jumlah makrofag meningkat pesat. Siklus pemisahan ini mencakup banyak perubahan: perluasan ukuran sel dari 5-10 kali lipat, perluasan organel yang bertambah baik jumlah maupun kerumitannya, perluasan fagositosis, dll. Sel Langerhans dan mikroglia otak besar adalah dua contoh makrofag non-monosit.<sup>31</sup>

### **2.2.3. Bentuk dan Histologi Makrofag**

Bentuknya tak beraturan dengan inti membulat yang bisa berasosiasi dengan sel makrofag lainnya. Makrofag juga memanjang yang terlihat dibawah mikroskop cahaya lendir berwarna gelap.<sup>32</sup>

Makrofag terdapat dua jenis yaitu makrofag tetap, tidak aktif dan makrofag pengembara yang aktif bermigrasi dengan kaki palsu, fagositosis aktif maka bentuknya tidak beraturan, inti kromatin padat dan lingkaran kromatin padat.<sup>33</sup>



**Gambar 2.3.** Sel Makrofag<sup>30</sup>

#### 2.2.4. Fungsi Makrofag

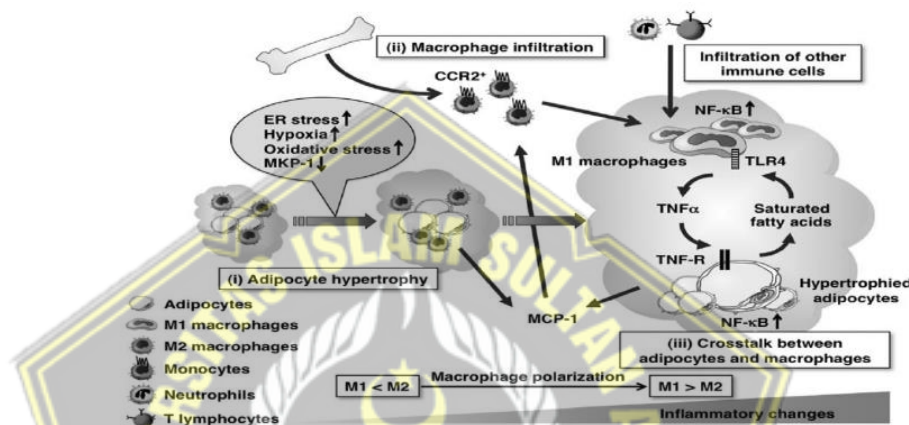
Fungsi makrofag dibedakan menjadi dua, yaitu M1 (klasik), yang mempunyai efek proinflamasi serta M2 (alternatif) yang mempunyai efek antiinflamasi. *Interferon regulator factor 5* (IRF-5) dan IRF-4 mempolarisasi makrofag M1 dan M2. Makrofag M1 muncul pada fase inflamasi hari ke-2 hingga ke-5, dan pada jaringan baru.<sup>34</sup>

Makrofag M2 dominan dalam memperbaiki, mengkomunikasikan Komponen Pengembangan Endotel Vaskular (VEGF), TGF- $\beta$  dan IL-10, yang diaktivkan oleh peningkatan yang berbeda (IL-4/IL-13 atau glukokortikoid ) Mengalahkan iritasi, dan memulihkan pembentukan kembali dan pemulihan jaringan.<sup>35</sup>

#### 2.2.5. Peran Makrofag dalam Inflamasi

Respon inflamasi kronis pada dinding pembuluh darah aterosklerotik, disebut remodeling vaskular, diatur oleh komunikasi kompleks antar sel endotel vaskular, pembuluh darah, limfosit serta M1 & M2 yang berasal dari monosit. Pergerakannya diamati pada

jaringan lemak individu yang mengalami obesitas (dikenal sebagai *remodeling* jaringan adiposa), di mana terdapat variasi pada sel stroma baik jenis maupun jumlah sel. *Remodeling* jaringan lemak bisa digambarkan sebagai proses peradangan kronis yang berkaitan dengan hipertrofi.<sup>36</sup>



**Gambar 2.4.** Mekanisme molekuler yang mendasari inflamasi jaringan adiposa<sup>37</sup>

Jelas bahwa jalur makrofag kemoreseptor protein 1 (MCP 1)/C-Chemokine receptor 2 (CCR-2) mengambil bagian penetrasi makrofag ke dalam jaringan ini. MCP 1 dibuat oleh lemak serta makrofag di jaringan lemak individu gemuk. Induksi infiltrasi makrofag ke dalam jaringan sehingga terjadi peradangan disebabkan oleh produksi MCP 1 berlebih di jaringan lemak. Resistensi insulin juga diinduksi oleh MCP1 di otot-otot rangka serta hati yang membuktikan perannya terhadap hormon endokrin. Weisberg *et al.* menyatakan bahwa terdapat sekumpulan makrofag dan peradangan kronik di lemak tikus mengalami kekurangan CCR2 (*CCR2<sup>-/-</sup> mice*)



yang diberi diet tinggi lemak. Selain itu, 2 penelitian yang lalu pada tikus transgenik yang mengekspresi MCP 1 secara berlebih di jaringan lemak pada tikus yang kekurangan MCP 1 menunjukkan perannya untuk mengantarkan makrofag ke jaringan pada lemak tikus. Infiltrasi makrofag dihambat ke dalam jaringan lemak manusia obesitas melewati jalur genetik serta farmakologis mengakibatkan dis-regulasi produksi adipokin, yang menyebabkan peradangan jaringan adiposa dan resistensi insulin yang disebabkan oleh obesitas.<sup>36</sup>

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) salah satu transkripsi yang berguna untuk membentuk cytokin makrofag. Misalnya, ERK seperti MAPK, diaktivkan oleh proses sel seperti diferensiasi adiposa serta pengecilan adiposa. Ketika retikulum endoplasma tertekan, menyebabkan meningkatnya MAPK, yang mana mengganggu keseimbangan cytokin pro-inflamasi dan anti inflamasi. MAPK adalah rantai yang diinaktivasi oleh protein fosfatase contohnya MKP 1 (MAPK-fosfatase-1).<sup>37</sup>

## **2.3. Diabetes Melitus**

### **2.3.1. Definisi**

Menurut ADA (*American Diabetes Association*) tahun 2021 DM adalah kelainan metabolisme dan sekresi insulin yang ditandai dengan hiperglikemik, kinerja insulin, atau pun keduanya. DM berhubungan dengan disfungsi dan kerusakan jangka panjang pada



organ-organ seperti ginjal, mata, saraf, jantung, dan vaskuler.<sup>38</sup> Begitu pula DMT2 didefinisikan sebagai penyakit ditandai dengan hiperglikemik karena hormon insulin terganggu, resistensi serta kerusakan sel  $\beta$  pancreas.<sup>39</sup>

### 2.3.2. Epidemiologi

Berbagai penelitian epidemiologi menunjukkan tren kejadian dan prevalensi diabetes di berbagai wilayah di dunia. Berdasarkan data IDF (2021), prevalensi diabetes di seluruh dunia adalah 536,6juta atau 10,5% individu dengan diabetes, dan diprediksi akan lebih meningkat sebesar 783,2juta orang, mencapai 12,2 % dari populasi dunia tahun 2045. Sementara itu, IDF tahun 2021 total pasien DM di Indonesia semakin meningkat, dimana Indonesia berada pada peringkat kelima dalam hal orientasi dan ketiga di Asia dengan 11,3% pasien berusia 20 hingga 79 tahun.<sup>40</sup>

Menurut Riset Kesehatan Dasar, perempuan riskan terkena diabetes dibanding laki-laki. Kelompok umur dengan diabetes terbanyak adalah 55-64 tahun yaitu sebesar 13,5%. World Wellbeing Association memperkirakan jumlah pasien DMT2 di Indonesia meningkat dari 8,4 juta di tahun2000 menjadi kurang lebih 21,3 juta pada tahun2030, jumlah ini diperkirakan akan meningkat dengan cepat dalam waktu dekat.<sup>42</sup>

### 2.3.3. Klasifikasi

Etiologi DM menurut ADA (2021) tertera tabel dibawah:<sup>43</sup>

**Tabel 2.1. Klasifikasi Etiologi Diabetes Mellitus**

<b>Tipe</b>	<b>Keterangan</b>
Diabetes Tipe 1	DMT 1 akibat kerusakan sel $\beta$ -pankreas sejak masa kanak-kanak/remaja karena pola makan maupun autoimun. Biasanya berhubungan dengan hormon insulin berkurang
Diabetes Tipe 2	DMT2 dikarenakan oleh sel yang tidak bisa merespons insulin atau kerusakan sel $\beta$ -pankreas
Diabetes Gestasional (DMG)	Diabetes didiagnosis di TM kedua atau ketiga sewaktu hamil tanpa adanya diabetes pra-kehamilan
Diabetes Tipe Lain	1. Sindrom diabetes monogenik <i>diabetes neonatal maturity onset diabetes of the young (MODY)</i> 2. Penyakit eksokrin pankreas (fibrokistik dan pankreatitis) 3. Disebabkan oleh obat-obatan atau senyawa sintesis (misalnya glukokortikoid pada pengobatan HIV atau AIDS atau setelah transplantasi organ)

### 2.3.4. Patogenesis Diabetes Tipe 2

Resistensi insulin pada sel otot dan hati serta kegagalan sel beta pankreas adalah awal mula dari DMT2 hiperglikemia sedang hingga berat. Kegemukan dianggap sebagai patofisiologi cedera central pada diabetes.<sup>44</sup> Ketidakmampuan insulin bekerja pada sel otot, adipose, dan hati dapat memicu pankreas untuk melakukan remunerasi mengeluarkan lebih banyak insulin. Saat jumlah insulin tidak banyak untuk menggantikan penyumbatan insulin yang meluas, kadar glukosa meningkat dan, dalam jangka panjang, terjadi hiperglikemia berkelanjutan. Hiperglikemik kronis pasien DMT2 semakin memperburuk seluler  $\beta$ -pankreas dan memperberat

terjadinya resistensi insulin, sehingga menyebabkan perkembangan penyakit diabetes Tipe 2.<sup>45</sup>

a. Resistensi Insulin

Peran obesitas sentral dengan akumulasi adiposa menjadi katalis peningkatan sekresi sitokin pro inflamasi terhadap resistensi insulin pada penderita DMT2. Pada tubuh penderita diabetes tipe 2, peradangan kronis yang terus menerus menyebabkan resistensi insulin disebabkan oleh obesitas sentral. Penumpukan jaringan adiposa di pusat tubuh memproduksi kelebihan *Free Fatty Acid* (FFA), yang pada gilirannya meningkatkan jumlah FFA yang dikirim ke hati melewati sistem drainase Vena portal. FFA terdapat banyak di hati sehingga cytokin proinflamasi dilepaskan dari adiposa visceral melewati vena portal. Resistensi insulin pada hati sehingga peningkatan produksi glukosa menjadi tidak terkendali disebabkan oleh kondisi tersebut.<sup>46</sup>

Terbatasnya batas hipertrofik jaringan lemak menyebabkan kelebihan FFA pada jaringan lemak dan non-lemak. Resistensi insulin disebabkan oleh terbatasnya oksidasi pada jaringan non-adiposa dan penyimpanan aktif asam lemak, menurut teori limpahan.<sup>47</sup>

Adiposit yang membesar menginduksi hipoksia lokalsel retikulum edoplasma, mengakibatkan jaringan lemak mati serta

infiltrasi makrofag. Kejadian tersebut yang berulang menyebabkan M1 mengeluarkan cytokine pro-inflamasi, termasuk IL 6 serta menyebabkan peradangan dan sistem yang bisa mengganggu sinyal insulin. Ketika cytokine pro-inflamasi dilepaskan, mereka mengaktifkan aktivitas C-jun N-terminal 2kinase (JNK) dan IKB (IKK). Inisiasi IKK dan JNK akan meningkatkan fosforilasi serin, yang menghambat substrat reseptor insulin (IRS)-1, yang merupakan receptor penting untuk sumber insulin yang lesu. JNK dan IKK juga meningkatkan inisiasi transkripsi kualitas provokatif seperti iNOS. Pemberlakuan iNOS dapat memperluas produksi nitric oxide (NO) dan susunan bawahan reseptif peroxynitrite (ONOO).<sup>47,48</sup>

b. Langerhans Pankreas

1) Anatomi dan Histologi Pankreas

Resistensi insulin pada sel otot dan hati serta kegagalan sel beta pankreas pada DM2 adalah hiperglikemia sedang hingga berat. Kegemukan telah sebagai patofisiologi cedera central pada diabetes tipe 2.<sup>44</sup> Insulin bisa bekerja secara maksimal pada sel otot, lemak, dan hati, memicu pankreas untuk melakukan remunerasi mengeluarkan lebih banyak insulin.<sup>49</sup>

Lapisan jaring halus memisahkan pulau Langerhans dari jaringan kelenjar eksokrin yang mengelilinginya,

menciptakan massa sel endokrin berbentuk bola dengan berbagai ukuran. Pulau Langerhan terlihat seperti kelompok sel epitel tebal yang ditembus oleh banyak pembuluh darah dan biasanya lebih besar dari asinus. Pulau Langerhans adalah kumpulan sel endokrin pucat yang terletak di jaringan asinar eksokrin pankreas. Pulau Langerhans muncul sebagai kumpulan sel bulat pucat yang dikelilingi oleh cincin vaskularisasi kecil tanpa saluran untuk pengangkutan bahan kimia dari pankreas. Cincin filamen retikulin halus menutupi setiap pulau Langerhans dan mengisolasinya dari pankreas eksokrin di sekitarnya. Sel parenkim dan vena dipersarafi melalui untai saraf otonom.<sup>50</sup>

Sebagian besar pulau Langerhans berada pada kedalaman 100-200  $\mu\text{m}$ . Pulau Langerhans adalah kumpulan sel bulat telur berukuran  $76 \times 1/5 \mu\text{m}$  yang berada di pankreas. Seluruh Langerhan memiliki bentuk poligonal yang bertentangan, inti selnya bulat fokus, batang kecil bentuk dari mitokondria, serta perangkat Golgi. Pulau Langerhans mengandung lima jenis sel unik, masing-masing mampu mengeluarkan berbagai bahan kimia.<sup>51</sup>

a) Sel  $\alpha$  akan menjadi sel yang menghasilkan senyawa glukagon. Setelah sel, yang mencakup 20% pulau

Langerhans, ini adalah jenis sel normal kedua yang paling umum.

- b) Sel  $\alpha$  akan menjadi sel yang menghasilkan glukagon kimia. Sel-sel yang membuat hormon insulin adalah jenis kedua yang paling umum.
- c) Sel delta ini memproduksi somatostatinn.
- d) Sel F ini memproduksi *pancreatic polypeptide*
- e) Sel Gammaa

## 2) Kondisi Pankreas pada DM Tipe 2

Tekanan metabolik dapat disebabkan oleh faktor keturunan dan faktor-faktor umum, misalnya gaya hidup yang tidak sehat dan pola makan yang tidak sesuai dengan kebutuhan energi dan penggunaan energi. Hiperglikemia, resistensi insulin, dan penambahan berat badan merupakan akibat dari ketidakseimbangan ini. Diabetes tipe 2 terjadi ketika sel  $\beta$  pankreas tidak dapat menghasilkan insulin yang cukup sehingga menyebabkan hiperglikemia.<sup>52</sup>

Alat yang merusak sel  $\beta$  pankreas mencakup jalur reaksi provokatif dan tekanan oksidatif yang memicu apoptosis dan kerusakan sel  $\beta$ . Jalur provokatif pulau digambarkan dengan penetrasi sel kebal oleh makrofag yang menjawai datangnya sitokin dan kemokin (perluasan IL-6). Hal ini menghasilkan penambah rantai cahaya variabel atom



dari sel  $\beta$  yang diaktifkan (Nf- $\beta$ ), yang diintervensi dengan peningkatan regulasi catatan kualitas proinflamasi, yang menyebabkan kerusakan dan cedera sel  $\beta$ . Sel pulau sendiri dapat memproduksi sitokin seperti IL-6, yang mendukung gejala pembakar dapat memicu apoptosis sel  $\beta$ .<sup>53</sup>

Produksi oksida nitrat akan meningkat akibat peradangan yang disebabkan oleh sekresi IL-6 pada sel pankreas, yang juga akan mengakibatkan penurunan konsentrasi ATP mitokondria. Selain itu, reaksi yang menghebohkan juga menyebabkan penurunan regulasi yang mendukung rekor kualitas yang membara, yang menyebabkan pelepasan sinyal apoptosis dari mitokondria dan cedera serta kematian sel  $\beta$ .<sup>54</sup> Oleh karena itu, peningkatan tekanan oksidatif mengurangi arah pernapasan yang terikat protein dan mengurangi produksi ATP mitokondria, yang dapat melemahkan aliran keluar insulin.<sup>55</sup>

#### **2.3.5. Diagnosis DM Tipe 2**

Tes gula darah digunakan untuk membuat diagnosis diabetes tipe 2. Tes yang disarankan untuk penentuan diabetes tipe 2 adalah tes katalis glukosa dengan zat seperti plasma intravena. Skrining ini dilakukan ketika keraguan terhadap diabetes sudah dibingkai berdasarkan adanya efek samping umum diabetes.<sup>56</sup>

**Tabel 2.2. Kadar Tes Laboratorium Darah untuk Diagnosis Diabetes dan Prediabetes<sup>57</sup>**

	HbA 1c (%)	Glukosa Darah	Puasa	Glukosa Plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dL)
Diabetes	≥ 6,5	≥ 126		≥200
Prediabetes	5,7-6,4	100-125		140-199
Normal	<5,7	70-99		70-139

Pada pemeriksaan, bila temuan tidak sesuai syarat untuk diagnostik diabetes, temuan ini bisa dinilai masuk klasifikasi menjadi pradiabetes meliputi gangguan toleransi glukosa (TGT) dan glukosa darah puasa terganggu (GDPT) adalah:<sup>58</sup>

- TGT : hasil pemeriksaan gula darah 2 jam setelah TTGO 0-199 mg/dL dan gula selama puasa 100 mg/dL
- GDPT : pemeriksaan gula darah puasa antara 100-124 mg/dL dan pemeriksaan TTGO glukosa plasma 2 jam <140 mg/dL
- TGT dan GDPT dilakukan bersamaan
- Hasil pemeriksaan HbA1c 5,7-6,4%

Efek samping DM, tes skrining dapat digunakan untuk mendiagnosis pradiabetes dan diabetes tipe 2, seperti: <sup>59</sup>

1) BB Kelompok (Indeks Masa tubuh [IMT]  $\geq 23 \text{kg/m}^2$  dan dibarengi dengan salah satu / lebih faktor resiko seperti dibawah ini:

- Sedikitnya aktivitas fisik
- Terdapat faktor genetik diabetes dalam keluarga
- Perkumpulan etnis/ras tertentu

- Wanita yang mempunyai riwayat melahirkan bayi dengan BBL > 4 kg atau mempunyai riwayat diabetes gestasional.
- HDL < 35 mg/dL dan atau trigliserida > 250 mg/dL
- Perempuan yang menderita PCOS
- Pre-diabetes
- Akantosis nigricans, Obesitas berat
- Riwayat jantung

2) Usia >45 tahun tanpa factor resiko di atas

## 2.4. Obesitas

### 2.4.1. Definisi

Menurut Badan Kesejahteraan Sosial Indonesia, obesitas adalah penumpukan lemak yang tidak wajar karena adanya ketimpangan. Keadaan ini akan menyebabkan berat badan jauh lebih tinggi dari normalnya. Orang Asia memiliki tingkat rasio otot dan lemak yang lebih tinggi namun memiliki indeks berat badan (BMI) yang lebih rendah, sehingga BMI antara 23 dan 24,9 kg/m<sup>2</sup> dianggap kelebihan berat badan dan BMI di bawah 25 kg/m<sup>2</sup> dianggap gemuk. Tergantung di mana lemak menumpuk, apa yang disebut dengan berat fokus terjadi, di mana massa lemak disimpan di bagian tengah tubuh dan di bagian perut. Perkembangan ini disebabkan oleh kelebihan lemak di jaringan lemak subkutan dan lemak alami di area tengah. Berat badan focal mungkin disebabkan oleh kondisi medis yang berhubungan dengan penyakit kardiovaskular dan gangguan

metabolisme. Berat badan adalah suatu kondisi medis di negara maju dan berkembang, yang menyebabkan banyak masalah medis dan mengurangi kepuasan pribadi. Di seluruh dunia, obesitas merupakan kontributor signifikan terhadap perkembangan penyakit kardiovaskular, diabetes tipe 2, kanker, osteoarthritis, dan sleep apnea.<sup>60-62</sup>

#### **2.4.2. Epidemiologi**

Menurut data populasi dunia tahun 2015, sekitar 609 dari 1,9 miliar hingga 39% dari populasi. Dengan melihat hasil contoh ini, diperkirakan pada tahun 2025 penambahan berat badan akan menjadi masalah momok dan pada umumnya tingkat obesitas akan mencapai 18%. Angka obesitas sentral sebesar 28% dan angka obesitas di Indonesia sebesar 23,1% berdasarkan sampel 16.780 orang dari 33 provinsi. Pengukuran berat badan dalam penelitian ini menggunakan standar kegemukan Asia-Pasifik dengan BMI  $\geq 25$ . Dalam keadaan seperti ini, kegemukan harus dianggap sebagai masalah medis yang signifikan, karena kegemukan berperan penting dalam penyakit sulit yang menyertainya.<sup>63</sup>

#### **2.4.3. Etiologi Obesitas**

Kelebihan berat badan merupakan akibat dari ketidakteraturan antara asupan kalori dan penggunaan energi, kalori tersebut disimpan di jaringan lemak dan pemanfaatannya tidak sepenuhnya

dikendalikan oleh energi yang dikonsumsi. Keadaan yang terjadi saat ini menggambarkan lemak yang ada pada setiap individu sebagai suatu bagian kompleks yang dialami oleh tubuh karena pengaruh faktor keturunan, nafsu makan, pola makan, kerja nyata dan energi yang digunakan dalam aktivitas. Selain itu, faktor lingkungan di mana setiap individu berpartisipasi juga menentukan preferensi makanan, jenis makanan, tingkat aktivitas fisik, dan preferensi jenis aktivitas fisik. Jadi, penyebab obesitas adalah perubahan lingkungan, genetik, mikrobioma, endokrin dan neurofisiologi.<sup>64</sup>

#### 2.4.3.1. Perubahan Lingkungan

Selama empat dekade terakhir, perubahan dramatis telah terjadi pada pola makan akibat urbanisasi. Pangan industri dengan harga terjangkau mudah dikonsumsi oleh masyarakat, dan dengan promosi yang luas, penggunaan pangan industri sebagai suplemen makanan dalam porsi lebih besar dibandingkan jatah makanan lebih banyak dikonsumsi. Selain itu, penggunaan minuman kaya gula juga meningkat, seperti minuman bersoda, minuman olahraga, dan jus produk alami, sehingga menambah bobot pada elemen ini. Selain itu, penggunaan makanan sederhana di AS dilakukan oleh 33% anak setiap tahun dan 66% anak setiap tahun. Makanan sederhana ini umumnya

mengandung 2000 kkal dan 84 gram lemak. 4 porsi rasa pati tinggi atau 560 kkal. Ada hubungan yang jelas antara minuman manis ini dan peningkatan risiko obesitas pada manusia. Selain itu, pekerjaan nyata di kalangan orang dewasa dan anak-anak juga terus menurun, dipengaruhi oleh beberapa faktor, misalnya perubahan karena perubahan zaman, lamanya penggunaan kendaraan karena kemacetan, rendahnya tingkat faktor transportasi, alasan kesehatan, dan perkembangan kehidupan kursus tetap, tidak banyak bergerak, dan di bidang sosial tidak mendukung pekerjaan sebenarnya ketika mereka sedang dalam perjalanan jauh. Dalam penelitian kesehatan remaja, kelesuan dan jangka waktu istirahat yang pendek. Pada akhirnya memengaruhi nafsu makan dan keinginan makan. Kurang tidur juga menyebabkan berkurangnya resistensi glukosa dan respons insulin dan akan berhubungan dengan penggunaan glukokortikoid dan gerakan yang bijaksana. Nafsu makan, kewaspadaan, aktivitas simpatik, dan aktivitas saraf Y semuanya akan dipicu oleh hal ini.<sup>65</sup>

#### 2.4.3.2. Genetik

Berkembangnya obesitas pada seseorang juga dipengaruhi oleh faktor genetik. Hal ini tergantung pada konsekuensi dari afiliasi yang luas yang memusatkan



perhatian pada sepotong kecil keragaman dalam jumlah banyak di antara orang-orang. Model yang sangat signifikan adalah kualitas FTO (Fat Mass Weight) pada 16q12, yang terkait dengan kegemukan remaja, yang dapat dipahami dengan meningkatkan konsumsi energi. Jenis berat badan monogenik juga telah diidentifikasi, termasuk kekurangan reseptor melanocortin-4 (MC4R). Hal ini terkait dengan peningkatan kegemukan dan pola makan yang kurang baik. Perubahan MC4R biasanya menyebabkan kegemukan monogenetik namun jarang terjadi pada obesitas total. Kurangnya aktivasi MC4R ditemukan pada pasien yang kekurangan proopiomelanocortin (POMC), pendahulu dari pendukung bahan kimia adrenokortikotropik (ACTH) dan bahan kimia penghidup melanosit (MSH), menyebabkan defisiensi adrenal, kilau kulit, dan hiperplasia, dan obesitas. Selain itu, bukti menunjukkan bahwa nafsu makan dapat diperoleh, yang berarti bahwa sifat-sifat tertentu berhubungan dengan rasa lapar, berat badan, dan sebaliknya.<sup>66</sup>

#### 2.4.3.3. Mikrobiom

Obesitas mungkin berhubungan dengan perubahan populasi bakteri dan perubahan microbioma dalam usus. Penelitian pada hewan yang mengalami obesitas serta

penelitian pada manusia yang mengalami obesitas menunjukkan penurunan bakteri yang signifikan dan peningkatan filum firmicutes. Perubahan jumlah filum pada penderita obesitas dikaitkan dengan peningkatan kemampuan memperoleh energi dari makanan.<sup>67</sup>

#### 2.4.3.4. Endokrin dan Fisiologi Neural

Rasa kenyang disebabkan oleh hormon di usus, seperti kolesistokinin, glukagon-like peptida peptida. Jaringan lemak memberikan kritik pada otak sehubungan dengan tingkat kapasitas energi melalui masuknya bahan kimia adiponektin dan leptin. Hormon-hormon ini bekerja melalui nukleus arkuata hipotalamus dan di jalur inti tunggal di batang otak dan secara bergantian mengaktifkannya melalui jaringan saraf yang berbeda.<sup>68</sup>

Kadar leptin yang rendah merangsang makan dan leptin yang tinggi menekan rasa lapar. Meskipun umpan balik negatif leptin terhadap nafsu makan mungkin lebih bermanfaat dalam mencegah rasa lapar dibandingkan makan berlebihan. Ada banyak neuropeptida dalam pikiran, termasuk peptida YY (PYY), peptida terkait agouti, dan orexin, yang disebabkan oleh rasa lapar, sementara bahan kimia pengaktif melanocortin dan  $\alpha$ -melanocortin dikaitkan dengan rasa kenyang.<sup>70</sup>

#### 2.4.3.5. Obesitas dan Inflamasi

Pertambahan BB dan kegemukan merupakan faktor resiko penyakit dikarenakan penyumbatan insulin serta perkembangan DMT2 menjadi aterosklerosis dan penyakit hati berminyak non-alkohol. Mengenai peran peradangan yang memicu obesitas dalam patogenesis dan perkembangan penyakit penyerta, hubungan antara obesitas dan peradangan baru-baru ini menimbulkan kekhawatiran yang signifikan.<sup>70</sup>

Beberapa penelitian epidemiologi yang sedang berlangsung telah menegaskan dan memperluas pemahaman penemuan masa lalu sehubungan dengan peningkatan reaktan tahap intens pada subjek gemuk, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan C-receptive protein (CRP). Rasa kenyang dan berat badan berhubungan dengan pengumpulan lipid di adiposit dan perkembangan jaringan lemak. Sel lemak yang membesar dapat menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti IL-6.<sup>71</sup>

Pengumpulan lipid di jaringan lemak dan peningkatan massa lemak menyebabkan siklus kebakaran. Hal ini mungkin dimulai dengan pembentukan adiposit yang mendukung sitokin dan kemokin pembakar.. Sel endotel merespons dengan memperluas perkembangan atom

perlekatan, yang bersama dengan kemokin, kemokin yang mengikat sel-sel yang kebal, termasuk makrofag yang ditentukan monosit, ke jaringan lemak. Secara bersamaan, adiposit - sel kekebalan- dan sel endotel serta keturunannya menginduksi peradangan yang menyebabkan resistensi insulin lokal. Mediator pro-inflamasi dan pro-arterogenik serupa memasuki sirkulasi, menyebabkan resisten insulin dan meningkatkan risiko aterosklerosis.<sup>72</sup>

## **2.5. Hipoksia**

### **2.5.1. Definisi**

Kerusakan sel merupakan akibat dari penurunan respirasi oksidatif aerobik pada hipoksia, yaitu suatu kondisi hipoksia. Hipoksia adalah penyebab utama dan normal kerusakan dan kematian sel, namun hal ini bergantung pada tingkat keparahan hipoksia. Dalam hipoksia, sel dapat berubah bentuk, diragikan, atau mati.<sup>73</sup>

### **2.5.2. Penyebab Hipoksia Berdasarkan Mekanismenya**

Penyebab hipoksia dapat dibagi menjadi tiga kategori berdasarkan mekanismenya yaitu:<sup>74</sup>

- 1) Hipoksia hipoksik: Penyebab hipoksia hipoksik adalah kurangnya pasokan oksigen ke jaringan tubuh. Beberapa penyebab hipoksia hipoksik antara lain:

- Gangguan pernapasan seperti asma, emfisema, pneumonia, atau kegagalan ventilasi.
- Penurunan tekanan oksigen atmosferik, seperti di daerah yang tinggi di atas permukaan laut.
- Gangguan sirkulasi darah seperti serangan jantung atau stroke.
- Anemia, yang merupakan kondisi ketika jumlah sel darah merah atau hemoglobin dalam darah berkurang.

2) Hipoksia anemik: Penyebab hipoksia anemik adalah kurangnya jumlah sel darah merah atau hemoglobin dalam darah. Beberapa penyebab hipoksia anemik antara lain:

- Anemia defisiensi besi, yaitu kondisi di mana tubuh kekurangan zat besi yang diperlukan untuk membuat sel darah merah.
- Defisiensi vitamin B12 atau asam folat, yang diperlukan untuk membuat sel darah merah.
- Keracunan karbon monoksida, gas yang mengikat hemoglobin lebih kuat daripada oksigen, sehingga mengurangi jumlah oksigen yang bisa dibawa oleh darah.

3) Hipoksia sirkulatorik: Penyebab hipoksia sirkulatorik adalah kurangnya aliran darah ke jaringan tubuh. Beberapa penyebab hipoksia sirkulatorik antara lain:

- Syok, yaitu kondisi di mana tekanan darah turun tajam dan tubuh tidak mendapatkan cukup oksigen dan nutrisi.
- Gagal jantung, yaitu kondisi di mana jantung tidak dapat memompa darah dengan cukup kuat.

### 2.5.3. Jenis Hipoksia

Berdasarkan jenisnya, hipoksia dibedakan menjadi 4 kelompok, yaitu: 1) Hipoksia. Hipoksia adalah kekurangan oksigen, jadi berapa banyak oksigen dalam darah yang berkurang. Halangan atau penyumbatan jalur penerbangan bisa menjadi penyebabnya. 2) Karena hemoglobin dalam darah tidak mampu mengikat atau memindahkan oksigen yang cukup untuk pencernaan sel, hipoksia pucat adalah tidak adanya oksigen. Seperti karbon monoksida (CO<sub>2</sub>) yang bersifat negatif. 3) Hipoksia kongestif adalah kekurangan oksigen karena hemoglobin dalam darah tidak dapat membawa oksigen ke jaringan karena gangguan peredaran darah seperti masalah kardiovaskular atau emboli. 4) Hipoksia jaringan beracun adalah suatu kondisi hipoksia karena kegagalan jaringan dalam mempertahankan oksigen. Sebuah model merugikan sianida. Sianida dalam tubuh pasti akan melepaskan berbagai bahan kimia pengoksidasi melalui jaringannya. Pada dasarnya sitokrom oksidase dengan membatasi pengumpulan zat besi heme darah yang membawa oksigen.<sup>75-77</sup>



## 2.6. Sel Punca Mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cell*)

### 2.6.1. Definisi

Sel induk adalah sel prekursor yang memperbaharui diri untuk jaringan yang dapat berdiferensiasi menjadi banyak garis sel dan membentuk populasi sel klonal. Merek dagang unik ini dapat memulihkan kemampuan banyak jaringan. Saat ini, jenis sel yang tidak berdiferensiasi dapat dibagi menjadi tiga jenis: (I) sel-sel yang tidak berdiferensiasi yang belum berkembang mulai dari fase awal organisme yang baru jadi; (ii) mikroorganisme belum matang berpotensi majemuk yang diaktifkan dan (iii) sel induk dewasa termasuk sel induk hematopoietik, sel induk saraf dan sel induk mesenkim atau *mesenchymal stem cell* (MSC).<sup>78</sup>

Pengumpulan lipid di jaringan lemak dan peningkatan massa lemak menyebabkan siklus kebakaran. Hal ini mungkin dimulai dengan pembentukan adiposit yang mendukung sitokin dan kemokin. Sel endotel merespons dengan memperluas perkembangan atom perlekatan makrofag yang ditentukan monosit, ke jaringan lemak. Migrasi sel induk ke lokasi cedera terjadi di endotel melalui jalur mirip leukosit yang melibatkan *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (NCAM- 1) dan reseptor berpasangan yang memberi sinyal protein-G. Sistem selanjutnya adalah pemisahan menjadi beberapa jenis sel, yang terbentuk secara khusus dan memicu reklamasi utilitarian dengan memperbaharui atau mengganti jaringan

yang rusak. Sekresi faktor bioaktif, yang mempunyai kemampuan mempengaruhi proses fisiologis lokal dan sistemik, merupakan mekanisme utama ketiga.<sup>79,80</sup>

### 2.6.2. Karakteristik Sel Punca

Beberapa karakteristik khusus yang harus dimiliki sel punca harus, diantaranya:<sup>81</sup>

1. *Self-renewal*: Kemampuan sel punca untuk memperbanyak diri secara tak terbatas, sehingga dapat membentuk populasi sel punca yang lebih besar.
2. *Differentiation*: Kemampuan sel punca untuk berdiferensiasi menjadi sel dalam tubuh, seperti sel otot, sel darah, sel saraf, dan sebagainya.
3. *Pluripotent*: Sel yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel dari semua jenis jaringan dalam tubuh.
4. *Multipotent*: Sel punca dewasa memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel dari jenis-jenis jaringan yang terbatas.
5. *Quiescence*: Sel punca dapat memasuki keadaan istirahat atau tidak aktif dalam jangka waktu yang lama, dan kemudian kembali aktif ketika diperlukan.
6. *Potency*: Sel punca memiliki kemampuan untuk membentuk berbagai jenis sel dalam jangkauan potensi yang ditentukan oleh jenis dan sumber sel punca tersebut.

7. *Heterogeneity*: Sel punca dapat memiliki perbedaan dalam kemampuan untuk membelah, berdiferensiasi, dan menghasilkan jenis sel yang berbeda-beda.

### 2.6.3. Jenis-Jenis dan Manfaat-Manfaat Sel Punca

Jenis mikroorganisme yang belum matang seperti yang ditunjukkan oleh dr. Widjahajaim, Raymond KK, FINSADV, FAADV., menghitung mikroorganisme belum matang tahap awal dan belum berkembang. Mikroorganisme belum matang yang belum berkembang dimulai dari tahap blastomitosis pada saat persiapan sperma dan sel telur. 82 Hal ini sejalan dengan jenis sel punca yang tertuang dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 32 Tahun 2021 Tentang Pengembangan Sel Punca dan/atau Sel, Pasal 6 ayat 4 dan 5.

Menurut George Kolios dan Yuben Moodley, berbagai jenis mikroorganisme dasar dipisahkan menjadi beberapa kelas dengan mengacu pada sumber selain Pedoman Pastor Kesejahteraan. Mikroorganisme dasar dikelompokkan menjadi lima kelas sesuai dengan kemampuannya untuk memisahkan :

#### 1) Sel *Totipotent (omnipotent)*

Sel totipoten atau tertinggi adalah sel yang paling tidak terpisahkan dan ditemukan pada awal perkembangan oosit dan sel yang dirawat pada dua sel pertama. Sel-sel ini terpisah

menjadi jaringan yang belum berkembang dan ekstraembrionik.<sup>83</sup>

## 2) Sel *Pluripotent*

Karena kemampuan ini terdapat pada sel germinal dan sel embrio, maka sel berpotensi majemuk merupakan turunan dari sel totipoten. Sel berpotensi majemuk dapat berdiferensiasi menjadi hampir semua sel..<sup>84</sup>

## 3) Sel *Multipotent*

Sel induk dewasa yang dapat memperbaharui diri atau berdiferensiasi menjadi jenis sel tertentu yang terdapat pada jaringan atau organ tertentu disebut sel multipoten.<sup>85</sup>

## 4) Sel *Oligopotent*

Sel oligopoten adalah sel induk yang dapat berdiferensiasi menjadi Misalnya, kornea mata dapat menghasilkan provinsi sel kornea dan konjungtiva.<sup>86</sup>

## 5) Sel *Unipotent*

Sel unipoten adalah sel yang dapat menghasilkan sel serupa namun dapat memulihkan dirinya sendiri. Akibatnya, sel tidak dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel tertentu dan membentuk satu garis keturunan, seperti halnya sel induk otot, sehingga menghasilkan sel otot yang matang.<sup>87</sup>

## 2.7. Sekretom Sel Punca Mesenkimal

### 2.7.1. Definisi

Sekretom adalah atom yang dibuang ke ruang ekstraseluler, sebagai protein yang dapat larut, asam nukleat bebas, dan lipid. Vesikel ekstraseluler dapat dipartisi menjadi organel apoptosis, mikrogranular, dan eksosom. Setiap sekresi sel dan jaringan bersifat unik dan dapat bervariasi sebagai respons terhadap kondisi fisiologis atau patologis.<sup>88</sup>

Sebagai pengobatan, sekretom memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan mikroorganisme muda pada umumnya, terutama dalam hal keamanan (kesamaan yang kebal, potensi penyebab kanker, emboli, dan penularan virus). Kapasitas pelepasan juga lebih aman karena krioprotektan berbahaya tidak diperlukan untuk perlindungan jangka panjang tanpa mengurangi kelayakannya.<sup>89</sup>

Emisi mikroorganisme yang belum matang dapat memengaruhi perluasan, inisiasi, dan kemampuan sel yang aman. Makhluk berkonsentrasi pada bukti bahwa emisi mikroorganisme yang belum matang menghalangi kekebalan alami dan serbaguna. Proliferasi sel T CD4 dan CD8 dapat diperlambat oleh sekresi dari sel induk. Kemudian, elemen sekretorik mikroorganisme yang belum matang dalam tiga tahap dasar adalah reaksi aman, pengenalan dan pertunjukan antigen, pembentukan limfosit, penggandaan dan

pemisahan, dan aktivasi sel darah putih efektor. Molekul imunoregulasi terlarut seperti TNF B1 dan IL27 bertanggung jawab atas efek anti-inflamasi sekresi sel induk. Harmoni antara menenangkan dan mendukung sitokin yang berapi-api mempertimbangkan peningkatan hasil sambil mengarahkan sekretom. Selain itu, sekretom sel yang belum berkembang juga menekan sitokin proinflamasi seperti IFN- $\gamma$  dan TNF-alpha dan meningkatkan IL 10..<sup>90-93</sup>

### **2.7.2. Keunggulan Sekretom Sel Punca Mesenkimal**

Berbagai studi menunjukkan SSPM bisa meningkatkan pemeliharaan beberapa komponen, termasuk mencegah apoptosis, mengatur reaksi pemicu, dan mengembangkan instrumen perbaikan endogen seperti angiogenesis dan neurogenesis, sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif. Media cetakan SSPM mempunyai keunggulan dibandingkan SSPM misalnya ketahanannya yang rendah, memiliki efek menenangkan dan non-kanker. Selain itu, mudah digunakan, mudah diproduksi dalam jumlah banyak, dan aman disimpan pada suhu antara 20°C dan 80°C. Selain itu, karena tidak mengandung sel induk, produk ini dapat membantu meringankan beberapa potensi bahaya dan masalah etika yang mungkin timbul dari pemrosesan sel induk. Media yang diperoleh dari proses kultur SSPM dengan media hipoksia yang diubah adalah Hypoxic Mesenchymal Undifferentiated Organism



Molded Media (SSPM). Menurut data yang tersedia, faktor pertumbuhan dan sitokin diekspresikan lebih kuat pada media terkondisi hipoksia dibandingkan pada media terkondisi normoksik.<sup>94,95</sup>



## BAB III

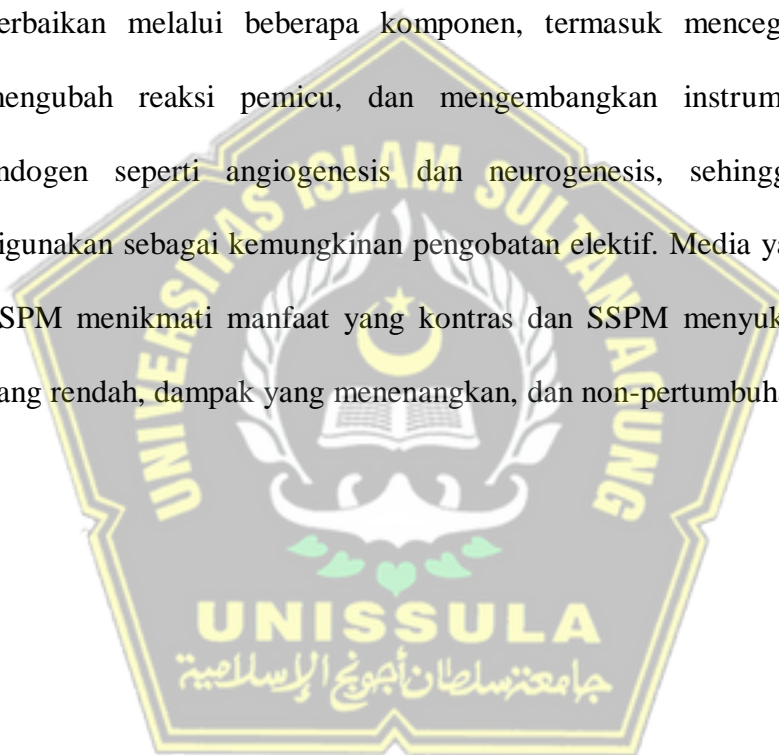
### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

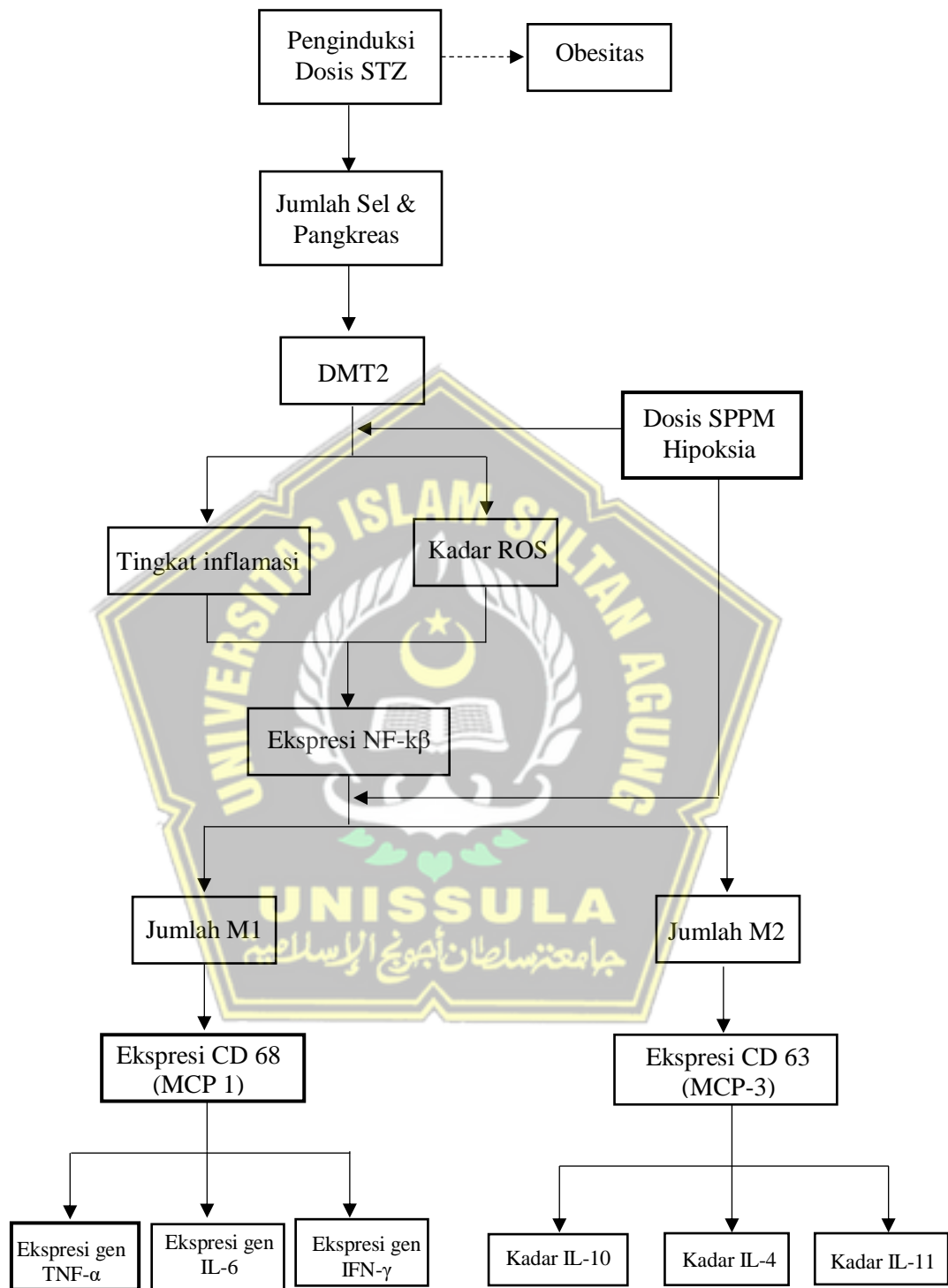
#### 3.1. Kerangka Teori

Pemberian *Streptozotocin* (STZ). menyebabkan kelainan metabolisme lipid (lemak), di mana terjadi peningkatan kadar glukosa yang memicu timbulnya Diabetes Melitus tipe 2 (DMT2). Kondisi ini dapat memperluas terciptanya oksigen reseptif dan mengintensifkan ROS (responsive oksigen spesies) dalam tubuh. Peningkatan ROS yang melampaui batas senyawa pencegah kanker sehingga merugikan protein, DNA (Deoxy Nucleic Corrosive) dan lapisan sel dalam tubuh. Penumpukan adiposa dan penumpukan lemak visceral keduanya disebabkan oleh ketidakseimbangan asupan dan pengeluaran energi selama aktivitas fisik.<sup>20</sup> Pengumpulan lemak secara naluriah menyebabkan hipertrofi lemak dan memicu hipoksia pada retikulum endoplasma sel, menyebabkan kematian adiposit dan penetrasi MCP 1. Jika hal ini terjadi berulang kali, hal ini akan meningkatkan masuknya sitokin pemicu yang menguntungkan oleh MCP 1, seperti TNF- $\alpha$ , yang pada akhirnya akan menyebabkan peradangan di dekatnya dan secara mendasar, yang akan mengganggu transmisi sinyal insulin<sup>14,15</sup>. Saat ini, obat antihiperlikemik oral dan insulin digunakan untuk mengobati pasien DMT2 seumur hidup. Perawatan ini hanya menurunkan glukosa tetapi tidak dapat sepenuhnya menghilangkan penyebab penyumbatan insulin dan tidak memperbaiki kerusakan pada sel  $\beta$  pankreas. Selanjutnya, pengobatan T2DM yang lebih baik, yang mungkin dapat meningkatkan kemampuan sel  $\beta$ , akan bermanfaat bagi korban T2DM.

Penanda makrofag M1 meningkat oleh makanan lemak. Makrofag tipe 2 (M2) berperan penting dalam menghentikan peradangan melalui penghambatan jalur NF-κB. Adiposit berukuran besar menghasilkan lebih banyak spesies oksigen reaktif (ROS), dan ROS ini mungkin merupakan salah satu agen yang menarik makrofag ke dalam jaringan adiposa.<sup>96</sup>

*Stromal Cell Derived Mesenchymal Undeveloped (SSPM)* dapat memajukan perbaikan melalui beberapa komponen, termasuk mencegah apoptosis, mengubah reaksi pemicu, dan mengembangkan instrumen perbaikan endogen seperti angiogenesis dan neurogenesis, sehingga cenderung digunakan sebagai kemungkinan pengobatan elektif. Media yang diadaptasi SSPM menikmati manfaat yang kontras dan SSPM menyukai kerentanan yang rendah, dampak yang menenangkan, dan non-pertumbuhan.



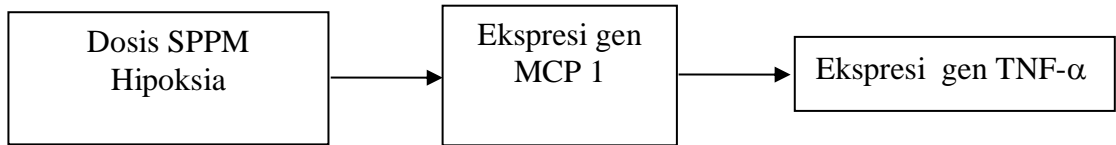


**Keterangan**

: Variabel yang diteliti

**Gambar 3.1.** Skema Kerangka Teori`

### 3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Skema Kerangka Konsep

### 3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ.

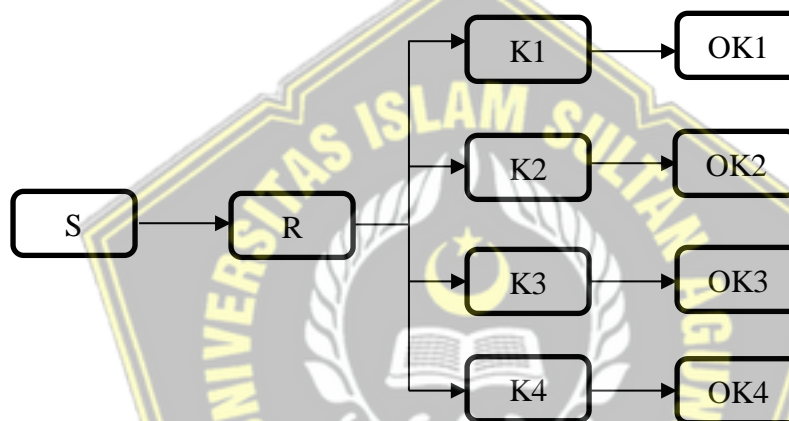


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* terhadap hewan coba tikus jantan galur *Wistar*.



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Subyek penelitian

R : Randomisasi menjadi 4 kelompok

K1 : Kelompok kontrol sehat yang diberi pakan *standard* dan diberi aquadest

K2 : Kelompok subyek obesitas melitus tipe 2 dengan NaCL 0,9 %.

K3 : Kelompok subyek obesitas melitus tipe 2 perlakuan sekretom dosis 250  $\mu$ l.

K4 : Kelompok subyek obesitas melitus tipe 2 perlakuan sekretom dosis 500  $\mu$ l.

OK1 : Observasi pada kelompok 1

OK2 : Observasi pada kelompok 2



OK3 : Observasi pada kelompok 3

OK4 : Observasi pada kelompok 4

#### **4.2. Populasi Penelitian**

Populasi peninjauan terdiri dari hewan pengerat wistar jantan yang berumur 8 hingga 12 minggu, dengan berat antara 180 dan 220 gram. Unit Pelayanan Hewan Percobaan Universitas Islam Sultan Agung Semarang menyediakan tikus wistar jantan. Tikus diberi pelet standar merek Citrafeed dan air minum jenis air sulingan, dengan suhu ruangan peninggian sekitar 28o - 32o C, dengan ventilasi dan wilayah ruangan yang memadai. Tikus disesuaikan selama 7 hari sebelum ditangani.

##### **4.2.1. Teknik Pengambilan Sampel**

Metode pemeriksaan pada eksplorasi ini menggunakan pemeriksaan langsung. Sebanyak 24 ekor hewan tikus wistar jantan yang memenuhi kriteria pertimbangan dipisahkan menjadi empat kelompok dengan pemeriksaan rutin langsung, yaitu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan.

##### **4.2.2. Kriteria Inklusi**

- a. Tikus sehat, bergerak aktif, makan dan minum cukup
- b. Secara makroskopis tikus tidak ada kelainan morfologi
- c. Obesitas (indeks Lee > 300)
- d. Terbukti DM (GDP>126)

#### 4.2.3. Kriteria Eksklusi

- a. Memiliki kelainan anatomis
- b. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya

#### 4.2.4. Kriteria *Drop Out*

Tikus sakit atau mati saat penelitian berlangsung.

#### 4.2.5. Jumlah Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu:

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

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

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

$$3n \geq 18$$

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

Keterangan:

t : Jumlah kelompok perlakuan

n : besar sampel setiap kelompok perlakuan

Sampel dirandomisasi menggunakan cara *simple random sampling*, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Jumlah keseluruhan sampel tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor.

### 4.3. Variabel dan Definisi Operasional

#### 4.3.1. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l dan 500  $\mu$ l.

b. Variabel Antara

Variabel antara penelitian ini adalah ekspresi gen MCP 1.

c. Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah ekspresi gen TNF- $\alpha$ .

d. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah jenis kelamin, berat badan, umur tikus, pakan dan minum hewan coba.

#### 4.3.2. Definisi Operasional

a. Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia

Protein pelarut yang mengandung faktor IL-10, VEGF dan PDGF diperoleh dari koperasi pelepasan SPM Umbilical Line. ( kualitas artikulasi CD73, CD90 dan CD105 serta tidak berkomunikasi CD13, CD14, CD16, CD21 pada suhu 370C dalam keadaan 5% O<sub>2</sub> selama 24 jam Teknik flowcytometry satuan ml.

Skala : Ordinal.

b. Ekspresi Gen TNF- $\alpha$

Ekspresi gen TNF- $\alpha$  diperiksa di laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung Metode kuantitatif reaksi berantai polimerase waktu nyata (qRT-PCR), yang disajikan dalam bentuk persentase, digunakan untuk mengekstraksi RNA untuk dianalisis.

Skala : Rasio.

c. Ekspresi Gen MCP 1 (M1)

Ekspresi Gen MCP 1 diperiksa di laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung Metode kuantitatif reaksi berantai polimerase waktu nyata (qRT-PCR), yang disajikan dalam bentuk persentase, digunakan untuk mengekstraksi RNA untuk dianalisis.

Skala : Rasio.

#### 4.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

##### 4.4.1. Instrumen Penelitian

Eksplorasi ini meliputi peralatan sebagai kandang hewan pengerat dengan aspek L: 40 cm, L: 30 cm, H: 30 cm dengan feeder, sisik hewan pengerat “Nigushi Scale”, peralatan kultur sel yang terdiri dari Biosafety Bureau (BSC), mikropipet, CO<sub>2</sub> pembenihan, pembongkaran bungkusan, dan toples 75T. Kondisi kultur hipoksia diperoleh dengan menggunakan ruang hipoksia. Pengukur oksigen digunakan untuk mengukur kadar oksigen dalam ruang hipoksia.

Alat penerimaan DM adalah gelas wadah, pengaduk, jarum 1 cc, timbangan dan handscoon, tes glukosa sederhana. Swab steril juga digunakan dalam penelitian ini untuk mengaplikasikan gel SH-MSD dan alat PCR.

#### **4.4.2. Bahan Penelitian**

Albumin serum Dinitrofenil-bovin (DNP-BSA), gel aluminium hidroksida ( $Al(OH)_3$ ), 2,4-Dinitroklorobenzena (DNKB), aseton-minyak zaitun NaCl (0,9 persen), PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep adalah Bahan kultur yang digunakan dalam penelitian ini, sedangkan bahan yang digunakan untuk siklus pengobatan adalah streptomisin, pendukung sitrat, gel berbahan dasar air, ketamin, dan xylazine.

#### **4.5. Cara Penelitian**

##### **4.5.1. Cara Persiapan Sebelum Perlakuan**

- a. Tes ujian, yaitu makhluk eksplorasi tertentu yang harus memenuhi langkah-langkah pertimbangan, dipilih secara acak sebanyak 24 orang dengan rincian 4 kelompok, jumlah tes untuk setiap kelompok adalah 6 orang, termasuk kelompok patokan dan tiga kelompok perlakuan, kemudian , pada saat itu, disesuaikan untuk beberapa minggu.

- b. Sampel sebanyak 24 ekor tikus jantan galur *Wistar* diaklimatisasi di dari Laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung.
- c. Pemeliharaan hewan uji pada keempat kelompok tersebut diberikan pakan standar yang terdiri dari 20-25% protein, 45-55% pati, 10-12% lemak, dan 4% serat kasar serta minum air putih sejenis secara konsisten selama 7 hari.

#### **4.5.2. Cara Penggemukan Tikus**

Mencit diberikan diet tinggi lemak dan kalori yaitu 50% pakan standar BR, 25% tepung terigu, 10% lemak kambing, 8,9% lemak babi, 5% kuning telur, 1% minyak kelapa, dan 10% NACL. . Diet ini dilakukan dalam jangka waktu yang sangat lama. Status kesehatan hewan pengerat ditentukan, dianggap gemuk jika rekor Lee lebih dari 300.

#### **4.5.3. Induksi Diabetes**

Seluruh tikus (18 ekor mencit) disuntik STZ dengan dosis 50 mg/kg berat badan dan NA dengan dosis 15 mg/kgbb secara intraperitoneal menggunakan spuit 1 cc dan mendapat 50 cc larutan sukrosa 30% self-promoting elama 2 hari. Pengukuran glukosa darah puasa 4-6 jam dilakukan dari pembuluh darah vena kaudal/lateral dan penimbangan tikus dilakukan 7 hari setelah penyuntukan STZ terakhir, menggunakan sensor glucoDR Bio dan timbangan dengan



cermat alat pengukur glukosa darah digital (total 7 hari dengan pedoman diabetes). Tikus dinyatakan diabetes bila kadar glukosa darah puasa > 126 mg/dL.

#### 4.5.4. Perhitungan Resistensi Insulin (HOMA-IR)

Serum dikumpulkan dari vena suborbital tikus setelah 4-6 jam puasa, kadar insulin dinilai dengan ELISA. Gula darah puasa dihitung menggunakan alat pengukur glukosa darah. Hitung HOMA-IR menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Insulin darah puasa } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glukosa darah puasa (mmol/ml)}}{22,5}$$

#### 4.5.5. Teknik Isolasi Sel Punca Mesenkimal dari *Umbilical Cord*

Keseluruhan siklus dilakukan di biro aman tingkat 2, menggunakan peralatan steril dan dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sangat aseptik. Tali pusar hewan pengerat bunting dikumpulkan dan ditempatkan dalam kompartemen steril yang mengandung NaCl 0,9%. Tali pusar dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian dicuci bersih dengan PBS dan dipotong dengan pisau steril menjadi beberapa bagian berukuran 3-5 cm. Pembuluh darah dikeluarkan dan potongan tali pusat sepanjang 3-5 cm dipindahkan ke cawan petri steril. Setiap titik masuk fokus digunakan dengan gunting mata yang tajam atau bisturi yang diremas menjadi potongan berukuran 1 mm. Pusar kecil ditempatkan dalam cawan kultur jaringan berukuran 60 mm dengan bintik-bintik

yang tersebar merata pada lapisan luar cawan kultur jaringan. Media lengkap disanitasi menjadi 2-3 ml. Jaringan dikembangbiakkan di hatchery 37 dan 5% CO<sub>2</sub>. Jaringan tersebut diperhatikan seperti jarum jam untuk memeriksa apakah ada sel yang muncul dari lokasi penanaman. Substitusi media dilakukan setiap 2-3 hari sekali dengan cara pengambilan sebagian media menggunakan mikropipet yang kemudian diganti dengan media baru sesuai dengan titik potong yang diambil.

#### **4.5.6. Validasi dan Karakteristik SPM**

Jaminan imunofenotip SPM hewan pengerat diselesaikan dengan memeriksa pernyataan CD29, CD31, CD45, dan CD90 dengan uji sitometri aliran. Sel dihilangkan dari guci dengan trypsin (Gibco BRL, Fabulous Island, NY, USA) atau pengaturan pemisah lainnya. Kemudian, sel dicuci dan diresuspensi dalam BD Pharmingen™ Staining Buffer (item No. 1 dengan konsentrasi 1 x 10<sup>7</sup> sel/mL). 554656) atau 1 mL trypsin PBS (Gibco BRL, Excellent Island, NY, USA). Jika jumlah sel terbatas, sel dapat diresuspensi dengan konsentrasi 5x10<sup>6</sup> sel/mL. Satu tabung hawk 5 ml telah siap dan diberi tanda sebagai berikut:

**Tabel 4.1. Reagen yang Digunakan Dalam Analisis *Flow Cytometry***

<b>Tabung</b>	<b>Reagen</b>	<b>Volume</b>
1	FITC mouse anti-human CD29	5 $\mu$ l
2	PE mouse anti-human CD44	5 $\mu$ l
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5 $\mu$ l
4	APC Mouse anti-human CD31	5 $\mu$ l
5	Kosong	-
6	hSPM positive isotypecontrolcocktail	20 $\mu$ l
	hSPM negative isotypecontrol cocktail	20 $\mu$ l
	hSPM positive cocktail	20 $\mu$ l
7	PE hSPM negative cocktail	20 $\mu$ l

Tabung 5-7 diulangi untuk setiap contoh tambahan yang dibedah. Pengujian diambil sebanyak 100  $\mu$ l pada masing-masing silinder kemudian divorteks atau disadap. Sel diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar di ruangan kusam dan dicuci dua kali dengan bantalan pewarnaan (PBS) dan sekali lagi disuspensikan dengan 300 hingga 500 $\mu$ l pendukung pewarnaan (PBS) atau sekali dengan pengaturan pewarnaan craled (PBS). Tabung 1-5 bertindak sebagai kontrol untuk mengatur sitometri aliran (sebagai penyeimbang) sambil membaca dengan teliti pemeriksaan sitometri aliran.

#### **4.5.7. Uji Diferensiasi SPM**

Keseluruhan siklus dilakukan di biro aman tingkat 2, menggunakan peralatan steril dan dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sangat aseptik. Tali pusar hewan pengerat bunting dikumpulkan dan ditempatkan dalam kompartemen steril yang mengandung NaCl 0,9%. Tali pusar dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian dicuci bersih dengan PBS dan dipotong dengan

pisau steril menjadi beberapa bagian berukuran 3-5 cm. Pembuluh darah dikeluarkan dan potongan tali pusat sepanjang 3-5 cm dipindahkan ke cawan petri steril. Setiap titik masuk fokus digunakan dengan gunting mata yang tajam atau bisturi yang diremas menjadi potongan berukuran 1 mm. Pusar kecil ditempatkan dalam cawan kultur jaringan berukuran 60 mm dengan bintik-bintik yang tersebar merata pada lapisan luar cawan kultur jaringan. Media lengkap disanitasi menjadi 2-3 ml. Jaringan dikembangbiakkan di hatchery 37 dan 5% CO<sub>2</sub>. Jaringan tersebut diperhatikan seperti jarum jam untuk memeriksa apakah ada sel yang muncul dari lokasi penanaman. Substitusi media dilakukan setiap 2-3 hari sekali dengan cara pengambilan sebagian media menggunakan mikropipet yang kemudian diganti dengan media baru sesuai dengan titik potong yang diambil.

Uji diferensiasi adipogenik memiliki prosedur yang sama, kemudian medium kultur diganti *Basal Diferensiasi Adipogenic MesenCult*<sup>™</sup> (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) ditambah dengan 20% Suplemen Diferensiasi Adipogenik *MesenCult*<sup>™</sup> 5X (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dan 1% L-Glutamine (Gibco<sup>™</sup> Invitrogen, NY, USA). Media dideferensiasi diperbarui setiap 3 hari selama kurang lebih 30 hari, diferensiasi adipogenik divisualisasikan dengan pewarnaan *Oil Red O* (Sigma, St. Louis, MO, USA).

#### **4.5.8. Perlakuan hipoksia pada SPM**

Labu T75 yang berisi SPM passase 5 dengan pertemuan 95% ditempatkan dalam ruang anoksik. CO<sub>2</sub> dimasukkan ke dalam ruang hipoksia dan kadar O<sub>2</sub> diukur dengan DO meter hingga mencapai 5%. SPM dalam ruang anoksik kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Kandungan gas dalam ruang hipoksia kembali normal setelah 24 jam inkubasi. Labu T75 kemudian dikeluarkan dari ruang hipoksia. Media hipoksia SPM hipoksia kemudian dikeluarkan dan ditempatkan dalam tabung berbentuk kerucut 50mL untuk filtrasi.

#### **4.5.9. Metode Filtrasi menggunakan TFF pulse**

Media hipoksia SPM dalam tabung berbentuk corong 50 mL dipindahkan ke denyut TFF di BSC untuk filtrasi sekretom. Saluran chip 300 kDa dan 5 kDa digunakan untuk mengisolasi partikel >300 kDa dan <5 kDa dari media sonikasi SPM. Kemudian, saluran chip 10 kDa, 50 kDa, dan 100 kDa digunakan untuk mengisolasi partikel dalam iklim SPM hipoksia berdasarkan beberapa jenis rentang berat sub-atom, termasuk 10-30 kDa, 30-50 kDa, 50-100 kDa dan 100-300 kDa. NaCl kemudian digunakan untuk menghancurkan atom-atom yang terpisah. Kemudian, sekretom hipoksia SPM disiapkan dengan mencampurkan setengah atom 10-50 kDa, 25% partikel 50-100 kDa dan 25% partikel 100-300 kDa.

#### **4.5.10. Validasi Sekretom SPM Hipoksia**

Kandungan molekul pro-inflamasi, anti-inflamasi dan faktor pertumbuhan dalam secretom SPM hipoksia dikonfirmasi menggunakan kit ELISA. Secretom hipoksia SPM dianalisa untuk mengetahui kandungan molekul pro-inflamasinya, seperti TNF- $\alpha$ , IL-6; molekul anti-inflamasi seperti IL-10 dan TGF- $\beta$ ; dan faktor pertumbuhan seperti VEGF, FGF dan PDGF. Secretom dengan molekul antiinflamasi dan faktor pertumbuhan tingkat tinggi serta molekul pro-inflamasi tingkat rendah akan digunakan untuk penelitian ini.

#### **4.6. Perlakuan Pada Hewan Coba**

Setelah dilakukan pelatihan model DMT-2, mencit disuntik zat secretom sebanyak 250uL dan 500uL secara IP pada hari ke 0, 7 dan 14. Tikus kontrol disuntik dengan NaCl.

##### **4.6.1. Pengambilan Sampel Darah Tikus**

Dengan menggunakan tabung hematokrit, darah tikus diambil melalui vena orbital. Axis pada 3000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh serum. Pengambilan serum dilakukan pada hari ke 21 setelah perlakuan.



#### 4.6.2. Pembacaan ekspresi gen TNF- $\alpha$ dan gen MCP 1 dengan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

4.6.2.1. Ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan gen MCP 1 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

4.6.2.2. Campuran dari 3  $\mu$ L cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan MgCl<sub>2</sub>) sebanyak 12,5  $\mu$ L, primer spesifik sebanyak 0,6  $\mu$ L untuk primer forward dan reverse dan 8,3  $\mu$ L Nuclease Free Water.

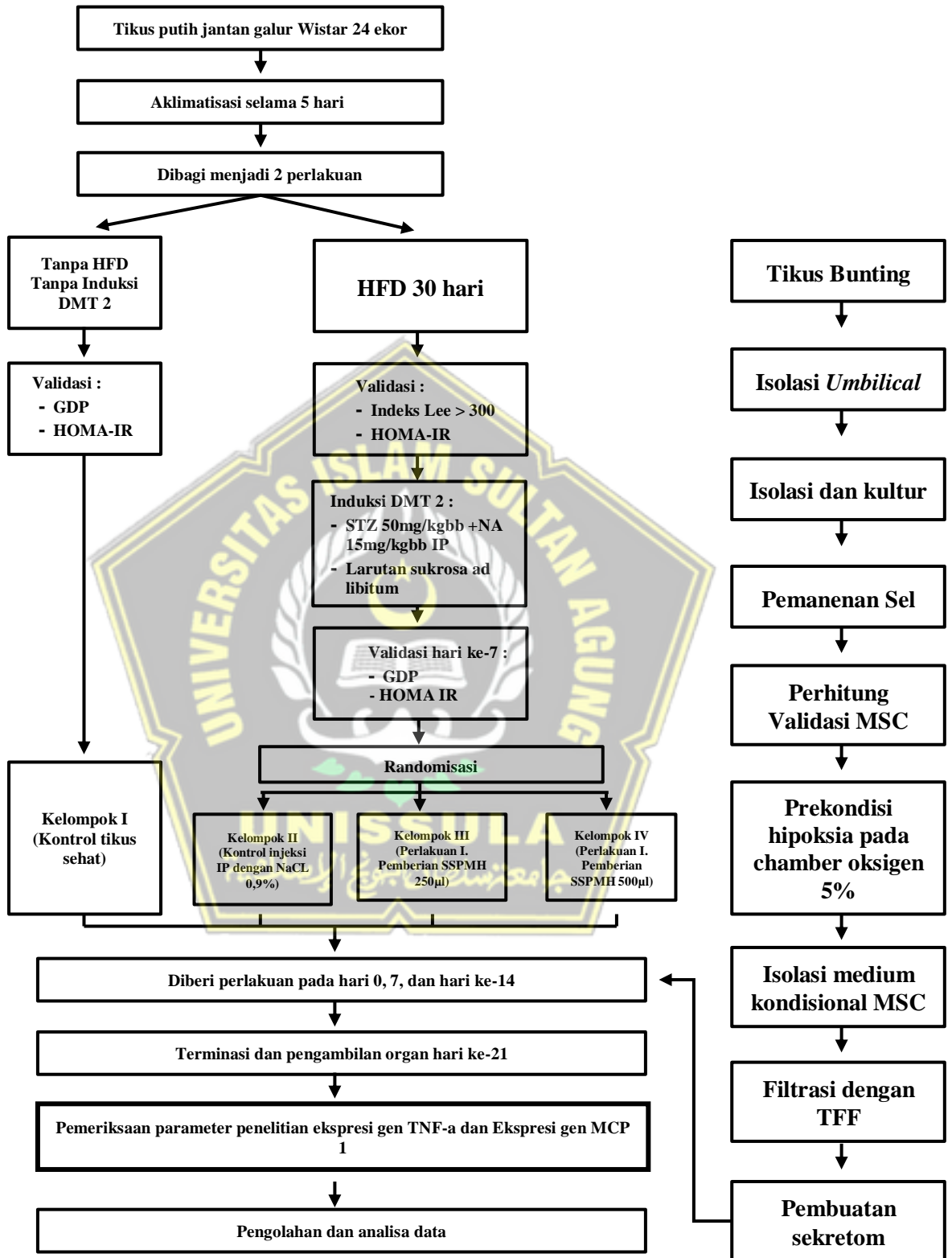
4.6.2.3. Primer TNF- $\alpha$  yang digunakan adalah F: 5' GAGCGTTACCAGAACCTGTCTC dan R: 5' AGTAACCGCAGTTCTCTGTAGGT dan primer MCP 1 yang digunakan adalah F: 5' CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG dan R: 5' GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC Primer housekeeping Primer GADPH, F: 5' ACTCCACTCACGGCAAATTC R: 5' TCTCCATGGTGGTGAAGACA Primer  $\beta$  actin, F: 5' CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG R: 5' TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

4.6.2.4. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine

4.6.2.5. Peningkatan ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan gen MCP 1 dianalisis dalam ratio peningkatan terhadap house keeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.



#### 4.7. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

#### 4.8. Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Penelitian menggunakan hewan coba tikus dilakukan di Laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung pada bulan Mei 2023.
- b. Pemeriksaan ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 dilakukan di Laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung pada bulan Juni 2023.

#### 4.9. Analisis Data

Data rerata ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan MCP 1 disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel (grafik). Kemudian data di uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene test*. Bila distribusi data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Bila hasil uji *One Way Anova*  $p < 0,05$  dilanjut dengan uji *post hoc* dengan uji Tukey. Bila distribusi data normal dan tidak homogen dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Bila hasil uji *One Way Anova*  $p < 0,05$  dilanjut dengan uji *post hoc* dengan uji Tamhane. Bila distribusi data tidak normal dan tidak homogen, maka dipakai uji non parametrik uji *Kruskal Wallis*. Bila hasil *Kruskal Wallis*  $p < 0,05$  dilanjut dengan uji beda non parametrik dua kelompok menggunakan uji *Man Whitney*.

#### 4.10. Jadwal Pelaksanaan Penelitian

Jadwal waktu penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 4.11. *Ethical Clearance*

*Ethical clearance* penelitian diajukan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.



## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Penelitian

Penelitian pengaruh pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  dan MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ telah dilakukan selama 21 hari di Laboratorium Lembaga Penelitian Sel Punca Sultan Agung. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel 5.1.

**Tabel 5.1. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada Ekspresi TNF- $\alpha$  dan MCP 1**

Variabel	Kelompok				Sig.(p)
	K1 N=5	K2 N=5	K3 N=5	K4 N=5	
<b>Ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>					
Mean	1.00	8.00	4.85	3.19	
Std.deviasi	0.00	4.63	1.66	3.19	
<i>Shapiro Wilk</i>		0.644*	0.379*	0.418*	
<i>Levene Test</i>					0.003
<i>One Way Anova</i>					0.006***
<b>Ekspresi MCP 1</b>					
Mean	1.00	7.04	2.65	1.57	
Std.deviasi	0.00	5.86	1.73	1.36	
<i>Shapiro Wilk</i>		0.424*	0.136*	0.242*	
<i>Levene Test</i>					0.034
<i>One Way Anova</i>					0.000***
<b>Keterangan:</b>	*Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$				

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi TNF- $\alpha$  tertinggi yaitu pada kelompok perlakuan kedua (K2) pada tikus obesitas yang diinduksi STZ tanpa pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia. Kelompok kontrol (K1) dengan pemberian pakan *standard* dan *aquadest* menunjukkan bahwa rerata ekspresi TNF- $\alpha$  terendah, kemudian diikuti oleh



kelompok perlakuan keempat (K4) dengan pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 500  $\mu$ l dan kelompok perlakuan ketiga (K3) dengan pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l pada tikus obesitas yang diinduksi STZ. Data ekspresi TNF- $\alpha$  berdasarkan uji *shapiro wilk* menunjukkan berdistribusi normal dengan nilai  $p < 0.05$  dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test* hasilnya tidak homogen nilai  $p < 0,05$  maka hasil analisis data menggunakan uji parametrik yaitu uji *One way Anova*. menunjukkan uji *One Way Anova* ada perbedaan bermakna antara semua kelompok control maupun kelompok perlakuan dengan nilai p-value 0.006 ( $p < 0.05$ ).

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi MCP 1 tertinggi yaitu pada kelompok perlakuan kedua (K2) pada tikus obesitas yang diinduksi STZ tanpa pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia. Kelompok kontrol (K1) dengan pemberian pakan *standard* dan *aquadest* menunjukkan bahwa rerata ekspresi MCP 1 terendah, kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan keempat (K4) dengan pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 500  $\mu$ l dan kelompok perlakuan ketiga (K3) dengan pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l pada tikus obesitas yang diinduksi STZ. Data ekspresi TNF- $\alpha$  berdasarkan uji *shapiro wilk* menunjukkan berdistribusi normal dengan nilai  $p < 0.05$  dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test* hasilnya tidak homogen nilai  $p < 0,05$  maka analisis data menggunakan uji parametrik yaitu uji *One*

way Anova. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai p-value 0.000 ( $p < 0.05$ ).

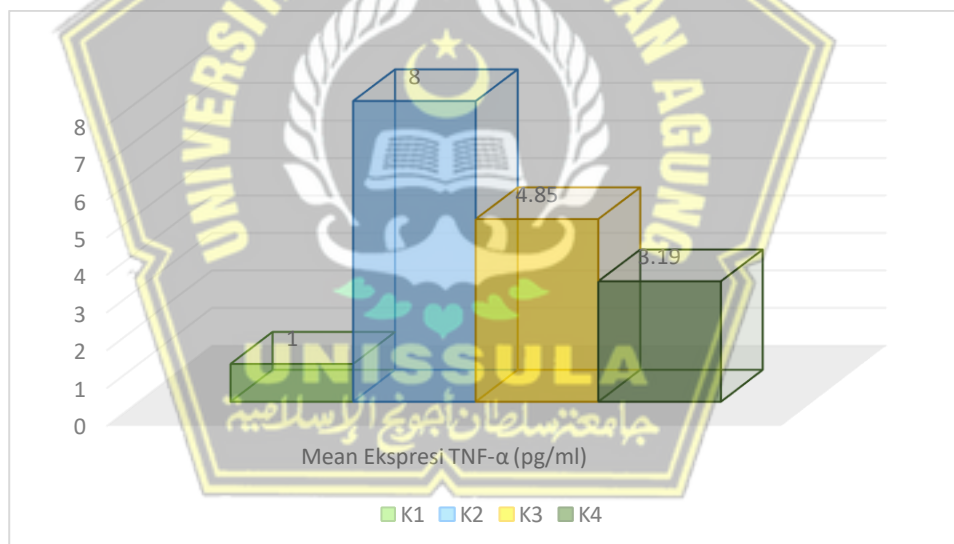
### 5.1.1. Perbedaan Ekspresi TNF- $\alpha$ Antar Kelompok

Perbedaan ekspresi TNF- $\alpha$  antar 2 kelompok diketahui dengan uji *Post Hoc* dengan uji *Tamhane* seperti yang disajikan di tabel 5.2.

**Tabel 5.2. Perbedaan Ekspresi TNF- $\alpha$  Antar 2 Kelompok**

Kelompok	p-Value
K1 vs K2	0.156
K1 vs K3	0.039*
K1 vs K4	0.423
K2 vs K3	0.761
K2 vs K4	0.405
K3 vs K4	0.764

\*Uji *Tamhane* dengan nilai signifikan  $p < 0.05$



**Gambar 5.1. Grafik Rerata Ekspresi TNF- $\alpha$  Antar Kelompok**

Hasil uji *Tamhane* pada tabel 5.2 menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok K1 tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok K2 dengan nilai p-value 0.156 ( $p > 0.05$ ) dan kelompok K4 dengan nilai p-value 0.423 ( $p > 0.05$ ) namun terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok K3 dengan nilai p-value 0.039

( $p < 0.05$ ). Kelompok K2 tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok K3 ( $p = 0.761$ ) dan kelompok K4 ( $p = 0.405$ ). Kelompok K3 dengan kelompok K4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p$ -value  $p = 0.764$  ( $p > 0.05$ ). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l dan 500  $\mu$ l berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus obesitas yang diinduksi STZ sehingga pernyataan hipotesis diterima.

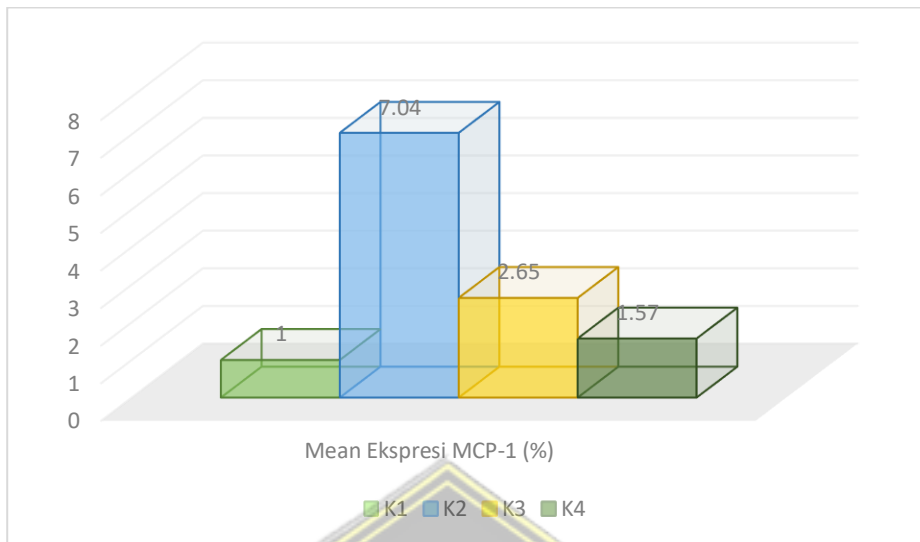
#### 5.1.2. Perbedaan Ekspresi MCP 1 Antar Kelompok

Perbedaan ekspresi MCP 1 antar 2 kelompok diketahui dengan uji *Post Hoc* dengan uji *Tamhane* seperti yang disajikan di tabel 5.3.

**Tabel 5.3. Perbedaan Ekspresi MCP 1 Antar 2 Kelompok**

<b>Kelompok</b>	<b><i>p</i>-Value</b>
K1 vs K2	0.075
K1 vs K3	0.176
K1 vs K4	0.382
K2 vs K3	0.134
K2 vs K4	0.103
K3 vs K4	0.935

\*Uji *Tamhane* dengan nilai signifikan  $p < 0.05$



**Gambar 5.2.** Grafik Rerata Ekspresi MCP 1 Antar Kelompok

Hasil uji *Tamhane* pada tabel 5.3 menunjukkan ekspresi MCP 1 pada kelompok K1 tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok K2 dengan nilai p-value 0.075 ( $p < 0.05$ ), kelompok K3 dengan nilai p-value 0.176 dan kelompok K4 dengan nilai p-value 0.382 ( $p < 0.05$ ). Kelompok K2 tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok K3 ( $p = 0.134$ ) dan kelompok K4 ( $p = 0.103$ ). Kelompok K3 dengan kelompok K4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai p-value  $p = 0.935$  ( $p > 0.05$ ). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l dan 500  $\mu$ l berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ sehingga pernyataan hipotesis diterima.

## 5.2. Pembahasan

Besar sampel yang digunakan sejumlah 20 ekor tikus wistar jantan yang terbagi menjadi 4 kelompok masing-masing berjumlah 5 ekor tikus, yaitu kelompok kontrol (K1) dengan pemberian pakan standar dan aquadest, kelompok perlakuan kedua (K2) pada tikus obesitas yang diinduksi STZ, kelompok perlakuan ketiga (K3) diberi sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l pada tikus obesitas yang diinduksi STZ, dan kelompok perlakuan keempat (K4) sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 500  $\mu$ l pada tikus obesitas yang diinduksi STZ. Pemeriksaan ini memanfaatkan hewan pengerat Wistar jantan karena mirip dengan manusia dalam hal fisiologi, sistem kehidupan, dan banyak efek samping serta kondisi yang dapat terjadi pada hewan pengerat.

Tikus yang diinginkan adalah tikus yang mempunyai gula darah tinggi (hiperglikemik) kecuali kelompok 1 (kontrol normal). Tikus hiperglikemik diobati dengan diet pakan tinggi lemak selama 30 hari dan terus diinduksi STZ. Lemak dapat menyebabkan diabetes karena insulin mempercepat adipogenesis di jaringan lemak dan menghasilkan asetil-KoA dan NADPH yang diperlukan untuk sintesis lemak tak jenuh dan menghasilkan gliserol yang berinteraksi dengan kombinasi triasilgliserol. Diabetes melitus (DM) merupakan suatu penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia yang disebabkan oleh berkurangnya pelepasan insulin, berkurangnya reaksi reseptor insulin, atau kedua-duanya.<sup>1</sup>

Empat minggu setelah pengenalan diet tinggi lemak dan satu minggu setelah pemberian streptozotocin, kadar gula darah tikus diukur. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kadar gula darah tikus meningkat signifikan dari 284,4 menjadi 364,8 mg/dL. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh tikus mengalami Hiperglikemik (tikus dinyatakan hiperglikemik bila kadar glukosa darahnya >200 mg/dL). Kelompok perlakuan menunjukkan kadar GDS dan HOMA IR akibat pemberian STZ sebanyak 50mg/kgbb +NA 15mg/kgbb IP dan Larutan sukrosa ad libitum pada K2, K3, dan K4.

Hasil pemeriksaan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok K2 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ tanpa pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia mengalami peningkatan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (K1), kelompok yang diberi sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l (K3) dan 500  $\mu$ l (K4) seperti pada tabel 5.1. Streptozotocin diberikan dosis 30 mg/kg BB secara intraperitoneal. Streptozotocin disuntikkan secara intraperitoneal dengan dosis 30 mg/kg berat badan tikus. Streptozotocin mengurangi konsumsi oksigen mitokondria dan menghambat siklus Krebs. Hal ini merusak DNA dan dapat menyebabkan ribosilasi poli ADP, yang pada gilirannya menghambat NAD<sup>+</sup> seluler, selanjutnya mengurangi ATP, dan pada akhirnya mencegah sintesis dan sekresi insulin. Masalah metabolisme yang digambarkan dengan perluasan hipertrofi dan hiperplasia jaringan lemak serta berkurangnya pelepasan insulin oleh sel B pankreas dan berkurangnya kapasitas sel pankreas untuk mengeluarkan insulin.<sup>2</sup> Kondisi ini

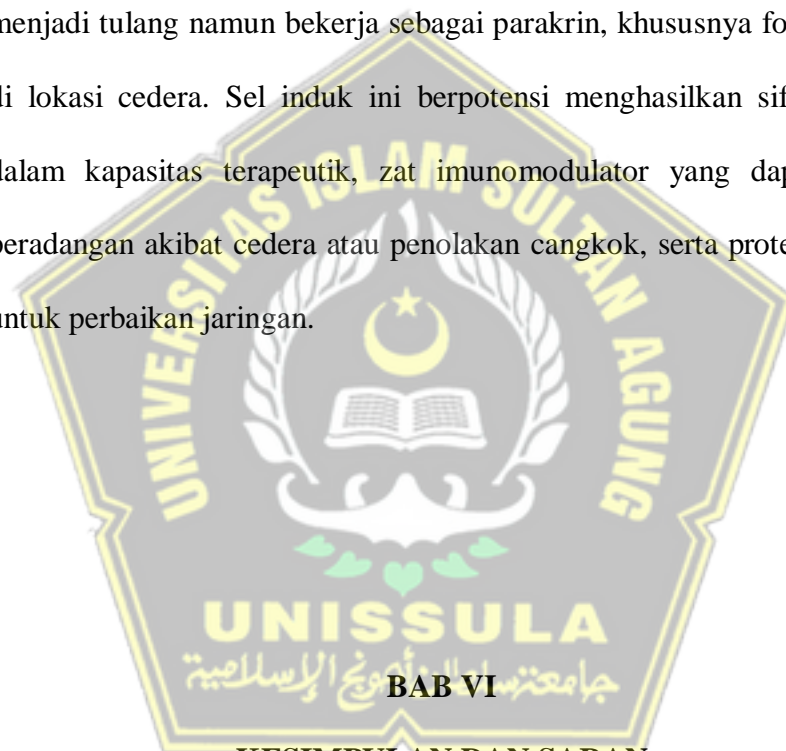


menginduksi inflamasi yang berhubungan dengan peran sitokin dan kemokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*).<sup>3</sup>

Artikulasi TNF- $\alpha$  pada hewan pengerat gemuk yang dipicu oleh STZ dan diberi sekretom organisme mesenkim hipoksia yang tidak berdiferensiasi pada porsi 250  $\mu$ l (K3) dan 500  $\mu$ l (K4) dikurangi seperti yang ditampilkan pada tabel 5.1. Organisasi sekretom sel mesenkim hipoksia yang tidak berdiferensiasi telah terbukti menahan bahaya yang ditimbulkan oleh ekstremis bebas dan dapat mengurangi artikulasi TNF- $\alpha$ .<sup>9</sup> Karena mereka mampu menghasilkan faktor anti-fibrotik, imunomodulasi, dan anti-apoptosis, sekretom sel induk mesenkim hipoksia dapat digunakan untuk mengendalikan lingkungan inflamasi dan sel kekebalan.<sup>5</sup>

Hasil pemeriksaan ekspresi MCP 1 pada kelompok K2 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ tanpa pemberian sekretom sel punca mesenkimal hipoksia menunjukkan pengaruh yang signifikan dibanding dengan kelompok yang diberi sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l (K3) dan 500  $\mu$ l (K4) seperti pada tabel 5.1. Diabetes melitus tipe 2 erat kaitannya dengan kondisi inflamasi. Salah satu penanda inflamasi pada T2DM adalah *chemokine monocyte chemoattractant protein-1* (MCP 1). Regulasi ekspresi MCP 1 melibatkan beberapa mekanisme. Pengikatan faktor nuklir  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) di wilayah promotor MCP 1 merupakan mekanisme penting untuk transkripsi MCP 1. Modifikasi epigenetik adalah mekanisme potensial lain untuk mengatur ekspresi MCP 1.

Ekspresi MCP 1 pada tikus obesitas yang diinduksi STZ dan diberi sekretom sel punca mesenkimal hipoksia dengan dosis 250  $\mu$ l (K3) dan 500  $\mu$ l (K4) mengalami peningkatan seperti pada tabel 5.1. Telah dibuktikan bahwa pemberian sekretom sel induk mesenkim hipoksia dapat mengurangi ekspresi TNF- dan mencegah kerusakan akibat radikal bebas.<sup>9</sup> Sekretom sel mesenkim hipoksia yang tidak berdiferensiasi tidak terpisah secara in vivo menjadi tulang namun bekerja sebagai parakrin, khususnya fokus sekretorik di lokasi cedera. Sel induk ini berpotensi menghasilkan sifat angiogenik dalam kapasitas terapeutik, zat imunomodulator yang dapat mencegah peradangan akibat cedera atau penolakan cangkok, serta protein dan sitokin untuk perbaikan jaringan.



## KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

**6.1.1.** Terdapat pengaruh pemberian SSPM Hipoksia pada dosis 250  $\mu$ l dan dosis 500  $\mu$ l terhadap penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$  antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

**6.1.2.** Terdapat pengaruh pemberian SSPM Hipoksia pada dosis 250 µl dan dosis 500 µl terhadap penurunan ekspresi gen MCP 1 antar kelompok perlakuan dibanding kontrol.

## **6.2. Saran**

**6.2.1.** Perlu dilakukan penelitian menggunakan dosis diet tinggi lemak yang sesuai dengan berat badan tikus.

**6.2.2.** Perlu dilakukan pemeriksaan analisis lemak setelah perlakuan.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Anas Y, Rositasati R, Fitriani MR, Suharjono. Pengembangan Model Hewan Percobaan Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 karena Resistensi Insulin yang Diinduksi dengan Human Insulin Jangka Panjang. *J Ilmu Farm dan Farm Klin.* 2015;12(2):16-23. <https://publikasiilmiah.unwahas.ac.id/index.php/Farmasi/article/viewFile/1408/1510>
2. Akhavanpoor M, Wangler S, Gleissner CA, Korosoglou G, Katus HA, Erbel C. Adventitial inflammation and its interaction with intimal atherosclerotic lesions. *Front Physiol.* 2014;5 AUG(August):1-8. doi:10.3389/fphys.2014.00296
3. Yustisiani A, Andari D, Isbandiyah. Pengaruh Pemberian Kopi Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Pada Tikus Putih Strain Wistar Diabetes Mellitus Tipe 2. *Saintika Med.* 2013;9(1):38-45. doi:10.22219/sm.v9i1.4124
4. I Made Subhawa Harsa. EFEK PEMBERIAN DIET TINGGI LEMAK TERHADAP PROFIL LEMAK DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*). *Ilm Kedokt.* 2019;3(1):21-28.
5. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2010;67(10):1187-1194. doi:10.1001/archneuro.2010.248
6. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diab Res Clin Pr.* Published online 2021.
7. Kementrian kesehatan republik indonesia. *Tetap Produktif, Cegah Dan Atasi Diabetes Mellitus.*; 2020.
8. PB. Perkeni. *PEDOMAN PENGELOLAAN DAN PENCEGAHAN DIABETES MELITUS TIPE 2 DI INDONESIA 2021.*; 2019.

9. Ullah I, Subbarao RB RG. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35.
10. Miceli V, Bulati M, Iannolo G, Zito G, Gallo A, Conaldi PG. Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: The need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):1-20. doi:10.3390/ijms22020763
11. Ribot J, Caliperoumal G, Paquet J, Boisson-vidal C, Petite H, Anagnostou F. Type 2 Diabetes Alters Mesenchymal Stem Cell Secretome composition and angiogenic properties. *J Cell Mol Med.* 2017;21(2):349-363. doi:10.1111/jcmm.12969
12. Dias I, Pinheiro D, Ribeiro Silva K, et al. Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2021;2(September):100069. doi:10.1016/j.crphar.2021.100069
13. Santi Widhiastuti S, Branitamahisi B, Ayu I, et al. Pengaruh Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal (MT-SPM) terhadap Histopatologi Pankreas Tikus Model DM Tipe 2 Effect of Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Pancreatic Histopathology in Tipe 2 Diabetic Rats Model. 2018;3(3):111-116.
14. Item F. Visceral fat and metabolic inflammation : the portal theory revisited Visceral fat and metabolic inflammation : The portal theory revisited Division of Pediatric Endocrinology and Diabetology and Children Research ' s Centre ,University Children ' s Hosp. Published online 2012;13:30–9.
15. Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. The Portal Theory Supported by Venous Drainage-Selective Fat Transplantationorg/licenses/by-nc-nd/3.0/ for details. *Diabetes.* 2011;60. doi:10.2337/db10-0697
16. Oktaviono YH, Susanti M, Lefi A, Sandra F. Human umbilical cord blood-derived secretome enhance endothelial progenitor cells migration on hyperglycemic conditions. *Pharmacogn J.* 2020;12(4):793-797.

doi:10.5530/pj.2020.12.113

17. Mertz, P., Jeannel, J., Guffroy, A., Lescuyer, S., Korganow, A. S., Rondeau-Lutz, M., & Weber JC. Granulomatous manifestations associated with COVID19 infection: Is there a link between these two diseases? *Autoimmun Rev.* 2021;20(6):102824.
18. Valitutti, F., Cucchiara, S., & Fasano A. Celiac disease and the microbiom. *Nutrients.* 2019;11(10):2403.
19. D'Ambrosio, F., Caggiano, M., Schiavo, L., Savarese, G., Carpinelli, L., Amato, A., & Iandolo A. Chronic stress and depression in periodontitis and peri-implantitis: a narrative review on neurobiological, neurobehavioral and immune–microbiome interplays and clinical management implications. *Dent J.* 2022;10(3):49.
20. Aramita, Z., Astuti, T. D., ST, S., & Irfani FN. SYSTEMATIC REVIEW: PENGARUH PEMBERIAN PROPOLIS TERHADAP KADAR INTERLEUKIN 6 (IL-6) DAN TUMOR NECROSIS FACTOR A (TNF- $\alpha$ ) PADA DIABETES MELITUS TIPE-2. Published online 2020.
21. Matsuda, M., & Shimomura I. Adipocytokines and metabolic syndrome--molecular mechanism and clinical implication. *Japanese J Clin Med.* 2004;62(6):1085-1090.
22. Smith U. Pioglitazone: mechanism of action. *Int J Clin Pract.* 2001;(121):13-18.
23. García-García, I., Michaud, A., Jurado, M. Á., Dagher, A., & Morys F. Mechanisms linking obesity and its metabolic comorbidities with cerebral grey and white matter changes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2022;23(4):833-843.
24. Mulholland, B. S., Forwood, M. R., & Morrison NA. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP 1/CCL2) drives activation of bone remodelling and skeletal metastasis. *Curr Osteoporos Rep.* 2019;17:538-547.
25. Georgakis, M. K., Gill, D., Rannikmäe, K., Traylor, M., Anderson, C. D., MEGASTROKE consortium of the International Stroke Genetics



- Consortium (ISGC), Dichgans M. Genetically determined levels of circulating cytokines and risk of stroke: role of monocyte chemoattractant protein-1. *Circulation*. 2019;139(2):256-268.
26. Griana TP. Potential effect of Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) and Widuri (*Calotropis gigantea* (L.)) as immunomodulator. *J Food Pharm Sci*. 2019;7(2):55-72.
  27. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*. 2012;111(2):245-259. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.261388
  28. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(5):398-40.
  29. Wihastuti TA, Andarini S, Heriansyah T. *Patofisiologi Dasar Keperawatan Penyakit Jantung Koroner*. Universitas Brawijaya Press; 2017.
  30. Hall JE. *Guyton Dan Hall Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. 13th ed. (Antonia Tanzil MDW, ed.). Elsevier Health Sciences; 2019.
  31. Yunus R, Atmaja RFD, Harun H, et al. *Imunohematologi Dan Bank Darah*. (Sari M, Sulung N, eds.). Get Press; 2022.
  32. Rifa'i M. *Autoimun Dan Bioregulator (Edisi Revisi)*. Universitas Brawijaya Press; 2018.
  33. Black JM, Hawks JH. *Medical Surgical Nursing: Hematological and Immunological Disorders*. (Yona S, Nurulhuda U, eds.). Elsevier Health Sciences; 2021.
  34. Earlia N, Lestari W, Prakoeswa CRS. *Dermatitis Atopik*. Syiah Kuala University Press; 2022.
  35. Rosyid AN, Hasan H, Marhana IA, eds. *Bunga Rampai Kedokteran Respirasi 2020*. Airlangga University Press; 2021.
  36. Wardhana IMW, Wangko S. Interaksi antara Makrofag dan Jaringan Adiposa pada Obesitas. *J Biomedik*. 2012;3(2):111-118.
  37. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages : their role in adipose tissue remodeling. 2010;88(July):33-39. doi:10.1189/jlb.0210072
  38. Robert L. Jackson RAG. *The Child with Diabetes Mellitus*. Upjoh; 2011.

39. John K. Davidson, ed. *Clinical Diabetes Mellitus A Problem Oriented Approach*. Thieme; 1991.
40. Insana Maria. *Asuhan Keperawatan Diabetes Mellitus Dan Asuhan Keperawatan Stroke*. Deepublish; 2021.
41. Dina Christin Ayuning Putri, Merry Permatasari, Nico Ade Putra, Julius Andrye Lesmana, Julius Wahyu Nugroho Adi Saputra, Florentinus Dika Octa Riswanto, Merry Permatasari, Nico Ade Putra, Julius Andrye Lesmana, Julius Wahyu Nugroho Adi Saputra TAHM. *Prosiding Seminar Nasional Farmasi*. (Dewan Editor dan Reviewer, ed.). Sanata Dharma University Press; 2023.
42. Angriani S. HUBUNGAN TINGKAT KECEMASAN DENGAN KADAR GULA DARAH PADA PENDERITA DIABETES MELLITUS TIPE II DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS BATUA KOTA MAKASSAR. 2020;15(2):102-106.
43. Primayani, P. K. R., Suardana, A. K., & Wahyudi IW. PREVALENSI DIABETES MELLITUS PADA WARGA BINAAN PEMASYARAKATAN DI RUMAH TAHANAN NEGARA KELAS IIB BANGLI. *J WIDYA Biol*. 2022;13(1):38-50.
44. American Diabetes Association PR. *Medical Management of Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes*. The Association; 1994.
45. Ronald A. Codario. *Type 2 Diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome*. Humana Press; 2010.
46. Agus R. Mekanisme Resistensi Insulin Terkait Obesitas. *J Ilm Kesehat Sandi Husada*. 2019;8(2):354-358.
47. Andrew Krentz. *Insulin Resistance A Clinical Handbook*. Wiley; 2008.
48. Royal Society of Medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 37th-42nd ed. Royal Society of Medicine; 2011.
49. Da Silva Xavier G. The cells of the islets of langerhans. *J Clin Med*. 2018;7(3):54.
50. Sutherland, D. E., Matas, A. J., & Najarian JS. Pancreatic islet cell transplantation. *urgical Clin North Am*. 1978;58(2):365-382.

51. Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Connors, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*. 2000;127(16):3533-3542.
52. Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2005;48:282-289.
53. Duan, X., Wang, W., Pan, Q., & Guo L. Type 2 diabetes mellitus intersects with pancreatic cancer diagnosis and development. *Front Oncol*. 2021;11:730038.
54. Terzin, V., Várkonyi, T., Szabolcs, A., Lengyel, C., Takács, T., Zsóri, G., ... & Czakó L. Prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in type 2 diabetes mellitus with poor glycemic control. *Pancreatology*. 2014;14(5):356-360.
55. Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Marchetti P. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):727-735.
56. Tandra H. *Segala Sesuatu Yang Harus Anda Ketahui Tentang Diabetes*. Gramedia Pustaka Utama; 2017.
57. Dr. Charles Fox DAK. *No Title Bersahabat Dengan Diabetes Tipe 2*. Penebar Swadaya; 2011.
58. Sulistiowati, E., & Sihombing M. Perkembangan Diabetes Melitus Tipe 2 dari Prediabetes di Bogor, Jawa Barat. *J Penelit dan Pengemb Pelayanan Kesehatan*. Published online 2018:59-69.
59. Fatimah RN. Diabetes melitus tipe 2. *J Major*. 2015;4(5).
60. Widiyanti, Winne and ZT. Aktivitas fisik, stres, dan obesitas pada pegawai negeri sipil. *Kesmas J Kesehatan Masy Nas (National Public Health Journal)*. Published online 2014:325-329.
61. Amanda, Desy and SM. Hubungan karakteristik dan status obesitas sentral dengan kejadian hipertensi. *Sumber*. 2018;160(100):253-249.

62. Hanani, Retno, Sitti Badrah and RN. Pola makan, aktivitas fisik dan genetik mempengaruhi kejadian obesitas pada remaja. *J Kesehat Metro Sai Wawai*. 2021;14(2):120-129.
63. Aryana, S., N. Astika and TK. *Geriatric Opinion 2018.*; 2018.
64. *Terapi Gizi Dan Diet Rumah Sakit Ed. 2.* Egc
65. Arvin BK. *Ilmu Kesehatan Anak.* Egc
66. Hastuti P. *Genetika Obesitas.* UGM Press; 2018.
67. Susmiati S. Peran mikrobiota usus dalam perkembangan obesitas. *Maj Kedokt Andalas*. 2019;42(1):41-49.
68. Wijayanti N. *Fisiologi Manusia Dan Metabolisme Zat Gizi.* Universitas Brawijaya Press; 2017.
69. Dewi, Luthfia and RAA. *AZ Tentang Obesitas.* UGM PRESS; 2023.
70. Arifin DN. Pengaruh Kepatuhan Minum OAD Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Pada Pasien DMT2 di Klinik Jaya Kusuma. *Dr Diss ITSK RS dr Soepraoen.* Published online 2022.
71. Fahriza MR. Faktor Mempengaruhi Yang Penyebab Kejadian Diabetes Mellitus (DM). Published online 2019.
72. Wihastuti, Titin Andri, Sri Andarini and TH. *Patofisiologi Dasar Keperawatan Penyakit Jantung Koroner: Inflamasi Vaskular.* Universitas Brawijaya Press; 2016.
73. Diaz RJ. Overview of hypoxia around the world. *J Environ Qual*. 2001;30(2):275-281.
74. Webster, W. S., & Abela D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2007;81(3):215-228.
75. Van Liere, E. J., & Stickney JC. Hypoxia. *Acad Med*. 1964;39(2):234.
76. Semenza GL. Regulation of erythropoiesis by the hypoxia-inducible factor pathway: Effects of genetic and pharmacological perturbations. *Annu Rev Med*. 2023;74:307-319.
77. Vignali, P. D., DePeaux, K., Watson, M. J., Ye, C., Ford, B. R., Lontos, K., Delgoffe GM. Hypoxia drives CD39-dependent suppressor function in exhausted T cells to limit antitumor immunity. *Nat Immunol*.

- 2023;24(2):267-279.
78. Biehl JK RB. Introduction to Stem Cell Therapy. *J Cardiovasc Nurs.* 2009;24(2):98-103.
  79. Bhang SH, Lee S. Shin JY LTJHKB. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther.* 2014;22(4):862-872.
  80. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A. Jebari S, Larrea Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):1-34.
  81. Berebichez-Fridman R. Montero-Olvera PR. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2018;18(3):264-277.
  82. Lavrentieva A, Majore I. Kasper C HR. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signa.* 2010;8:1-9.
  83. Kaczmarczyk K. Is the clinical use of adult stem cells a realistic possibility for myocardial regeneration? *Biosci Horizons.* 2008;1(1):67-74.
  84. Milenkovic U AMCF. The mechanisms and potential of stem cell therapy for penile fibrosis. *Nat Rev Urol.* 2019;16(2):79-97. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/s41585-018-0109-7>
  85. Xiaorong Fu, Ge Liu, Alexander Halim, Yang Ju, Qing Luo AGS. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells.* 2019;8(8):784. doi:10.3390/cells8080784
  86. Galipeau J, Krampera M. Barrett J, Dazzi F, Robert J DJ. otency Release Criterion for Advanced Phase Clinical Trials. *Cytotherapy.* 2016;18(2):151-159.
  87. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 2014;26(6):256-265. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.256
  88. Khatri R. Mazurek S. Petry SF LT. Mesenchymal stem cells promote pancreatic B-cell regeneration through downregulation of Fox01 pathway.



- Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1-14.
89. Han Y, Li X. Zhang Y, Han Y, Chang F DJ. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells.* 2019;8(8):886.
  90. Kay AG, Long G, Tyler G. Stefan A. Broadfoot SJ PA. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18144-w>
  91. Vizoso FJ. Eiro N, Cid S, Schneider J PFR. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
  92. Ikhsan R. Putra A, Munir D. Darlan DM, Suntoko B KA. Mesenchymal stem cells induce regulatory t-cell population in human sle. *Bangladesh J Med Sci.* 2020;19(4):743-748.
  93. Harrell C FCJNDVANV V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells.* 2019;8(5):467.
  94. Cunningham CJ, Redondo-Castro E AS. he therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(8):1276-1292.
  95. Lotfinia M, Lak S GNJBMFPS. Hypoxia pre-conditioned embryonic mesenchymal stem cell secretome reduces IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells. *Iran Biomed J.* 2017;21(1):24-31.
  96. Mukhtar D. Makrofag Pada Jaringan Adiposa Obes Sebagai Penanda Terjadinya Resistensi Insulin. *Maj Ilm Widya.* 2013;3(317):30-31.