

**PENGARUH SH-MSCSs TERHADAP EKSPRESI GEN *TUMOR*
NECROSIS FACTOR (TNF- α) DAN *HYPOXIA INDUCIBLE*
FACTOR (HIF)-2 α**
(Studi Eksperimental *In vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar
Model Sindrom Metabolik)

TESIS

Sebagai bagian persyaratan mencapai derajat Magister S2



Magister Ilmu Biomedik

Disusun Oleh:

Alisia Martha Dewi

MBK2118010250

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2024**

TESIS

**PENGARUH SH-MSCSs TERHADAP EKSPRESI GEN TUMOR
NECROSIS FACTOR (TNF- α) DAN HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR
(HIF)-2 α**

**(Studi Eksperimental *In vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar
Model Sindrom Metabolik)**

Disusun oleh

Alisia Martha Dewi


MBK2118010250

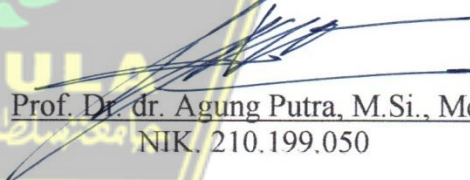
Menyetujui,

Pembimbing

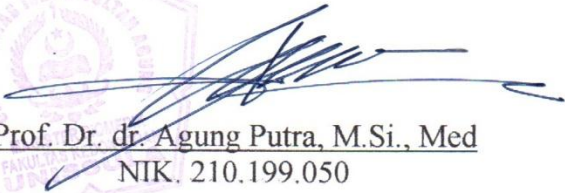
Pembimbing I,

Pembimbing II,


Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF
NIK. 210199049


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si., Med
NIK. 210.199.050

Mengetahui,
Ketua Progam Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si., Med
NIK. 210.199.050

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa proposal tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.



Semarang, 20 April 2024



Alisia Martha Dewi

KATA PENGANTAR

Assalamu alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik serta hidayah sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan judul “PENGARUH SH-MSCSs TERHADAP EKSPRESI GEN TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α) DAN HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-2 α (Studi Eksperimental *In vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Sindrom Metabolik)”. Penyusunan tesis ini sebagai salah satu syarat kelulusan dalam jenjang pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Tesis ini dapat tersusun dan terselesaikan karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta selaku pembimbing 1.
3. Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi.Med selaku Ketua program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta selaku pembimbing 2.
4. Kepada orang tua dan keluarga yang senantiasa mendukung serta mendoakan.
5. Segenap staf administrasi program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

6. Teman-teman program studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.



Semarang, Mei 2024

Alisia Martha Dewi

DAFTAR ISI

	Halaman
HALMAAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xv
INTISARI.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian	5
1.4.1. Manfaat Praktis	5
1.4.2. Manfaat Ilmiah	5
1.5. Originalitas Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Tumor Necrosis Factor (TNF-α)</i>	9
2.2. <i>Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2α</i>	11
2.3. <i>Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells</i>	13
2.4. Sindrom Metabolik	16
2.5. Pengaruh <i>SH-MSCSs</i> Terhadap Ekspresi <i>TNF-α</i> dan <i>(HIF)-2α</i>	17

BAB III KERANGKA TEORI, KONSEP, DAN HIPOTESIS	20
3.1. Kerangka Teori	20
3.2. Kerangka Konsep.....	22
3.3. Hipotesis	23
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	24
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	24
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian	25
4.2.1. Populasi	25
4.2.2. Sampel Penelitian.....	25
4.3. Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
4.4. Variabel dan Definisi Operasional.....	26
4.4.1. Variabel Penelitian.....	26
4.4.2. Definisi Operasional.....	27
4.5. Bahan Penelitian	28
4.6. Alat Penelitian.....	28
4.7. Cara Induksi Sindrom Metabolik pada Tikus	28
4.8. Pemberian <i>SH-MSCs</i>	29
4.9. Cara Kerja Penelitian	29
4.9.1. Cara Kerja Penelitian	29
4.9.2. Cara Pemeriksaan.....	30
4.9.3. Analisis Ekspresi Gen dengan <i>Real-Time PCR</i>	33
4.10. Alur Penelitian	38
4.11. Analisis Data.....	39
4.12. <i>Ethical Clearance</i>	39
4.13. Jadwal Penelitian	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
5.1. Hasil Penelitian	42
5.1.1. Karakterisasi <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	42
5.1.2. Kadar <i>SH-MSCs</i>	44
5.1.3. Validasi Tikus Sindrom Metabolik	45
5.1.4. Hasil Analisis Statistik	46

5.1.5. Efek Pemberian <i>SH-MSCS</i> pada Ekspresi Gen <i>TNF-α</i>	47
5.1.6. Efek Pemberian <i>SH-MSCs</i> pada Ekspresi <i>HIF-2α</i>	48
5.2. Pembahasan.....	49
5.2.1. Efek <i>SH-MSCs</i> pada Ekspresi Gen <i>TNF-α</i> Pada Jaringan Adiposa tikus sindrom metabolik.....	50
5.2.2. Efek <i>SH-MSCS</i> pada Ekspresi Gen <i>HIF-2α</i> Pada Jaringan Adiposa tikus sindrom metabolik.....	52
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1. Kesimpulan	55
6.2. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	69



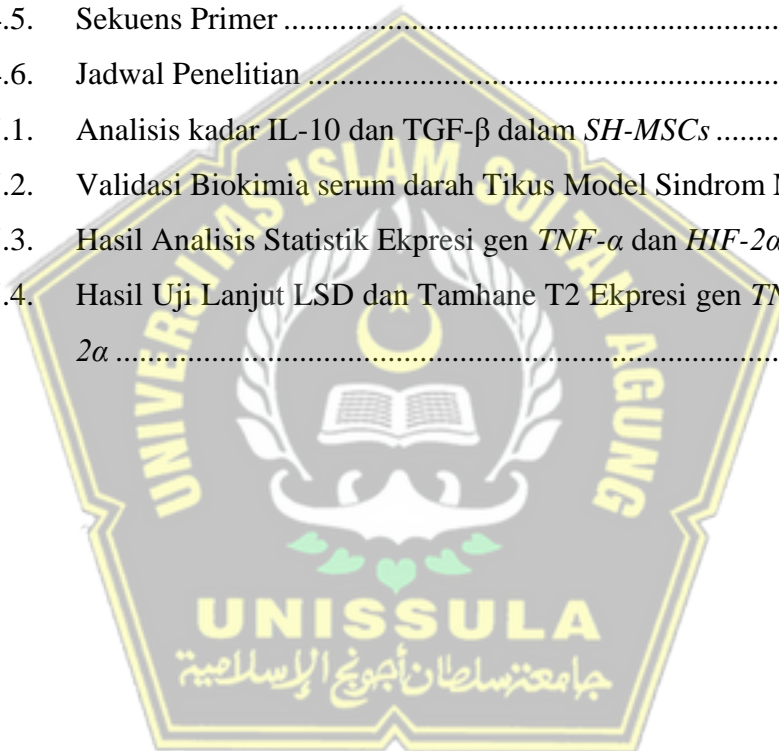
DAFTAR SINGKATAN

<i>Adrβ3</i>	: <i>Adrenergic receptor β 3</i>
<i>ATP</i>	: <i>Adenosine Tri Phosphate</i>
<i>CD</i>	: <i>Cellular Defense</i>
<i>cDNA</i>	: <i>complementary DNA</i>
<i>cIAP</i>	: <i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
<i>CLS</i>	: <i>Crown-Like Structure</i>
<i>COX2</i>	: <i>Acyl-Coa Oxidase</i>
<i>CRP</i>	: <i>C Reactive Protein</i>
<i>ELISA</i>	: <i>Enzyme-link Immunosorbent Assay</i>
<i>EPAS</i>	: <i>Endothelial PAS Domain Protein</i>
<i>FADD</i>	: <i>Fas-Associated Protein With Death Domain</i>
<i>FFA</i>	: <i>Free Fatty acid</i>
<i>HDL</i>	: <i>High Density Lipoprotein</i>
<i>HIF-1α</i>	: <i>Hypoxia-inducible factor-1 alpha</i>
<i>HIF-2α</i>	: <i>Hypoxia-inducible factor-2 alpha</i>
<i>hMSC-EC</i>	: <i>Human Mesenchymal Stem Cell – derived Endothelial Cell</i>
<i>ICU</i>	: <i>Intensive Care Unit</i>
<i>IFN γ</i>	: <i>Interferon gamma</i>
<i>IL</i>	: <i>Interleukin</i>
<i>JAK</i>	: <i>Janus Kinase</i>
<i>LDL</i>	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
<i>LPS</i>	: <i>Lipopolisakarida</i>
<i>LUBAC</i>	: <i>Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex</i>
<i>M-1</i>	: <i>Macrophage Type-1</i>
<i>M-2</i>	: <i>Macrophage Type-2</i>
<i>MAPK</i>	: <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<i>MetS</i>	: <i>Metabolic Syndrome</i>
<i>MHC</i>	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
<i>MOD</i>	: <i>Multi Organ Dysfunction</i>

<i>mTOR</i>	: <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
<i>NF-κB</i>	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
<i>NK</i>	: <i>Natural Killer</i>
<i>Nrf2</i>	: <i>Nuclear Factor-Erythroid-2 Related Factor 2</i>
<i>OCT</i>	: <i>Octamer Transcription Factor</i>
<i>PCOS</i>	: <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>
<i>PDGF</i>	: <i>Supergene VEGF-Platelet-Derived Growth factor</i>
<i>PGE2</i>	: <i>Prostaglandin E2</i>
<i>PI3K</i>	: <i>Phosphatidil Inositol 3 Kinase</i>
<i>PPAR-gamma</i>	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma</i>
<i>PTEN</i>	: <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
<i>qRT-PCR</i>	: <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
<i>RIPK</i>	: <i>Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase</i>
<i>ROS</i>	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
<i>SH-MSCs</i>	: <i>Secretome Hypoxia – Mesenchymal Stem Cells</i>
<i>SOD</i>	: <i>Superoxide Dismutase</i>
<i>SOS3</i>	: <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
<i>STAT</i>	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<i>T1DM</i>	: <i>Type 1 Diabetes Mellitus</i>
<i>TFF</i>	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
<i>TGF</i>	: <i>Transforming grow Factor</i>
<i>Th</i>	: <i>T Helper</i>
<i>TLR</i>	: <i>Toll Like Receptor</i>
<i>TNF-α</i>	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
<i>TNFR</i>	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
<i>TRADD</i>	: <i>TNFR1-Associated Death Domain Protein</i>
<i>TRAF</i>	: <i>TNFR-Associated Factor</i>
<i>VEGF</i>	: <i>Vascular Endothelial Growth factor</i>

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1. Definisi Operasional	27
Tabel 4.2. Komposisi reagen sintesis <i>cDNA</i>	35
Tabel 4.3. Komposisi reagen Mastermix <i>qRT-PCR</i>	36
Tabel 4.4. Kondisi siklus, suhu dan waktu mesin <i>RT-PCR</i>	37
Tabel 4.5. Sekuens Primer	37
Tabel 4.6. Jadwal Penelitian	40
Tabel 5.1. Analisis kadar IL-10 dan TGF- β dalam <i>SH-MSCs</i>	44
Tabel 5.2. Validasi Biokimia serum darah Tikus Model Sindrom Metabolik..	45
Tabel 5.3. Hasil Analisis Statistik Ekpresi gen <i>TNF-α</i> dan <i>HIF-2α</i>	47
Tabel 5.4. Hasil Uji Lanjut LSD dan Tamhane T2 Ekpresi gen <i>TNF-α</i> dan <i>HIF-2α</i>	47



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Jalur pensinyalan <i>TNF-α</i> , <i>TNFR1</i> dan <i>TNFR2</i> ³⁸	11
Gambar 2.2. Mekanisme aksi <i>Mesenchymal Stem Cells</i> dalam meregulasi sindrom metabolik ⁵⁶	14
Gambar 2.3. Hipoksia mengaktivasi <i>MSCs</i>	15
Gambar 3.1. Kerangka Teori	22
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	22
Gambar 4.1. Rancangan Penelitian	24
Gambar 4.2. Alur Penelitian.....	38
Gambar 5.1. Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti <i>MSC</i> yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (<i>fibroblas-like</i>) dengan perbesaran mikroskop 100x (a) dan perbesaran 200x (b). Scale bar: 50 μ m.	42
Gambar 5.2. Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi. Sel hasil Isolasi memiliki ekspresi CD90.1 dan CD29 yang tinggi serta ekspresi CD45 dan CD31 yang rendah.....	43
Gambar 5.3. Kemampuan differensiasi sel hasil isolasi. (a) Sel hasil Isolasi mampu berdiferensiasi menjadi <i>adipocyte</i> pada pengamatan pewarnaan <i>Oil Red dye</i> dan (b) berdiferensiasi menjadi <i>osteocyte</i> pada pengamatan pewarnaan <i>Alizarin red</i> pada pembesaran 100x. *Panah hitam: menunjukkan lipid droplet, panah kuning: menunjukkan deposisi kalsium. Scale bar: 50 μ m.....	43
Gambar 5.4. Ekspresi gen <i>TNF-α</i> pada jaringan adiposa tikus sindrom metabolik pada semua kelompok. *) $p < 0.05$	48
Gambar 5.5. Ekspresi gen <i>HIF-2α</i> pada jaringan adiposa tikus sindrom metabolik pada semua kelompok. *) $p < 0.05$	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	699
Lampiran 2. Data Statistik	71
Lampiran 3. Foto Kegiatan	764
Lampiran 4. Surat Keterangan Selesai Penelitian	786



ABSTRACT

Background: *Metabolic syndrome (MetS) has become a global health challenge with several associated issues, such as obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hypertension. Important proteins such as Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and Hypoxia Inducible Factor-2 alpha (HIF-2 α) regulate the inflammatory process by inducing the expression of pro-inflammatory proteins. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) are immunomodulatory, anti-inflammatory, and angiogenic stimulators, which can regulate various inflammatory diseases, including MetS.* **Objective:** *This study aims to determine the effect of administering SH-MSCs on the expression of the TNF- α and Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α genes in the male Wistar rat model with Metabolic Syndrome.* **Method:** *This research is an experimental study with a Post-test Only Control Group Design, using a total of 24 male Wistar rats divided into four groups: K1 (Healthy control), K2 (MetS + NaCl), K3 (MetS + administration of SH-MSCs dose 150 μ L), and K4 (MetS + administration of SH-MSCs dose 300 μ L). SH-MSCs were administered intraperitoneally four times over 14 days. Adipose tissue TNF- α and HIF-2 α gene expression were measured on day 15 using qRT-PCR.* **Results:** *TNF- α and HIF-2 α gene expression was significantly lower in K3 and K4, compared with the MetS control group (K2).* **Conclusion:** *Administration of SH-MSCs was able to reduce the expression of the Tumor Necrosis Factor (TNF- α) and Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α genes in fatty tissue in the male Wistar rat model with Metabolic Syndrome.*

Keywords : *Metabolic syndrome, Secretome, MSC, TNF- α , HIF-2 α .*



UNISSULA
جامعة سلطان أبوبوع الإسلامية

INTISARI

Latar Belakang: Sindrom metabolik (MetS) telah menjadi tantangan kesehatan global dengan sejumlah masalah terkait, seperti obesitas, resistensi insulin, dislipidemia, dan hipertensi. Protein penting seperti *Tumor Necrosis Factor-alpha* (*TNF- α*) dan *Hypoxia Inducible Factor-2 alpha* (*HIF-2 α*) meregulasi proses inflamasi dengan menginduksi ekspresi protein pro-inflamasi. *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (*SH-MSCSs*) bersifat imunomodulator, anti-inflamasi, dan stimulator angiogenik, yang dapat mengatur berbagai penyakit inflamasi, termasuk MetS. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *SH-MSCSs* terhadap ekspresi gen *TNF- α* dan *Hypoxia Inducible Factor* (*HIF*)-2 α pada model tikus jantan galur Wistar dengan Sindrom Metabolik. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan Post-test Only Control Group Design, menggunakan total 24 tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi empat kelompok: K1 (kontrol sehat), K2 (kontrol MetS + NaCl), K3 (MetS + pemberian *SH-MSCSs* dosis 150 uL), dan K4 (MetS + pemberian *SH-MSCSs* dosis 300 uL). *SH-MSCSs* diadministrasikan secara intraperitoneal selama empat kali dalam periode 14 hari. Ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* jaringan adiposa diukur pada hari ke-15 menggunakan qRT-PCR. **Hasil:** Ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* lebih rendah secara signifikan pada K3 dan K4, dibandingkan dengan kelompok kontrol MetS (K2). **Kesimpulan:** Pemberian *SH-MSCSs* mampu menurunkan ekspresi gen Tumor Necrosis Factor (*TNF- α*) dan Hypoxia Inducible Factor (*HIF*)-2 α jaringan adiposa pada model tikus jantan galur Wistar dengan Sindrom Metabolik.

Kata kunci : Sindrom metabolik, Secretome, MSCs, *TNF- α* , *HIF-2 α* .

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sindrom metabolik (MetS) telah muncul sebagai masalah kesehatan global yang memiliki banyak aspek, ditandai dengan sekelompok metabolik disorder yang saling terkait seperti obesitas, resistensi insulin, dislipidemia, dan hipertensi¹⁻³. Sindrom kompleks ini secara signifikan meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular, diabetes tipe 2, dan gangguan metabolisme lainnya, sehingga menimbulkan beban besar pada sistem kesehatan masyarakat di seluruh dunia^{4,5}. Salah satu aspek penting dari patofisiologi MetS berkaitan dengan inflamasi dan gangguan suplai oksigen pada jaringan adiposa⁶. *Tumor Necrosis Factor-alpha* (*TNF- α*) dan *hypoxia-inducible factor-2 alpha* (*HIF-2 α*) adalah protein krusial dalam proses tersebut^{7,8}. *TNF- α* adalah *sitokin* proinflamasi yang terlibat dalam resistensi insulin dan disfungsi jaringan adiposa^{7,9}, sementara *HIF-2 α* memainkan peran sentral dalam respons seluler terhadap hipoksia¹⁰, mengatur berbagai gen yang terlibat dalam adaptasi metabolik dan angiogenesis¹¹. Penelitian terkini menunjukkan *SH-MSCSs* telah mendapat perhatian karena biomolekul aktifnya yang bersifat imunomodulator, anti-inflamasi dan angiogenik stimulator¹²⁻¹⁴ untuk meregulasi berbagai penyakit inflamasi, termasuk MetS.

Data tahun 2020 menunjukkan bahwa sindrom metabolik memiliki tingkat prevalensi sekitar 25% pada orang dewasa di Amerika¹⁵. Selain itu,

pada dekade terakhir ini, prevalensi sindrom metabolik meningkat tidak hanya di Amerika Serikat dan Eropa, namun juga di negara-negara Asia seperti Tiongkok, India, Korea Selatan dan Indonesia¹⁶⁻¹⁸. Meningkatnya prevalensi MetS di dunia mempengaruhi kualitas kesehatan di setiap negara, termasuk Indonesia. Berdasarkan data Indonesian Family Life Survey yang dilaporkan pada tahun 2019, prevalensi MetS di Indonesia saat ini sebesar 21,66%, dengan estimasi angka insidensi di provinsi sekitar 50%; Selain itu, komponen MetS yang paling umum ditemukan di Indonesia adalah *high-density lipoprotein (HDL)* dan hipertensi. Kondisi-kondisi sindrom metabolik tersebut dapat berperan sebagai faktor pemicu atau pendorong dalam mendorong perkembangan *multiple organ dysfunction (MOD)*, karena sejumlah komponen sindrom tersebut dapat berdampak negatif pada berbagai organ seperti jantung, ginjal, hati, dan sistem vaskular¹⁹. MOD dapat menyebabkan disfungsi dua atau lebih organ yang terjadi secara bersamaan sehingga memungkinkan penderitanya tinggal lebih lama di unit perawatan intensif (ICU) dan dalam kondisi lebih parah dapat menyebabkan kematian (27% -100%).⁹³

Bioaktif molekul yang terkandung di dalam *SH-MSCSs* berperan penting dalam komunikasi intraselular, yang memicu perubahan patologis dan fungsi sel-sel target^{20,21}. Komunikasi intraselular tersebut terutama dimediasi oleh anggota *growth factor*, *sitokin*, dan kemokin, seperti Interleukin (IL), *Transforming growth factor-β (TGF-β)*, *Platelet-Derived Growth factor (PDGF)*, dan *Vascular Epithelial Growth factor (VEGF)*²²⁻²⁵.

Faktor-faktor sindrom metabolik dapat menginduksi kondisi inflamasi kronis tingkat rendah, yang dicirikan dengan adanya infiltrasi sel-sel imun, produksi *sitokin* dan kemokin proinflamasi, terutama *TNF- α* pada lingkungan jaringan adiposa^{9,26}. Selain inflamasi, patogenesis sindrom metabolik juga dipicu oleh hipoksia, hiperplasia, remodeling struktural kapiler darah, melalui angiogenesis^{6,27}. Proses-proses tersebut diatur oleh protein anggota *HIF*, seperti *HIF-1 α* dan *HIF-2 α* ^{28,29}. *IL-10* and *TGF- β* merupakan molekul anti-inflamasi yang potensial untuk mengontrol ekspresi *TNF- α* ^{30,31}.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *SH-MSCSs* dengan dosis 500 uL dapat menurunkan ekspresi gen *IL-6* dan meningkatkan SOD pada T1DM³². Selanjutnya, penelitian *in vivo*, mengungkapkan bahwa *secretome hMSC-EC* atau kombinasi protein spesifik yang diperkaya dalam *secretome hMSC-EC* meningkatkan proses penyembuhan luka dalam kondisi hiperglikemik³. Lebih lanjut, *hASC* dan *hASC-CM* juga mampu memulihkan keseimbangan *sitokin* pro/antiinflamasi, *Th1/Th2* dan perbaikan morfologi ginjal³³. Perbaikan kondisi-kondisi MetS tersebut juga dapat meningkatkan reparasi dari MOD. Namun, mekanisme molekuler yang jelas dan detail dari *SH-MSCSs* dalam meregulasi dan memperbaiki MetS masih belum diteliti secara komprehensif, terutama dalam aspek molekulernya. Oleh karena itu, proposal penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *SH-MSCSs* terhadap ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* dalam desain eksperimental *in vivo* menggunakan tikus Wistar jantan model MetS.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah adakah pengaruh pemberian *SH-MSCSs* terhadap ekspresi gen *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* dan *Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α* pada tikus jantan galur Wistar model Sindrom metabolik?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian *SH-MSCSs* terhadap ekspresi gen *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* dan *Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α* pada tikus jantan galur Wistar model Sindrom metabolik.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh *SH-MSCSs* dengan variasi dosis 150 μ L/200 gr BB dan 300 μ L/200 gr BB terhadap penurunan ekspresi gen *TNF- α* pada tikus galur Wistar model Sindrom metabolik.
2. Mengetahui pengaruh *SH-MSCSs* dengan variasi dosis 150 μ L/200 gr BB dan 300 μ L/200 gr BB terhadap penurunan ekspresi gen *HIF-2 α* pada tikus galur Wistar model Sindrom metabolik.

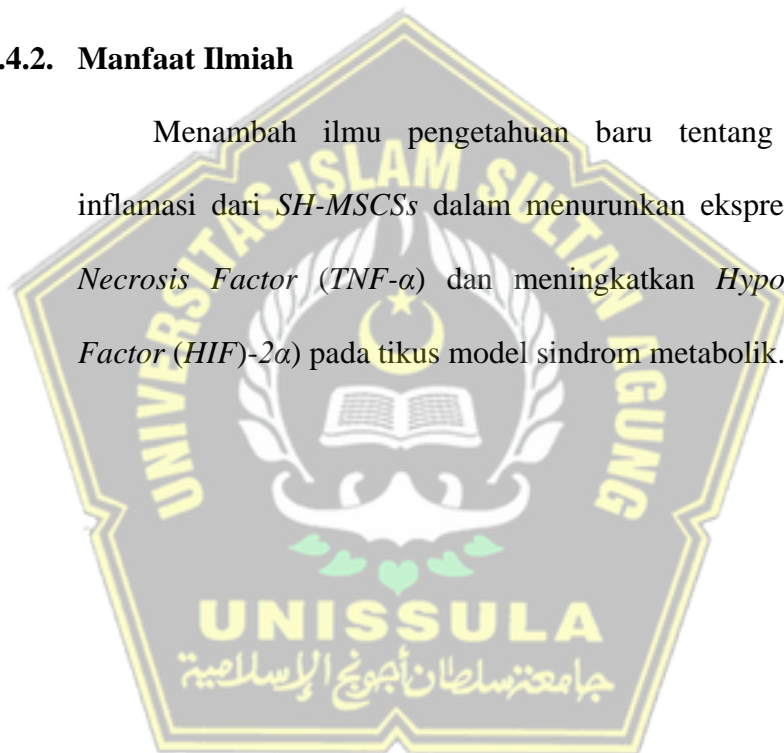
1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Praktis

Diharapkan *SH-MSCSs* dapat memberikan manfaat dalam pencegahan yang berperan sebagai anti inflamasi dan penginduksi regenerasi dengan cara mengontrol inflamasi dan mempercepat regenerasi jaringan pada tikus model Sindrom metabolik.

1.4.2. Manfaat Ilmiah

Menambah ilmu pengetahuan baru tentang potensi anti inflamasi dari *SH-MSCSs* dalam menurunkan ekspresi gen *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* dan meningkatkan *Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α* pada tikus model sindrom metabolik.



1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
1	Utami A, Putra A, Wibowo JW, Amalina ND, Irawan RCS	<i>Hypoxic secretome Mesenchymal Stem Cells inhibiting interleukin-6 expression prevent oxidative stress in type 1 diabetes mellitus</i>	Experimental <i>in vivo</i>	<i>Hypoxic secretome Mesenchymal Stem Cells</i> dengan dosis 500 uL dapat menurunkan ekspresi gen <i>IL-6</i> dan meningkatkan SOD pada T1DM
2	Yanlu Z, M. Chopp, Yuling Meng, M. Katakowski, Hongqi Xin, A. Mahmood, Y. Xiong	<i>Effect of exosomes derived from multi pluripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Exosome secara signifikan meningkatkan jumlah sel endotel baru, meningkatkan jumlah, dan mengurangi peradangan saraf.
3	Isa Anshori Muchaeroni	<i>Pengaruh Kombinasi Sekretom Hypoxia MSCs Dengan Vitamin D3 Terhadap Ekspresi Gen Sod, IL-10 Dan TNF-α (Studi Eksperimental In vivo Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar Model DM Tipe 2 Dan Periodontitis)</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	Kombinasi <i>SH-MSCSS</i> dosis 150 uL dengan vitamin D3 meningkatkan ekspresi gen SOD dan <i>IL-10</i> serta menurunkan ekspresi gen <i>TNF-α</i> .
4	Valeska O, Estefanía NL, Daniela R, Felipe AZ, Carlos E, Paola L, Alexa M, Yanara P, Camila R, Milly Y, Mabel V, Guillermo CV, Katherine O dan Claudio A	<i>Secretome from Human Mesenchymal Stem Cells-Derived Endothelial Cells Promotes Wound Healing in a Type-2 Diabetes Mouse Model</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	<i>Secretome hMSC-EC</i> atau kombinasi protein spesifik yang diperkaya dalam <i>secretome hMSC-EC</i> meningkatkan proses penyembuhan luka dalam kondisi hiperglikemik
5	Yessi Octaviani	<i>Pengaruh Pemberian Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCSs) Terhadap Penurunan Ekspresi Gen P65 Dan TNF-α Pada Polycystic Ovary Syndrome</i>	Eksperimental <i>in vivo</i>	<i>SH-MSCSs</i> pada dosis 200 μ L/kgBB dan dosis 400 μ L/kgB berpengaruh terhadap penurunan ekspresi gen p65 dan ekspresi gen <i>TNF-α</i> .

Penelitian terdahulu melaporkan secretome yang berasal dari *adipose tissue-derived stem cells* yang dikultur secara 2D mampu meningkatkan kadar *glikemik* pada diabetes tipe 1³⁴. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana secretome yang digunakan berasal dari stem cells turunan *wharton jelly* dan hewan model yang digunakan adalah diabetes melitus tipe 2. Selain itu, dosis secretome yang digunakan pada penelitian ini adalah 500 uL dan 1000 uL serta parameter yang dianalisis adalah jalur inflamasi lain yaitu *TNF- α* dan *HIF-2 α* .

Penelitian terdahulu melaporkan penggunaan *Mesenchymal Stem Cells* yang berasal dari jaringan adipose beserta *conditioned medium*-nya mampu mengembalikan kondisi *homestasis T helper type 1 cells (Th1)* sehingga efektif untuk terapi diabetik neuropati. Perbedaan dari penelitian-penelitian di atas adalah belum terdapat studi tentang pengaruh pemberian *SH-MSCSs* terhadap ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* pada tikus jantan galur Wistar diinduksi diet tinggi lemak.

Selanjutnya, penelitian lain juga mengungkapkan bahwa kombinasi *SH-MSCSs* dosis 150uL dengan Vitamin D3 juga dapat memperbaiki tikus model DM tipe 2 dan periodontitis melalui peningkatan ekspresi gen *IL-10* dan *SOD* serta menurunkan ekspresi gen anti-inflamasi *TNF- α* . Perbedaan penelitian tersebut berbeda dengan studi ini karena penelitian tidak menggunakan kombinasi, jenis hewan model yang digunakan serta parameter *IL-10* dan *SOD*.

Penelitian terdahulu melaporkan *secretome human Mesenchymal Stem Cells-derived endothelial cells* yang dikombinasikan protein spesifik mampu meningkatkan penyembuhan luka dalam kondisi *hyperglukemia*³. Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana *secretome* yang digunakan berasal dari medium kultur stem cells turunan *wharthon jelly* yang di-*hypoxic* tanpa kombinasi protein spesifik.

Selanjutnya, studi sebelumnya yang menggunakan *SH-MSCSs* dengan dosis 200 $\mu\text{L}/\text{kgBB}$ dan dosis 400 $\mu\text{L}/\text{kgB}$ juga berpengaruh terhadap penurunan ekspresi *gen p65* dan ekspresi *gen TNF- α* pada tikus model *Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS)*. Dimana, penelitian ini berbeda dengan penelitian tersebut pada dosis dan jenis hewan modelnya.

Berdasarkan Tabel 1. menunjukkan bahwa penelitian ini memiliki persamaan dan perbedaan dari penelitian sebelumnya. Persamaan terletak pada variabel bebas yaitu pemberian *SH-MSCSs* dan dosisnya yang mampu menurunkan status inflamasi serta meningkatkan anti-inflamasi. Perbedaannya terletak pada variabel terikat yaitu melihat ekspresi *TNF- α* dan *HIF-2 α* pada tikus jantan galur Wistar diinduksi diet tinggi lemak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)*

Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) adalah *sitokin* pleiotropik pada berbagai jenis sel yang berperan sebagai regulator utama dalam respon inflamasi pada beberapa penyakit, termasuk metabolik Sindrom^{30,35}. *TNF- α* adalah protein homotrimer yang terdiri dari 157 asam amino, terutama dihasilkan oleh sel makrofag, limfosit T, dan NK aktif yang memicu serangkaian berbagai molekul inflamasi, termasuk *sitokin* dan kemokin^{36,37}. Secara umum, *TNF- α* mengikat reseptornya, terutama *TNFR1* dan *TNFR2*, dan kemudian mentransmisikan sinyal molekuler sampai nukleus untuk meregulasi fungsi biologis seperti inflamasi dan apoptosis³⁸.

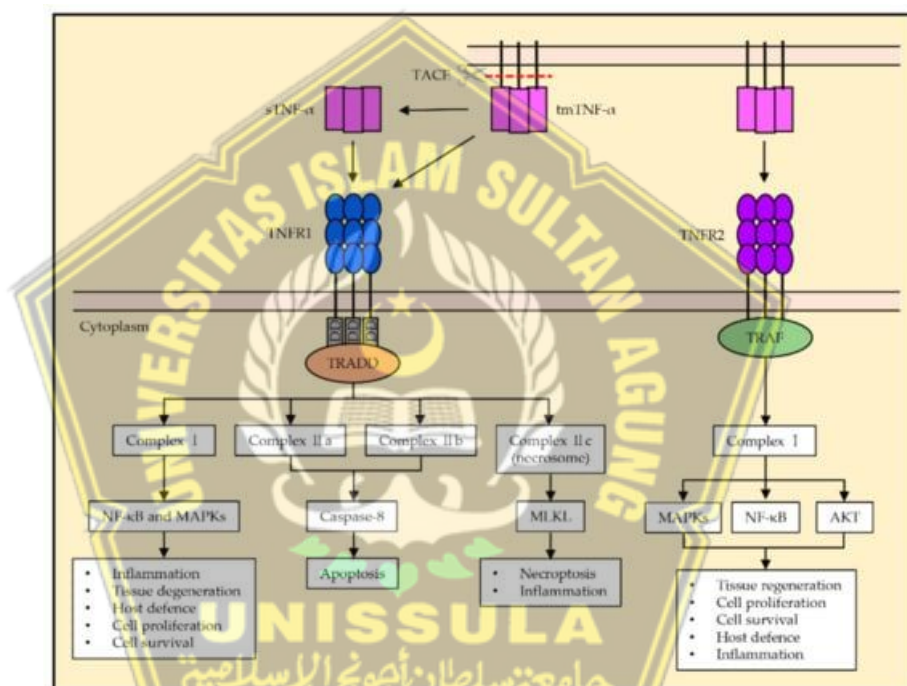
Ikatan antara *TNF- α* dan *TNFR1* dapat memicu pembentukan kompleks pensinyalan yang berbeda, disebut sebagai kompleks I, IIa, IIb, dan IIc, yang menghasilkan respons seluler yang berbeda^{38,39}. Selama aktivasi kompleks I, *TNFR1* yang teraktivasi berikatan dengan *TRADD*, diikuti oleh asosiasi dan interaksi berbagai komponen, termasuk *Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1 (RIPK1)*, faktor terkait *TNFR 2* atau *5 (TRAF2/5)*, inhibitor celluler protein apoptosis 1 atau 2 (*cIAP1/2*), dan *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC)*⁴⁰. Jalur pensinyalan ini menghasilkan aktivasi *Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)* dan *Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)*. Hasil fungsional dari

pensinyalan kompleks I dikenal sebagai induksi inflamasi, kelangsungan hidup dan proliferasi dan pertahanan kekebalan sel terhadap patogen^{41,42}.

Selain kompleks I yang tersusun di membran plasma, kompleks IIa, IIb, dan IIc tersusun di sitoplasma⁴³. Aktifasi *TNFR1* juga akan mengaktifkan kompleks IIa terdiri dari *TRADD*, *RIPK1*, *TRAF2*, *cIAP1/2*, *pro-Caspase-8*, dan *Fas-Associated Protein With Death Domain (FADD)*³⁸. Kompleks IIb memiliki komposisi yang sama dengan kompleks IIa dengan penambahan *RIPK3*³⁸. Pembentukan kompleks IIa dan IIb (juga dikenal sebagai apoptosom) yang mengaktifkan caspase-8 dan memicu apoptosis^{39,44}. Kompleks IIc (dikenal sebagai nekrosom), tersusun atas *RIPK1* dan *RIPK3*, mengaktifkan *Mixed Lineage Domain Kinase (MLKL)-like* protein melalui fosforilasi yang dimediasi *RIPK3*, yang menginduksi nekroptosis dan inflamasi⁴⁵.

TNFR2 disarankan untuk diaktifkan sepenuhnya oleh *TNF- α* , terutama dalam konteks interaksi sel-ke-sel. Tidak seperti *TNFR1*, *TNFR2* tidak memiliki domain kematian sehingga tidak dapat menginduksi kematian sel terprogram secara langsung. Selama perakitan, *TNFR2* merekrut *TRAF2* bersama dengan *TRAF1*, *cIAP1*, dan *cIAP2*, dan kompleks ini memungkinkan aktivasi hilir *NF- κ B*, *MAPKs*, dan *protein kinase B (AKT)*⁴⁶. Secara fungsional, *TNFR2* terutama terkait dengan bioaktivitas homeostatis, termasuk regenerasi jaringan, proliferasi sel, dan kelangsungan hidup sel⁴⁷. Namun, jalur ini juga diketahui memicu respons inflamasi dan kekebalan sel terhadap patogen. Secara keseluruhan, *TNFR1* sangat penting untuk

menginduksi respons *TNF- α* sitotoksik dan proinflamasi, sementara *TNFR2* sebagian besar dapat memediasi aktivasi, migrasi, atau proliferasi sel⁴⁸. Secara fisiologis, *TNF- α* merupakan komponen penting untuk respon imun yang normal. *TNF- α* dapat mengaktifkan sistem kekebalan untuk mengatur; namun, produksi *TNF- α* yang berlebihan dapat berbahaya dan menyebabkan penyakit⁴⁹.



Gambar 2.1. Jalur pensinyalan *TNF- α* , *TNFR1* dan *TNFR2*³⁸

2.2. Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α

Hypoxia Inducible Factors (HIFs) adalah pengatur utama respon adaptif hipoksia⁴¹. Hipoksia seluler terjadi ketika kebutuhan oksigen molekuler yang diperlukan untuk sintesis ATP melebihi suplai vaskular, sehingga menyebabkan kekurangan oksigen yang mengarah ke krisis bioenergi⁸. Adaptasi terhadap lingkungan tersebut dimediasi oleh faktor-

faktor yang diinduksi hipoksia, *HIF-1 α* dan *-2 α* ^{10,50}. Keluarga protein *HIF* terdiri dari anggota sub-unit α dan β yang berfungsi dengan membentuk heterodimer. Dua isoform *HIF* utama (*HIF-1 α* dan *HIF-2 α*) memediasi respons semua sel terhadap hipoksia^{10,50}.

HIF-2 merupakan faktor transkripsi, yang secara struktural memiliki kompleks protein dimer yang berperan dalam respon organisme terhadap hipoksia, adaptasi terhadap kondisi rendah oksigen serta untuk embriogenesis dan perkembangan tumor¹⁰. *HIF-2 α* juga dikenal sebagai *Endothelial PAS Domain Protein 1 (EPAS1)*, *HIF-associated factor*, *HIF-like factor* and dan anggota dari famili *PAS 2*. Pada kondisi hipoksia, *HIF-2 α* terlokalisasi dalam nukleus pada titik dekat *RNA polimerase* yang aktif. Hal ini memberikan akses yang lebih baik terhadap promotor gen target, berbeda dengan *HIF-1 α* , yang terdistribusi secara homogen dalam nukleus. Ekspresi *HIF-2 α* bersifat spesifik jaringan dan terbatas terutama pada endotelium, hepar, lemak, paru-paru, ginjal, jantung, otak, dan usus. *HIF-2* mengatur transkripsi gen target hipoksia, yang terlibat dalam beberapa proses biologis seperti eritropoiesis (eritropoietin [*EPO*]), *stemness* / pembaruan diri (*OCT-4*), proliferasi (*TGF- α* dan *siklin D1 [CCND1]*), apoptosis, invasi (*Plasminogen Activator Inhibitor-1 [PAI-1]*), *epithelial mesenchymal transition*, *Homeostasis Redoks (SOD-2)* dan *angiogenesis*⁵¹.

Pada kondisi normoksik, subunit *HIF* dengan cepat terdegradasi oleh jalur *ubiquitin-proteasome* yang dimediasi oleh residu *prolyl* spesifik¹⁰. *HIF-2 α* sitoplasma yang disintesis secara de novo dihidroksilasi pada dua

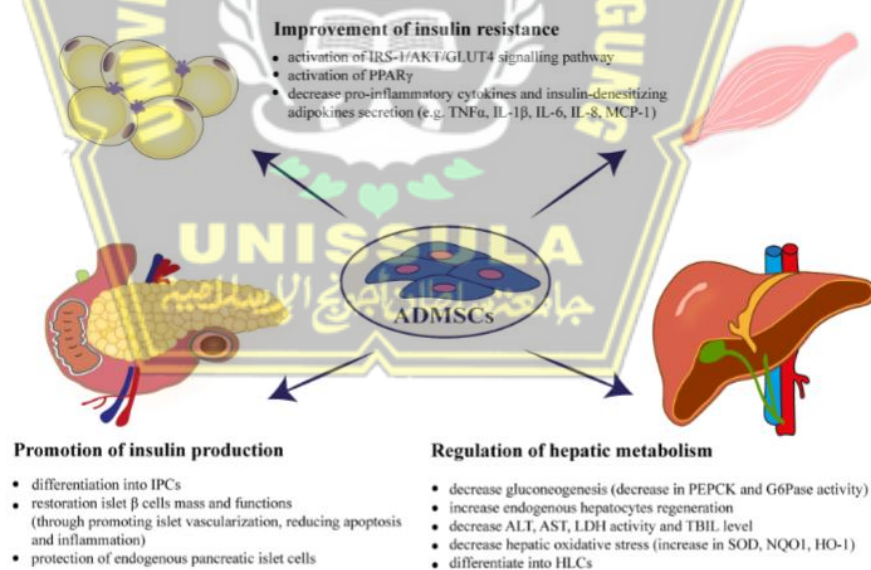
residu prolin yang dilestarikan, prolin (*Pro-405* dan *Pro-531*) yang terletak di dalam domain *ODD* oleh keluarga enzim *Prolyl Hidroksilase (PHD)*. Hidroksilasi profil *HIF-2 α* menghasilkan pengikatan penekan tumor *von Hippel-Lindau (VHL)*, yang merekrut kompleks *Elongin C-Elongin B-Cullin 2-E3-ubiquitin-ligase*, yang menyebabkan *poliubiquitinasi* dan degradasi proteasomal *HIF- 2 α* dengan waktu paruh kurang lebih 5 menit. Residu ini dihidroksilasi oleh *HIF-prolyl hydroxylases* (protein domain *Prolyl Hidroksilasi [PHD]*), sebuah proses yang membutuhkan dioksigen dan 2-*oksoglutarat* sebagai kosubstrat.⁵²

2.3. *Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells*

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adiposit, dan neurosit. *Mesenchymal stem cell* dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, *bone marrow*, hingga *wharton jelly* dari tali pusat.⁵³ Secara umum, *MSC* diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel *fibroblast* atau jarum. Secara *fenotype*, *MSC* yang diisolasi dari tikus, dimana *MSC* tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain *CD44* dan *CD29*, namun mengekspresikan marker spesifik *CD45* dan *CD31* dan bersifat *osteogenic*.⁵⁴

Mesenkimal merupakan sel multipoten yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai garis keturunan sel termasuk adiposit, tulang, tulang rawan, otot, dan stroma. Meskipun adipogenesis adalah proses multistep

yang melibatkan banyak perantara seluler, untuk tujuan praktis saat ini adipogenesis ditandai oleh dua fase utama: fase determinasi dan fase diferensiasi terminal. *MSC* memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self-renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit.⁵⁵ Selain itu *MSC* juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekskresi beberapa *sitokin* baik pro atau pun anti inflamasi. *MSC* diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut *secretome*, biasanya diklasifikasikan sebagai *sitokin*, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, *growth factor (GF)*, hormon, eksosom, mikrovesikel dan faktor anti-inflamasi.



Gambar 2.2. Mekanisme aksi *Mesenchymal Stem Cells* dalam meregulasi sindrom metabolik⁵⁶

Hypoxia merupakan keadaan dimana suplai oksigen pada jaringan berada dibawah ambang normal. *Hypoxia* bersifat merusak bagi berbagai

jenis sel dan pada kondisi *hypoxia* jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun beberapa penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa kondisi *hypoxia* yang terkontrol dapat meningkatkan kemampuan *proliferasi*, *self renewal* dan pelekatan sel punca mesenkimal. Selain itu, *hypoxia* juga memicu produksi molekul *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)* yang berperan dalam peningkatan sekresi *sitokin-sitokin* potensial dari sel punca mesenkimal^{57,51,58}.

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, *self renewal*, dan pelekatan *MSC*.⁵⁹ Lebih lanjut kondisi hipoksik memicu produksi molekul Hipoxic Induce Factor (*HIF*) yang berperan dalam peningkatan produksi *sitokin-sitokin* dari *MSC*.⁶⁰



Gambar 2.3. Hipoksia mengaktivasi *MSCs*

2.4. Sindrom Metabolik

Sindrom metabolik adalah gangguan kompleks dari sekelompok faktor seperti dislipidemia, peningkatan tekanan darah, homeostasis glukosa yang tidak teratur, obesitas abdominal dan / atau resistensi insulin yang secara langsung meningkatkan risiko penyakit jantung koroner, aterosklerotik kardiovaskular, dan diabetes mellitus tipe 2 (DMT2)^{26,61}.

Proliferasi dan regenerasi dari adiposit sebagian besar berasal dari sel punca mesenkimal, sel multipoten yang berasal dari berbagai jaringan dewasa seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, tali pusat, dan endometrium^{62,63}. Peran dan kapasitas sel punca mesenkimal sebagai obat regeneratif dalam memperbaiki sel dan jaringan yang rusak telah dipelajari secara ekstensif berbagai penyakit, termasuk dalam sindrom metabolic, baik secara pra-klinis maupun klinis^{64,65}.

Manajemen terapi sindroma metabolic melalui sel punca mesenkimal adalah differensiasi sel punca menjadi adiposit (adipogenesis) dan mekanisme parakrin dari *secretome* sel punca mesenkimal untuk memperbaiki lingkungan mikro jaringan adiposa yang rusak^{66,67}. Adipogenesis dari sel punca mesenkimal diatur oleh berbagai jalur pensinyalan intraseluler yang kompleks dan saling berinteraksi untuk mengaktifkan serangkaian faktor transkripsi seperti *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma (PPAR-gamma)* dan beberapa famili protein *CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP)*⁶⁸. Jalur pensinyalan *Wnt/β-catenin* merupakan salah satu jalur pensinyalan seluler

yang memiliki peran utama dalam diferensiasi adipogenik preadiposit⁶⁹. Jalur pensinyalan lain juga memiliki peran penting dalam adipogenesis, misalnya, jalur pensinyalan *Hedgehog*, *Nell-1* dan transforming *growth factor (TGF)- β* dilaporkan memiliki efek antiadipogenik pada sel punca mesenkimal, sementara pensinyalan pensinyalan *bone morphogenic protein (BMP)* dan *Insulin Growth factor (IGF)* memicu adipogenesis^{68,70}.

Obesitas dianggap sebagai penyebab utama sindrom metabolik^{19,71,72}. Obesitas berat disebabkan oleh peningkatan ukuran adiposit yang dikombinasikan dengan peningkatan jumlah adiposit^{73,74}. Adiposit baru muncul dari kumpulan sel induk adiposa yang sudah ada sebelumnya tanpa memandang usia, dan penelitian terbaru menyamakan sel induk adiposa dengan *MSC* yang berasal dari sumsum tulang⁷⁵.

2.5. Pengaruh *SH-MSCSs* Terhadap Ekspresi *TNF- α* dan *(HIF)-2 α*

Secretome adalah kumpulan protein, lipida, dan sejumlah kecil asam nukleat yang disekresikan oleh sel-sel, termasuk sel punca mesenkimal (*MSC*), ke lingkungan sekitarnya^{76,77}. *SH-MSCSs* telah terbukti memiliki kemampuan untuk mengatur respons sistem kekebalan tubuh melalui faktor imunomodulasinya seperti *IL-10* dan *TGF- β* , yang dapat menghambat produksi *TNF- α* dari sel-sel imun (makrofag dan sel T)^{12,78}. Disamping itu, molekul anti-inflamasi seperti *Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1Ra)* dan *interleukin-4 (IL-4)* yang terkandung dalam *SH-MSCSs* juga telah terbukti mampu, yang dapat mengurangi inflamasi melalui penghambatan produksi *TNF- α* ^{12,79}.

Penelitian-penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *MSCs* yang diprekondisikan hipoksia dapat meningkatkan pelepasan molekul aktifnya, yang dikenal sebagai *SH-MSCs* seperti *IL-10*, *TGF- β* , *VEGF*, dan *PDGF*, yang membantu menekan inflamasi berkepanjangan dan meningkatkan proses penyembuhan jaringan^{80,81}. *IL-10* dapat menghambat jalur *NF- κ B*, jalur sinyal penting yang mengatur transkripsi gen *TNF- α* ^{82,83}. Ketika ada inflamasi atau stimuli lain, *NF- κ B* dapat teraktivasi dan memicu transkripsi gen *TNF- α* . *IL-10* menghambat aktivasi *NF- κ B*, dengan cara meningkatkan jalur dan ekspresi gen *SOSC3*, selanjutnya *SOSC3* yang mencegah degradasi *Inhibitor Kappa B (I κ B)* sehingga faktor transkripsi *NF- κ B* tidak dapat bertranslokasi ke nucleus untuk memicu transkripsi gen *TNF- α* ^{84,85}.

Peran potensial *SH-MSCs* dalam mengatur ekspresi *HIF-2 α* telah menjadi fokus penelitian yang signifikan dalam upaya memahami mekanisme adaptasi sel terhadap kondisi hipoksik. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa faktor-faktor sekretori yang dilepaskan oleh *MSCs* seperti *TGF- β* dapat mengaktivasi jalur *SMAD2/3* untuk selanjutnya memfosforilasi faktor transkripsi *SMAD4*⁸⁶. *SMAD4* yang bertranslokasi ke nucleus akan menghambat ekspresi *c-Myc* sebagai repressor. *C-Myc* yang terhambat ekspresinya akan berkorelasi pada penurunan *HIF-2 α* . Selain itu, penurunan *HIF-2 α* juga dapat disebabkan karena terhambatnya jalur *PI3K/Akt/mTOR*, dimana jalur tersebut merupakan downstream dari *c-Myc* dan *PTEN*⁸⁷.

Dengan demikian, eksplorasi lebih lanjut terhadap komposisi *secretome hypoxia MSCs* dan efeknya terhadap ekspresi *HIF-2 α* diharapkan dapat mengungkapkan potensi terapi regeneratif yang berkaitan dengan adaptasi sel punca dalam kondisi lingkungan yang menantang.



BAB III

KERANGKA TEORI, KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Sindroma metabolik adalah kumpulan kondisi yang meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular dan diabetes tipe 2, yang ditandai dengan obesitas abdominal, hipertensi, hiperglikemia, dan dislipidemia, yang pada tingkat seluler terkait dengan inflamasi kronis dan proliferasi adiposit berlebihan. Inflamasi kronis tingkat rendah terjadi akibat pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan adipokin oleh infiltrasi sel-sel imun progresif pada jaringan adiposa. Selain itu, proliferasi adiposit sering kali menyebabkan hipoksia (kekurangan oksigen), yang memicu peningkatan faktor inducible hypoxia-2 (HIF-2). HIF-2 berperan dalam adaptasi seluler terhadap hipoksia dan dapat memperlambat kondisi inflamasi. Oleh karena itu, pengendalian kondisi inflamasi ini dapat menjadi langkah penting dalam penanganan sindroma metabolik.

Secretome hipoksia mesenchymal stem cells (SH-MSCs) merupakan sekumpulan molekul sitokin, kemokin, growth factor, miRNA dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSCs ke lingkungan sekitarnya. SH-MSCs mampu mengatur respon inflamasi di dalam tubuh melalui faktor imunomodulator seperti IL-10 dan TGF- β , yang secara langsung maupun tidak langsung dapat menghambat produksi TNF- α oleh sel-sel imun seperti makrofag dan sel T sehingga meredakan kondisi inflamasi pada MetS.

Sitokin IL-10 yang dilepaskan oleh MSC selanjutnya akan berikatan dengan reseptornya pada permukaan sel target, mengaktifasi sinyal transduksi JAK yang ujungnya fosforilasi STAT3. Faktor transkripsi STAT3 selanjutnya akan menuju ke nucleus untuk memicu transkripsi gen SOCS3. Protein aktif SOCS3 ini akan menghambat degradasi Inhibitor Kappa B (I κ B) dan translokasi NF- κ B ke inti sel, dimana faktor transkripsi ini merupakan jalur sinyal penting yang memicu transkripsi gen TNF- α . Dalam kondisi inflamasi seperti pada MetS, NF- κ B dapat teraktivasi oleh beberapa faktor seperti protein pro-inflamasi yang disekresikan oleh sel makrofag tipe-1 yang terpolarisasi akibat peningkatan kadar Free Fatty Acid (FFA). Selain itu, FFA juga memicu peningkatan kadar Reactive Oxygen Species (ROS) yang juga bisa mengaktifasi jalur NF- κ B.

Peran potensial SH-MSCs dalam mengatur ekspresi HIF-2 α melibatkan TGF- β . TGF- β yang disekresikan oleh MSC dapat mengaktifasi jalur SMAD2/3 yang selanjutnya memfosforilasi faktor transkripsi SMAD4. SMAD4 yang bertranslokasi ke nukleus akan menghambat ekspresi c-Myc. Penurunan faktor transkripsi c-Myc secara langsung berkorelasi dengan penurunan ekspresi gen HIF-2 α . Selain itu, penurunan HIF-2 α juga dapat disebabkan oleh terhambatnya jalur PI3K/Akt/mTOR, yang merupakan jalur downstream dari c-Myc dan PTEN.

3.3. Hipotesis

- a. Pemberian *SH-MSCs* dengan dosis 150 uL/200 gr BB dan 300 uL/200 gr BB berpengaruh terhadap ekspresi gen *TNF- α* pada tikus galur Wistar model Sindrom metabolik.
- b. Pemberian *SH-MSCs* dosis 150 uL/200 gr BB dan 300 uL/200 gr BB berpengaruh terhadap ekspresi gen *HIF-2 α* pada tikus galur Wistar model Sindrom metabolik.

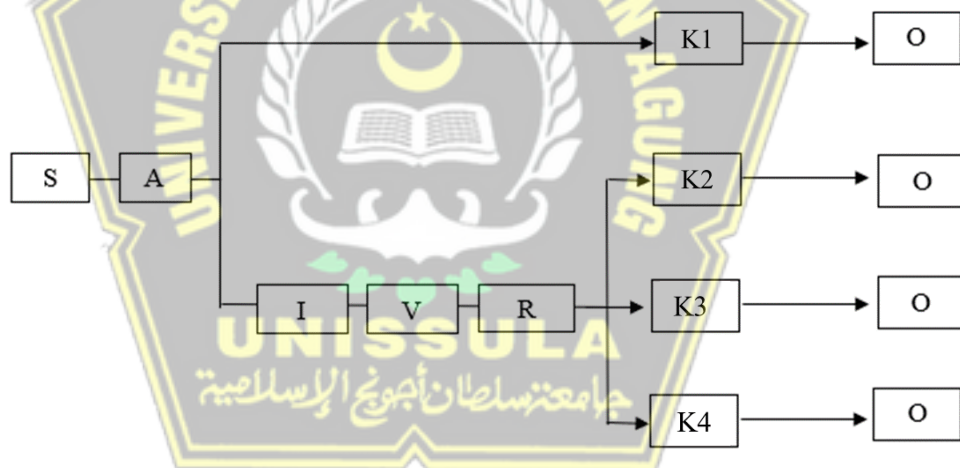


BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *Post test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dengan rincian sebagai berikut: 2 kelompok perlakuan intervensi (K3 dan K4), 1 kelompok perlakuan yang mendapatkan placebo (K2) dan 1 kelompok tikus sehat (K1). Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S Subjek
- A Adaptasi
- I Induksi
- V Validasi
- R Randomisasi/ Alokasi random
- K1 Kelompok Sehat, tikus diberi pakan standar.

- K2 Kelompok Kontrol Placebo, tikus diberi pakan tinggi lemak serta injeksi secara intraperitoneal NaCl 300 uL/200 gr BB tikus selama 4 kali dalam 14 hari.
- K3 Kelompok Perlakuan 1, tikus diberi pakan tinggi lemak serta injeksi secaraintraperitoneal *SH-MSCSs* 150 uL/200 gr BB tikus selama 4 kali dalam 14 hari.
- K4 Kelompok Perlakuan 2, tikus diberi pakan tinggi lemak serta injeksi secaraintraperitoneal *SH-MSCSs* 300 uL/200 gr BB tikus selama 4 kali dalam 14 hari.
- O Observasi

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Sampel dalam penelitian ini menggunakan tikus galur wistar jantan yang berusia 8 minggu, dengan berat badan ± 200 gram yang diperoleh secara *purposive sampling* dimana pemilihan sampel berdasarkan ciri-ciri yang telah diketahui sebelumnya.

4.2.2. Sampel Penelitian

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

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer didapatkan besar sampel minimal 6 ekor. Jadi total sampel yang digunakan sebanyak 24 ekor tikus. Tikus dibagi kedalam empat kelompok secara *Randomized Controlled Trial* (RCT).

4.2.2.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus galur Wistar jantan
2. Usia 8-12 minggu
3. Berat badan 200-250 gram
4. Tidak ada kelainan anatomis

4.2.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang ada kelainan anatomis
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya

4.2.2.3. Kriteria *Drop out*

1. Tikus yang mati atau sakit selama penelitian

4.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* pada bulan Januari - Februari 2024.

4.4. Variabel dan Definisi Operasional

4.4.1. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

4.4.1.1. Variabel bebas

Pemberian *SH-MSCSs* dosis 150 μL /200 gr BB dan 300 μL /200 gr BB

4.4.1.2. Variabel terikat

Ekspresi gen *TNF- α* dan (*HIF*)-2 α .

4.4.1.3. Variabel Prakondisi

Induksi pakan tinggi lemak.

4.4.2. Definisi Operasional

Tabel 4.1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala
<i>SH-MSCSs</i>	<i>Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells</i> adalah protein soluble molekul yang mengandung factor <i>IL-10</i> , <i>VEGF</i> dan <i>PDGF</i> diperoleh dari medium kultur sekresi <i>MSC Umbilical Cord</i> (karakteristik ekspresi <i>CD73</i> , <i>CD90</i> dan <i>CD105</i> serta tidak mengekspresikan <i>CD13</i> , <i>CD14</i> , <i>CD16</i> , <i>CD21</i> pada suhu 37°C pada kondisi 5% O ₂ selama 24 jam. Pemberian <i>SH-MSCSs</i> secara injeksi intraperitoneal dosis 150 μL /200 gr BB dan 300 μL /200 gr BB.	Ordinal
Ekspresi gen <i>TNF-α</i>	<i>TNF (Tumor Necrosis Factor) – α</i> adalah sitokin pro-inflamasi yang dirilis saat terjadi peradangan. Ekspresi <i>TNF-α</i> dianalisis dari jaringan adiposa abdomen yang diambil pada hari ke 15 dan dilakukan dengan metode <i>RT-PCR (Real Time – Polymerite Chain Reaction)</i>	Rasio
Ekspresi gen <i>HIF-2α</i>	<i>HIF (Hypoxia Inducible Factor)-2α</i> adalah protein factor transkripsi yang meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proses hipoksia. Ekspresi <i>HIF-2α</i> dianalisis dari jaringan adiposa abdomen yang diambil pada hari ke 15 dan dilakukan dengan metode <i>RT-PCR (Real Time – Polymerite Chain Reaction)</i>	Rasio

4.5. Bahan Penelitian

Bahan utama pada penelitian ini yaitu hewan percobaan yang digunakan adalah tikus jantan galur wistar dewasa sehat yang berusia 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram. Tikus jantan galur wistar diperoleh dari Animal Model Research Center SCCR Semarang sebanyak 24 ekor tikus galur wistar jantan. Ekstraksi RNA dan Sintesis *cDNA* menggunakan *TRIreagent*, *choloform*, *isopropyl alcohol*, *EtOH* 75%.

Ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* dianalisis menggunakan *Real Time-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)* menggunakan sampel *cDNA*, *Taq master mix (dNTPs)*, *Taq DNA Polymerase*, *reaction buffer* dan *MgCl₂*, primer spesifik gen *TNF- α* , *HIF-2 α* dan *β -actin*.

4.6. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung *ependorf*, timbangan tikus “*daihan scientific*”, gunting kecil, pinset sirurgik, pisau silet, gelas objek, sarung tangan, kapas counter, pipet tetes, μ plate, *microcentrifuge*, spektrofotometer *Multiskan SkyHigh*, instrumen *RT-PCR*.

4.7. Cara Induksi Sindrom Metabolik pada Tikus

Induksi diet tinggi lemak diberikan *high calorie diet* yang terdiri dari pakan standar 50%, tepung terigu 25%, lemak kambing 10%, minyak babi 8-9%, kuning telur 5%, minyak kelapa 1%, *NaCl* 10%. Diet ini diberikan selama 30 hari. Dihitung status gizi tikus, dikatakan mengalami sindrom

metabolic jika indeks lee lebih dari 300. Diet tinggi lemak diberikan secara adlibitum 20 g per tikus/hari selama 30 hari.⁸⁸

4.8. Pemberian *SH-MSCSs*

Dosis *SH-MSCSs* yang diberikan secara injeksi intraperitoneal pada kelompok perlakuan adalah 150 μL /200 gr BB tikus dan 300 μL /200 gr BB tikus selama 4 kali dalam 14 hari (Hari ke 1, 4, 7 dan 10). Dosis yang dipilih adalah dosis hasil optimasi penelitian sebelumnya.⁸⁹

4.9. Cara Kerja Penelitian

4.9.1. Cara Kerja Penelitian

Dipilih 24 ekor tikus berumur 2-3 bulan dengan berat 200-250gr dan dibagi menjadi 4 kelompok secara acak: K1, K2, K3 dan K4 dengan masing masing kelompok terdiri atas 6 ekor tikus.

K1 : Kelompok tikus dengan pemberian pakan standar tanpa diinduksi diet tinggi lemak.

K2 : Kelompok tikus dengan pemberian pakan standar yang diinduksi diet tinggi lemak dengan diberikan NaCl.

K3 : Kelompok tikus dengan pemberian pakan standar yang diinduksi diet tinggi lemak dengan diberikan *SH-MSCSs* 150 μL /200 gr BB selama 4 kali dalam 14 hari.

K4 : Kelompok tikus dengan pemberian pakan standar yang diinduksi diet tinggi lemak dengan diberikan *SH-MSCSs* 300 μL /200 gr BB tikus selama 4 kali dalam 14 hari.

Pada hari ke 15 tikus diterminasi dan dikoleksi jaringan adiposa bagian abdominal untuk disimpan dalam larutan RNA-later yang selanjutnya digunakan untuk pemeriksaan ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* .

4.9.2. Cara Pemeriksaan

4.9.2.1. Pengukuran Triglicerida

1. Siapkan blangko, standart, dan sampel serum darah tikus.
2. Masukkan reagent triglicerida hingga 1000 μ l ke dalam tiga tabung reaksi yaitu tiap-tiap tabung berisi 1000 μ l.
3. Masukkan standar triglicerida hingga 10 μ l ke dalam tabung yang sudah berisi 1000 μ l reagen triglicerida.
4. Masukkan serum hingga 10 μ l kedalam reagen triglicerida.
5. Inkubasi selama 10 menit di dalam suhu 37 °C.
6. Baca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm dalam 60 menit.⁹⁰

4.9.2.2. Pemeriksaan HDL (*High-density Lipoprotein*)

1. Pembuatan *working reagent*: siapkan satu botol kosong untuk menggabungkan empat bagian reagen kolesterol hingga 4000 μ l serta 1000 μ l aquadest pada satu bagian.
2. Pembuatan supernatant: dua tabung digunakan untuk tabung pertama sebagai standart yaitu berisi *working reagent* sebanyak 500 μ l. Tabung yang kedua berisi

sampel yaitu dimasukkan 200µl serum, kemudian homogenkan.

3. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25°C dan di centrifugasi 4000 rpm selama 10 menit.
4. Prosedur kerja kolestrol HDL: Sediakan tiga tabung, kemudian dimasukkan larutan supernatant standart sebanyak 100µl. Tabung supernatant sampel dimasukkan larutan supernatant sampel sebanyak 100µl. Tabung blanko, supernatant standart, dan supernatant sampel di masukkan masing-masing kedalam 1000µl *working reagent*.
5. Inkubasi selama 10 menit suhu 37°C.
6. Baca hasil dengan spektrofotometer panjang gelombang 546 nm.⁹⁰

4.9.2.3. Pemeriksaan LDL (*Low-density Lipoprotein*)

1. Siapkan blanko, standart, dan sampel serum darah tikus.
2. Masukkan reagent *LDL* hingga 1000 µl kedalam tiga tabung reaksi yaitu tiap-tiap tabung berisi 1000 µl.
3. Masukkan standar *LDL* hingga 10 µl kedalam tabung yang sudah berisi 1000 µl reagen *LDL*.
4. Masukkan serum hingga 10 µl kedalam reagen *LDL*.
5. Inkubasi selama 10 menit di dalam suhu 37 °C.

6. Baca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.^{90,91}

4.9.2.4. Total kolesterol pada sampel dihitung menggunakan metode berikut :

1. 50 μ L Campuran Reaksi Kolesterol Total dan 50 μ L Campuran Reaksi Kolesterol Bebas disiapkan untuk setiap reaksi sesuai dengan kit Cholesterol Assay Kit - HDL and LDL/VLDL (nomor katalog : ab65390)
2. Sampel serum darah sebanyak 20 μ L ditambahkan ke masing-masing well.
3. 50 μ L Campuran Reaksi Kolesterol Total ditambahkan ke setiap well.
4. 50 μ L Campuran Reaksi Kolesterol Bebas ditambahkan ke setiap well.
5. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit pada ruang gelap.
6. Pembacaan sampel dilakukan menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.
7. Konsentrasi total kolesterol dihitung dan dibandingkan dengan standar sesuai dengan rumus dari kit.

4.9.3. Analisis Ekspresi Gen dengan *Real-Time PCR*

Analisis ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* menggunakan metode *Real-Time PCR* memiliki tiga tahapan yaitu : ekstraksi RNA, kuantifikasi RNA, sintesis *cDNA* dan analisis *Real-Time PCR*.

4.9.3.1. Ekstraksi RNA

Prosedur ekstraksi RNA terdiri dari tiga tahapan utama yang diuraikan sebagai berikut.

Tahap I Sample preparation

Sampel jaringan adiposa dalam RNA-later dikeluarkan dari freezer dan ditunggu hingga agak sedikit cair kemudian sampel ditimbang seberat 50-70 mg dan dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL menggunakan pinset yang selanjutnya, ditambahkan 1000 μ L *TRIreagen (Trizol Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)*. Sampel yang tercampur digerus dengan mikropestel hingga hancur kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.

Tahap II Phase separation

Sampel yang telah diinkubasi ditambahkan 200 μ L chloroform kemudian divortex hingga homogen dan dilakukan inkubasi selama 5-15 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi pada 12000xg selama 15 menit pada suhu 4⁰C. Hasil dari sentrifugasi ini akan diperoleh 3 lapisan larutan yaitu: (1) *lower red organic*

phase (protein) (2) *interphase* (DNA) (3) *upper aqueous phase* (RNA); selanjutnya lapisan atas dipindahkan ke *microtube* baru.

Tahap III *RNA Precipitation*

Sampel *aqueous phase* (RNA sampel) dalam *microtube* 1,5 mL ditambahkan dengan 500 μ L 100% 2-*propanol* (*isopropyl-alcohol*) dan dihomogenkan dengan vortex, selanjutnya diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi pada 12000xg selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang, kemudian pellet RNA dicuci dengan 1 mL 75% ethanol dan divortex hingga homogen. Selanjutnya, sampel disentrifugasi 7500xg selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pellet RNA dikeringanginkan dengan cara tube dibiarkan terbuka selama 5-10 menit. Setelah dikeringanginkan, pellet RNA diresuspensi *Nuclease Free Water* (NFW) dan dihomogenkan dengan cara ditapping secara perlahan.

4.9.3.2. Kuantifikasi RNA

Hasil ekstraksi RNA total diukur menggunakan instrument *MultiSkan High* (Thermo Scientific), dengan prosedur sebagai berikut: Sebelum dilakukan pengukuran sampel RNA, *MultiSkan High* diset pada pengukuran

nucreic acid, dengan panjang gelombang absorbansi 230/260/280 nm. Bersihkan μ Plate MultiSkán High (Thermo Scientific) dengan larutan NFW dan keringanginkan dengan tissue steril. Siapkan sampel RNA dan blanko (NFW) yang akan diukur. Selanjutnya, pipet sebanyak 2 μ L masing-masing sampel dan blanko ke atas μ Plate, tutup μ Plate dan pasang ke dalam instrumen untuk dibaca. Catat nilai konsentrasi dan nilai kemurnian rasio A230/260 dan A260/A280 masing-masing sampel.

4.9.3.3. Sintesis *cDNA*

Sintesis *cDNA* dilakukan berdasarkan prosedur pabrikan dari Kit *TOYOBO ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover* dengan No. FSQ-301. Langkah pertama dalam tahapan sintesis *cDNA* yaitu disiapkan campuran 1 pada tube 0,2 mL steril dengan komposisi seperti berikut :

Tabel 4.2. Komposisi reagen sintesis *cDNA*

Reagen	Volume (μ L)
<i>4X DN Mastermix (with gDNA remover)</i>	2
<i>RNA Tempale</i>	1-2*
<i>Nuclease Free Water</i>	ad 8
Total	8 μ L

*Volume RNA template disesuaikan dengan konsentrasi RNA total masing-masing sampel

Larutan dihomogenkan dengan spinner, selanjutnya campuran 1 diinkubasi pada *termal cycle* dengan suhu 37°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, campuran 2 disiapkan dengan menambahkan 2 µL *5X RT Mastermix II* pada campuran 1 dan dilanjutkan pada proses inkubasi dengan *termal cycle* pada suhu 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit dan 98°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, sampel *cDNA* dalam tube siap untuk dianalisis atau disimpan di -20°C untuk analisis selanjutnya.

4.9.3.4. Analisis Ekspresi Gen dengan *Real Time-PCR*

Proses analisis gen target dilakukan dengan terlebih dahulu mempersiapkan larutan *Mastermix* berdasarkan prosedur *qPCR master mix Biorline SensiFAST SYBR® No-ROX Kit (Cat. No. BIO-98005)* dengan komposisi seperti pada tabel 4.3.

Tabel 4.3. Komposisi reagen *Mastermix qRT-PCR*

Reagen	Volume (µL)
<i>2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix</i>	10
<i>10 µM Forward Primer</i>	0,8
<i>10 µM Reverse Primer</i>	0,8
<i>cDNA Tempale</i>	1
<i>Nuclease Free Water</i>	7,4
Total	20 µL

Pembuatan *Mastermix* tersebut adalah untuk 1 kali reaksi, jumlah reaksi pembuatan *Mastermix* dapat disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan diuji. Setelah semua larutan reaksi dihomogenkan dan di spindown, 20

μL larutan reaksi dimasukkan ke dalam *PCR microplates* kemudian *seal* dipasang dengan rapat dan terbentuknya gelembung udara dihindari. Selanjutnya, dilakukan pengujian ekspresi gen target *TNF- α* dan *HIF-2 α* maupun *housekeeping gene* β -actin dengan masing-masing primer spesifik (Tabel 6) akan dirunning pada kondisi mesin *real time PCR (PCRmax Eco 48 real time PCR)* seperti pada tabel 4.4.

Tabel 4.4. Kondisi siklus, suhu dan waktu mesin RT-PCR

Siklus	Suhu	Waktu	Keterangan
1	95 ⁰ C	2 menit	Aktivasi Polimerase
40	95 ⁰ C	5 detik	Denaturasi
	58-59 ⁰ C	10 detik	Annealing
	72 ⁰ C	5-20 detik	Elongasi

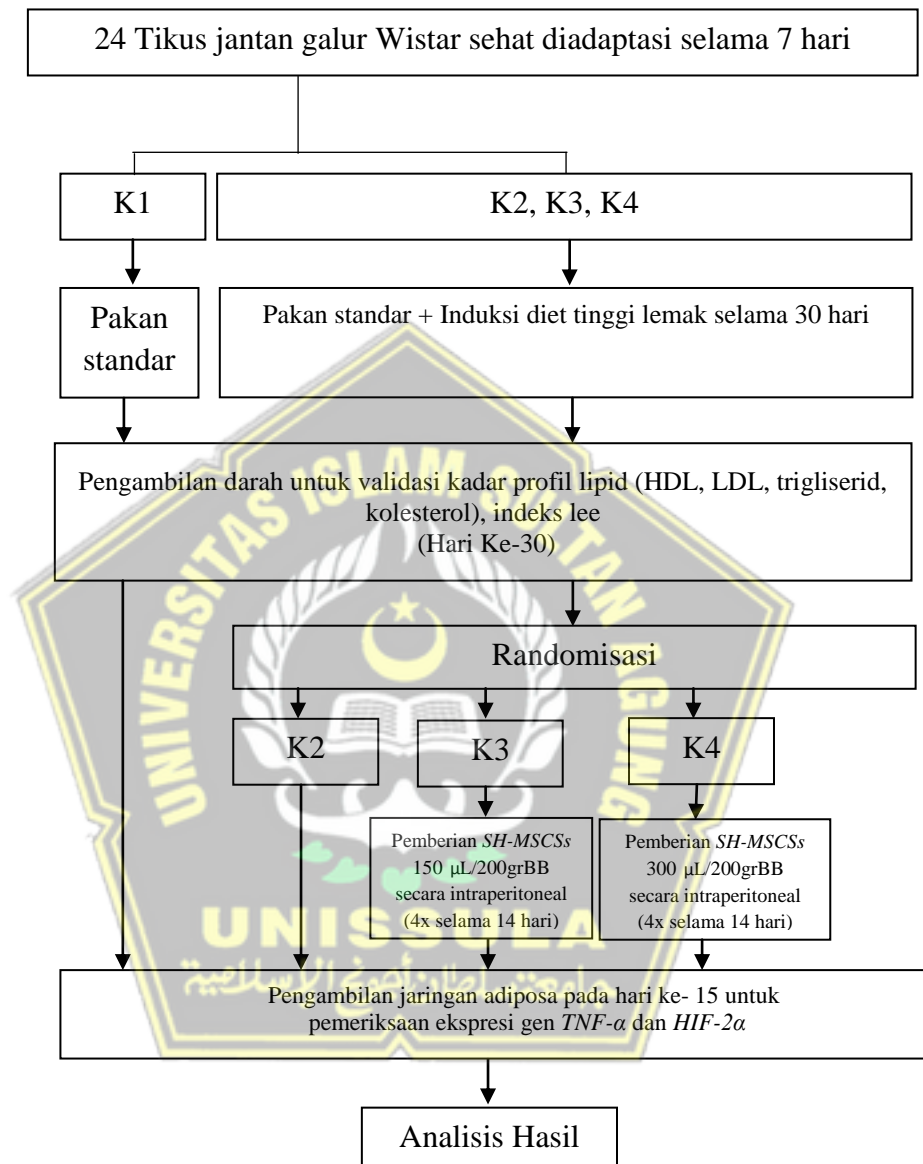
Tabel 4.5. Sekuens Primer

Primer	Sekuens	Suhu Annealing
<i>TNF-α</i>	F: 5'-GCCCTACGGGTCATTGAGAG-3'	59 ⁰ C
	R: 5'-GAGAGACGACAGACGCAGAC-3'	
<i>HIF-2α</i>	F: 5'-GGCAGATCTAACACGCCTTG-3'	58 ⁰ C
	R: 5'-GAGAGACGACAGACGCAGAC-3'	
β -actin	F: 5'-GCCTTCCTTCCTGGGTATG-3'	58 ⁰ C
	R: 5'-AGGAGCCAGGGCAGTAATC-3'	

Catatan: Sebelum dimasukkan ke *RT-PCR* dilakukan optimasi suhu *annealing* untuk setiap gen.

Hasil nilai C_q *RT-PCR* produk kemudian dianalisis menggunakan *RT-PCR Illumina*. Peningkatan ekspresi gen di analisis dalam ratio peningkatan terhadap gen *housekeeping* dengan menggunakan *software EcoStudy*.⁹²

4.10. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.11. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dilakukan, untuk data yang mempunyai skala rasio yaitu ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's Test*. Sebaran data normal ($p \geq 0,05$) ditunjukkan pada data *TNF- α* dan *HIF-2 α* . Varian data *TNF- α* adalah homogen ($p \geq 0,05$) dan varian data *HIF-2 α* . tidak homogen ($p \leq 0,05$), maka selanjutnya dilakukan uji beda parametrik *one-way* ANOVA. Hasil uji beda menunjukkan kedua data memiliki perbedaan yang signifikan ($p \leq 0,05$), sehingga *TNF- α* diuji lanjut dengan *post hoc LSD (Least Significance Different)*, sedangkan *HIF-2 α* diuji lanjut dengan *pos hoc Tamhane's T2* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Keputusan menolak atau menerima hipotesis berdasarkan ($p \leq 0,05$). Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi SPSS 23.0.

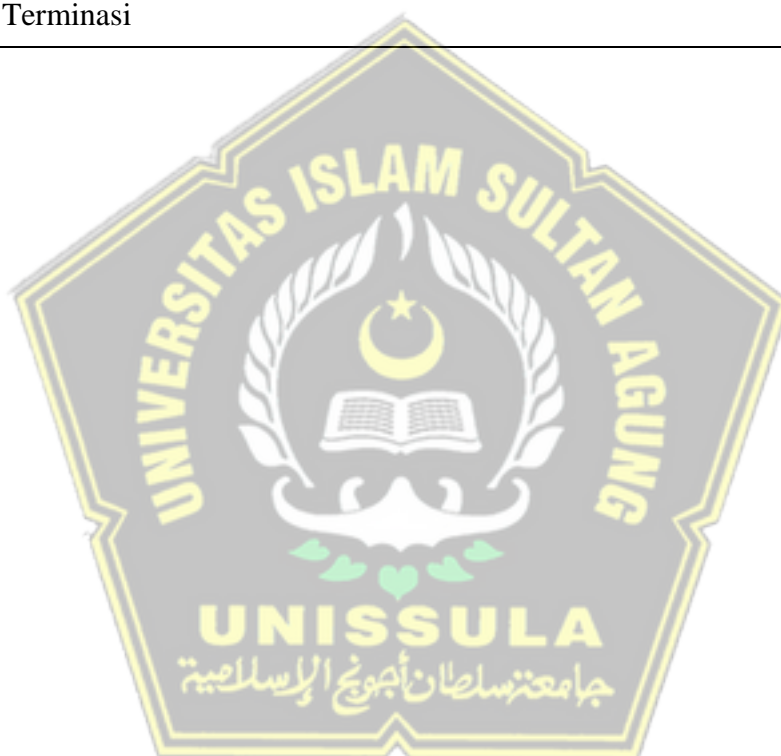
4.12. Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan nomor sertifikat : **74/II/2024/Komisi Bioetik**.

4.13. Jadwal Penelitian

Tabel 4.6. Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Januari 2024				Februari 2024			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
1.	Aklimatisasi Hewan Coba	■							
2.	Induksi Pakan Tinggi Lemak		■	■	■	■			
3.	Validasi					■			
4.	Pemberian Perlakuan						■	■	
5.	Terminasi								■



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

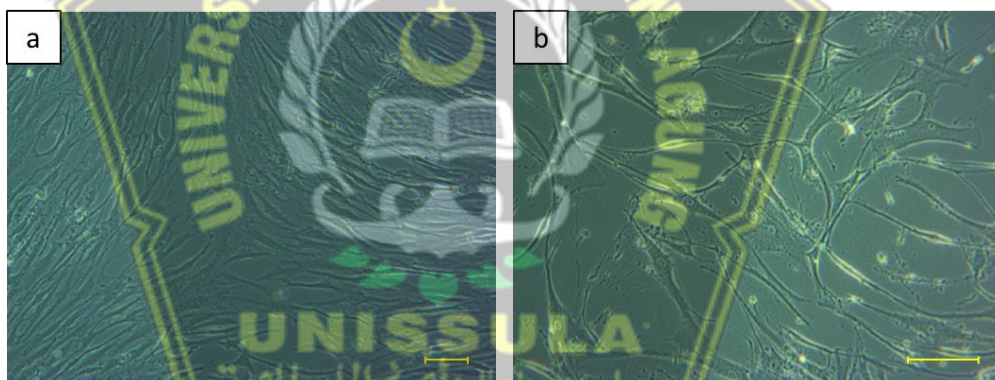
Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian *SH-MSCSS* terhadap ekspresi gen *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* dan *Hypoxia Inducible Factor (HIF)-2 α* pada tikus jantan galur Wistar model sindrom metabolik. Penelitian ini merupakan penelitian *Eksperimental In Vivo* yang dilakukan pada bulan Januari 2024 bertempat di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Semarang. Subyek penelitian menggunakan tikus jantan galur Wistar sehat serta yang tervalidasi memiliki sindrom metabolik, dengan total 24 tikus yang dipilih sesuai dengan kriteria WHO. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi empat kelompok: K1 (tikus sehat), K2 (tikus sakit dengan perlakuan NaCl), K3 (tikus sakit dengan pemberian *SH-MSCSS* dosis 150 μ L/200 grBB), dan K4 (tikus sakit dengan pemberian *SH-MSCSS* dosis 300 μ L/200 grBB).

MSC (Mesenchymal Stem Cells) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh melalui isolasi dari tali pusat (*umbilical cord*) tikus Wistar betina bunting dengan usia kehamilan 19 hari. Validasi *MSC* dilakukan dengan menggunakan teknik pewarnaan *Oil Red O* dan *Alizarin Red* untuk menilai kemampuan differensiasi adipogenik dan osteogenik. Validasi juga melibatkan penggunaan *flow cytometry* dan pengamatan mikroskop inverted untuk menganalisis *surface marker* dan morfologi sel. Setelah sel berhasil divalidasi, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan kondisi hypoxia 5% oksigen dan suhu 37°C. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan difiltrasi menggunakan metode *Tangential Flow Filtration (TFF)* untuk mendapatkan *SH-MSCSS*.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Karakterisasi *Mesenchymal Stem Cells*

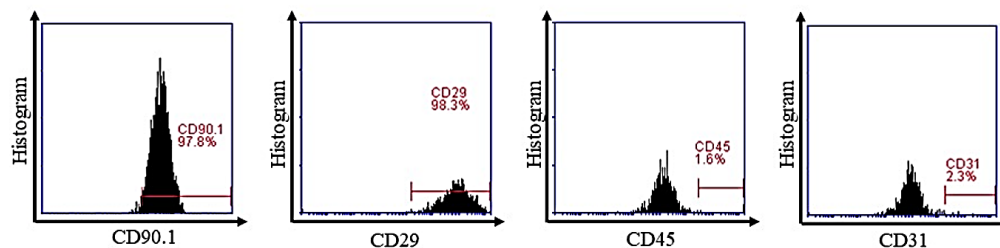
MSC diisolasi dari umbilical cord tikus Wistar betina bunting dengan usia kehamilan 19 hari dan dikultur hingga mencapai passage ke-5. Validasi kultur *MSC* dilakukan berdasarkan karakter morfologi, ekspresi *surface marker* dan kemampuan differensiasinya. Berdasarkan pengamatan mikroskop, morfologi sel kultur hasil isolasi memiliki bentuk lonjong, panjang, inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol yang menyerupai fibroblast dan melekat pada dasar flask plastik (*plastic adherent*) (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Karakter morfologi sel hasil Isolasi. Morfologi sel hasil Isolasi memiliki karakter seperti *MSC* yaitu berbentuk bulat lonjong inti sel satu dan bulat, memiliki serat-serat yang menonjol (*fibroblas-like*) dengan perbesaran mikroskop 100x (a) dan perbesaran 200x (b). Scale bar: 50 μ m.

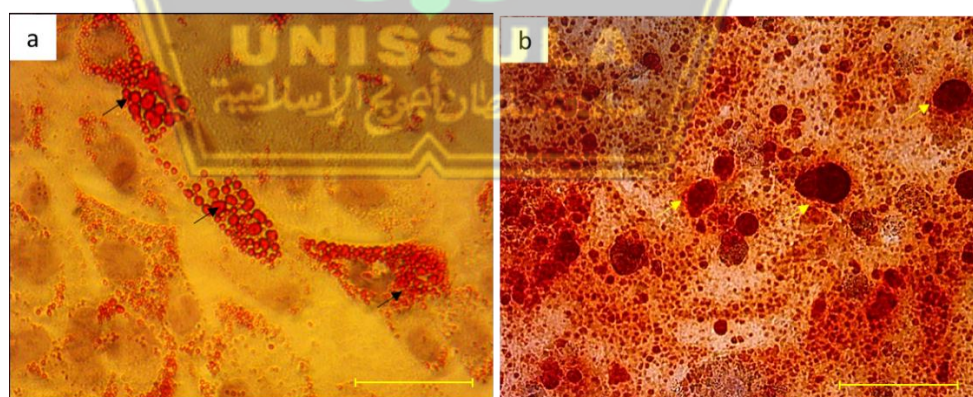
Ekspresi protein permukaan sel (*surface marker*) *MSC* dilakukan menggunakan *flow cytometry* dengan antibodi CD90.1, CD29, CD45 dan CD31. Hasil analisis mengindikasikan bahwa sel kultur hasil isolasi mampu mengekspresikan CD90.1 sebesar 97,8%, CD29 sebanyak

98,3%, dan mengekspresikan CD45 sebanyak 1,6% serta CD31 sebanyak 2,3% (Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Hasil analisis flowcytometry sel hasil isolasi. Sel hasil Isolasi memiliki ekspresi CD90.1 dan CD29 yang tinggi serta ekspresi CD45 dan CD31 yang rendah.

Kemampuan *MSC* dalam berdiferensiasi menjadi *adipocyte* dan *osteocyte* diamati dari hasil pewarnaan *Oil Red O* (pewarnaan lipid) dan *Alizarin red* (pewarnaan kalsium). Hasil menunjukkan bahwa sel kultur hasil isolasi mampu berdiferensiasi menjadi adiposit dan osteosit, yang dapat teridentifikasi melalui endapan lemak dan kalsium pada kultur adipogenik dan osteogenik masing-masing (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Kemampuan diferensiasi sel hasil isolasi. (a) Sel hasil Isolasi mampu berdiferensiasi menjadi *adipocyte* pada pengamatan pewarnaan *Oil Red dye* dan (b) berdiferensiasi menjadi *osteocyte* pada pengamatan pewarnaan *Alizarin red* pada pembesaran 100x. *Panah hitam: menunjukkan lipid droplet, panah kuning: menunjukkan deposisi kalsium. Scale bar: 50µm.

Berdasarkan karakter-karakter tersebut, sel kultur hasil isolasi dapat diindikasikan sebagai *mesenchymal stem cell (MSC)*. *MSC* selanjutnya diinkubasi dalam kondisi hypoxia (konsentrasi O₂ sebesar 5%) selama 24 jam, menggunakan hypoxic chamber. Medium kultur yang dihasilkan dari inkubasi *MSC* hipoksia tersebut dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode TFF untuk menghasilkan *SH-MSCS*.

5.1.2. Kadar *SH-MSCs*

SH-MSCSs diisolasi dari medium kultur *MSC* hipoksia menggunakan metode TFF dengan *filter chip* ukuran 10 kDa dan 50 kDa. Fraksi ini mengandung interleukin-10 (IL-10) dan *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) dengan berat molekul masing-masing sekitar 18 kDa dan 25 kDa. Kandungan sitokin anti-inflamasi IL-10 dan TGF-β yang terdapat dalam *SH-MSCs* tersebut selanjutnya dikarakterisasi menggunakan uji *Enzyme-link Immunosorbent assay* (ELISA). Hasil ELISA *SH-MSCs* ditunjukkan pada Tabel 5.1. IL-10, yang merupakan monomer anti-inflamasi berukuran ~18 kDa, berfungsi secara dominan dalam proses imunosupresi dan dapat disekresikan oleh sel punca mesenkimal pada kondisi hipoksia. Sementara itu, TGF-β merupakan dimer *growth factor* berukuran 25 kDa yang memiliki peran dalam mencegah proses inflamasi agar tidak berlangsung lebih lama.

Tabel 5.1. Analisis kadar IL-10 dan TGF-β dalam *SH-MSCs*

Protein	Kadar ± SE (pg/mL)
IL-10	120.03 ± 11.89
TGF-β	733.44 ± 11.47

5.1.3. Validasi Tikus Sindrom Metabolik

Tikus model sindrom metabolik diberikan perlakuan diet lemak tinggi dengan komposisi pakan khusus untuk menginduksi sindrom metabolic selama 30 hari. Pada hari ke 31, tikus divalidasi telah mengalami sindrom metabolic dengan mengukur berat badan dan panjang *naso-anal* yang kemudian dihitung menggunakan rumus indeks Lee sebagai berikut:⁹³

$$\text{Lee Index} = \frac{\sqrt[3]{\text{Weight}}}{\text{NAL}} \times 1000$$

Keterangan :

Weight = bobot tikus (gram)

NAL = naso-anal length (cm)

Selanjutnya untuk kadar trigliserida, LDL, HDL, dan kolesterol serum darah diukur menggunakan metode spektrofotometri. Tikus telah dinyatakan mengalami sindrom metabolik adalah tikus yang memiliki nilai Indeks Lee > 300, Trigliserida, LDL, HDL dan kolesterol total. kemudian dirandomisasi menjadi tiga kelompok : K2, K3 dan K4.

Tabel 5.2. Validasi Biokimia serum darah Tikus Model Sindrom Metabolik

Parameter	Kelompok	
	Tikus Sehat \pm SD	Tikus Sindrom Metabolik \pm SD
Indeks Lee	273,98 \pm 4,82	305,06 \pm 3,50
Trigliserida	115,50 \pm 19,15 mg/dL	229,33 \pm 15,29 mg/dL
LDL	7,83 \pm 1,60 mg/dL	18,00 \pm 2,10 mg/dL
HDL	44,00 \pm 2,31 mg/dL	32,67 \pm 1,97 mg/dL
Kolesterol Total	56,60 \pm 0,57 mg/dL	103,93 \pm 1,03 mg/dL

5.1.4. Hasil Analisis Statistik

Ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* pada sampel jaringan adiposa diukur menggunakan metode qRT-PCR dan dihitung menggunakan rumus Livak untuk mendapatkan nilai *Relative quantification* (Rq). Hasil analisis menunjukkan bahwa *SH-MSCs* memiliki kemampuan signifikan dalam menurunkan ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* pada tikus sindrom metabolik, yang tergantung pada dosis pemberian. Tabel 5.3 menunjukkan hasil analisis data, dimana ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* pada kelompok K2 memiliki *fold change* tertinggi, sementara kelompok K4 menunjukkan *fold change* atau kelipatan tingkat ekspresi yang terendah. Dengan distribusi data dan varian ekspresi gen *TNF- α* yang normal ($p > 0.05$ dengan uji *Shapiro-Wilk*) dan homogen ($p > 0.05$ dengan *Lavene's test*), analisis statistik dilanjutkan menggunakan uji *One-Way ANOVA* dan *LSD Post Hoc*. Selanjutnya, data ekspresi gen *HIF-2 α* pada ke-empat kelompok menunjukkan distribusi yang normal tetapi tidak homogen, sebagaimana ditunjukkan oleh hasil uji *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$) dan *Levene's test* ($p < 0,05$), kemudian dianalisis menggunakan uji *One-way ANOVA* dan *Tamhane's T2 Pos Hoc*. Berdasarkan uji lanjut tersebut, yang menunjukkan adanya perbedaan rata-rata ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* yang signifikan antara masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.3. Hasil Analisis Statistik Ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α*

Ekspresi Gen	Kelompok				p-value
	K1	K2	K3	K4	
	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	
<i>TNF-α</i>	1,00 \pm 0,00	1,71 \pm 0,08	1,19 \pm 0,05	0,34 \pm 0,03	0,05* 0,106** 0,000***
<i>HIF-2α</i>	1,00 \pm 0,00	2,40 \pm 0,12	1,84 \pm 0,09	1,07 \pm 0,05	0,05* 0,009 0,000***

Keterangan :

*Uji *Saphiro Wilk* ($p > 0,05 = \text{normal}$)

** *Levene's Test* ($p > 0,05$

= homogen)

*** *One Way ANOVA* ($p < 0,05 = \text{ada beda makna}$)

Tabel 5.4. Hasil Uji Lanjut LSD dan Tamhane T2 Ekspresi gen *TNF- α* dan *HIF-2 α*

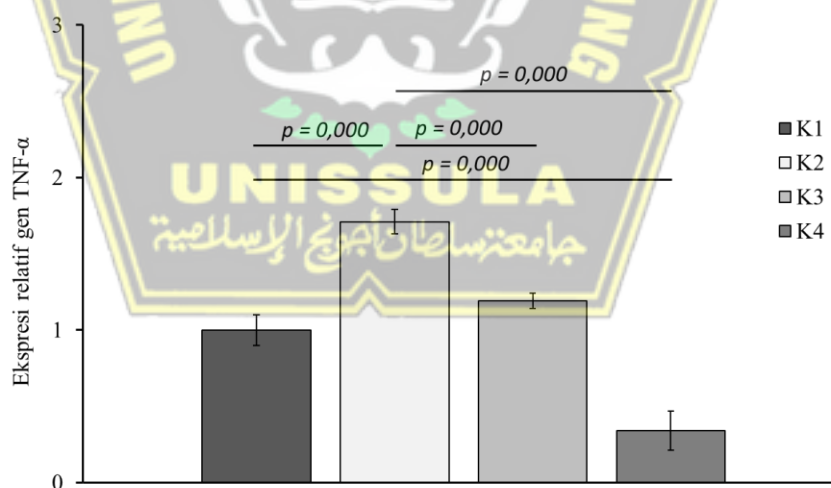
Parameter	Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
				Batas Bawah	Batas Atas
<i>TNF-α</i> (Uji Lanjut LSD)	K1	K2*	0,000	-0,7416	-0,6284
		K3*	0,000	-0,2149	-0,1018
		K4*	0,000	0,6268	0,7399
	K2	K3*	0,000	0,4701	0,5832
		K4*	0,000	1,3118	1,4249
		K3	0,000	0,7851	0,8982
<i>HIF-2α</i> (Uji Lanjut Tamhane T2)	K1	K2*	0,000	-1,5892	-1,1908
		K3*	0,000	-0,9967	-0,6733
		K4	0,215	-0,1500	0,0300
	K2	K3*	0,000	0,3527	0,7573
		K4*	0,000	1,1405	1,5195
		K3	0,000	0,6204	0,9296

Keterangan : *) menunjukkan kelompok yang berbeda signifikan. K1: tikus sehat, K2: tikus sakit dengan perlakuan 300 uL NaCl, K3: tikus sakit dengan pemberian *SH-MSCs* dosis 150 uL/200 grBB, K4: tikus sakit dengan pemberian *SH-MSCs* dosis 300 uL/200 grBB.

5.1.5. Efek Pemberian *SH-MSCs* pada Ekspresi Gen *TNF- α*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *SH-MSCs* memiliki kemampuan untuk menghambat ekspresi *TNF- α* pada tikus sindrom

metabolik. Berdasarkan informasi pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.4, terungkap bahwa rerata ekspresi gen *TNF- α* pada kelompok K2, yang menderita sindrom metabolik, mengalami peningkatan yang signifikan sebesar 1,71 kali lipat dibandingkan dengan K1, yang merupakan kelompok kontrol sehat ($P < 0,05$). Selanjutnya, setelah pemberian *SH-MSCs* pada dosis 150 μ L (K3) dan 300 μ L (K4), terlihat penurunan yang signifikan dalam ekspresi gen *TNF- α* secara berturut-turut, menjadi 1,19 dan 0,34 jika dibandingkan dengan K2 ($p < 0,05$). Selain itu, penurunan ekspresi gen *TNF- α* pada K4 juga menunjukkan perbedaan signifikan dengan K3 ($p < 0,05$). Temuan ini menggambarkan bahwa semakin tinggi dosis *SH-MSCs* yang diberikan, semakin menurun pula ekspresi gen *TNF- α* .

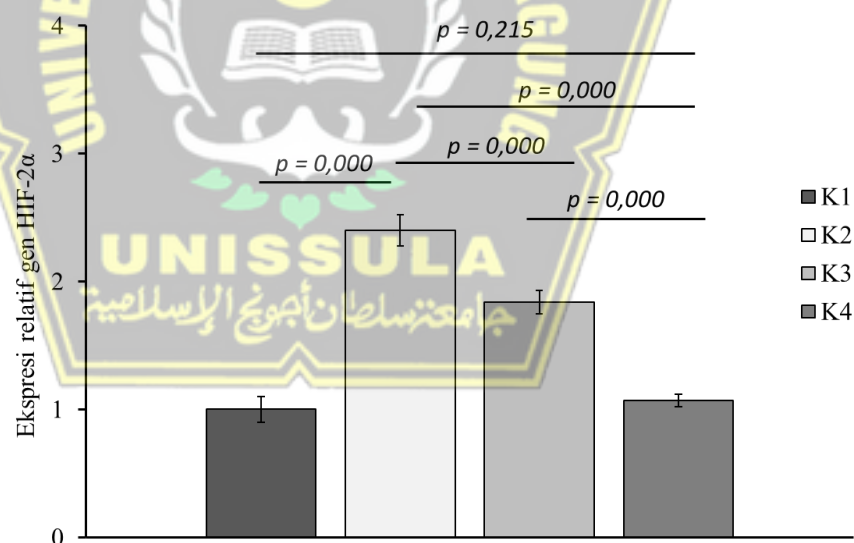


Gambar 5.4. Ekspresi gen *TNF- α* pada jaringan adiposa tikus sindrom metabolik pada semua kelompok.

5.1.6. Efek Pemberian *SH-MSCs* pada Ekspresi *HIF-2 α*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *SH-MSCs* mampu menurunkan ekspresi *HIF-2 α* . Berdasarkan analisis data pada Tabel

5.4 dan Gambar 5.5 rerata ekspresi gen *HIF-2 α* pada kelompok K2, yang mengalami sindrom metabolik, mengalami peningkatan yang signifikan sebesar 2,4 kali lipat dibandingkan dengan K1, kelompok kontrol yang sehat ($P < 0,05$). Selanjutnya, setelah pemberian *SH-MSCs* pada dosis 150 μ L (K3) dan 300 μ L (K4), terlihat penurunan yang signifikan dalam ekspresi gen *HIF-2 α* secara berturut-turut, menjadi 1,84 dan 1,07 jika dibandingkan dengan K2 ($P < 0,05$). Selain itu, ekspresi *HIF-2 α* pada K3 dan K4 juga menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa semakin tinggi dosis *SH-MSCs* yang diadministrasikan, ekspresi gen *HIF-2 α* semakin menurun.



Gambar 5.5. Ekspresi gen *HIF-2 α* pada jaringan adiposa tikus sindrom metabolik pada semua kelompok. *) $p < 0.05$.

5.2. Pembahasan

5.2.1. Efek *SH-MSCs* pada Ekspresi Gen *TNF- α* Pada Jaringan Adiposa Tikus Sindrom Metabolik

Upregulasi ekspresi gen *TNF- α* dalam Sindrom Metabolik menandakan peningkatan aktivitas transkripsi dan produksi molekul *TNF- α* pada jaringan adiposa. Sindrom Metabolik, yang ditandai dengan sejumlah faktor risiko kardiovaskular dan ketidakseimbangan metabolik akibat manifestasi dari kondisi inflamasi kronis^{6,94}. *TNF- α* , sebagai mediator inflamasi utama dan molekul penting yang berperan dalam respon inflamasi, dapat memicu serangkaian respons proinflamasi yang bersifat sistemik dengan cara mengaktifkan jalur inflamasi, merangsang produksi molekul proinflamasi lainnya, dan menyebabkan disfungsi jaringan, khususnya jaringan adiposa yang sering terkait dengan komplikasi metabolik^{45,82,95}. Hal ini sesuai dengan data pada gambar 5.4. yang menunjukkan bahwa ekspresi gen *TNF- α* pada tikus sindrom metabolik yang diinduksi diet tinggi kalori lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sehat.

Penurunan ekspresi gen *TNF- α* pada kelompok K3 dan K4 diduga akibat dari peran *SH-MSCs* yang mampu menekan jalur inflamasi *NF- κ B*. Ekspresi gen *TNF- α* diatur oleh rangkaian peristiwa molekuler yang melibatkan berbagai protein, terutama diatur oleh jalur inflamasi *NF- κ B*⁹⁶. Ikatan antara *TNF- α* dan TNFR1 dapat memicu pembentukan kompleks pensinyalan yang berbeda,

disebut sebagai kompleks I, IIa, IIb, dan IIc, yang menghasilkan respons seluler yang berbeda³⁸. Selama aktivasi kompleks I, TNFR1 yang teraktivasi berikatan dengan TRADD, diikuti oleh asosiasi dan interaksi berbagai komponen, termasuk Reseptor-Interacting Serine / Threonine-Protein Kinase 1 (RIPK1), TNFR-associated factor 2 atau 5 (TRAF2/5), *cellular-Inhibitor Apoptosis Protein* 1 atau 2 (cIAP1/2), dan *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex* (LUBAC)³⁹. Jalur pensinyalan ini menghasilkan aktivasi *NF-κB*, dimana faktor transkripsi ini selanjutnya bertranslokasi ke dalam inti sel untuk menginduksi proses transkripsi beberapa gen terkait pro-inflamasi, terutama *TNF-α*⁹⁷.

SH-MSCs yang mampu menekan ekspresi *TNF-α* diduga karena kandungan molekul anti-inflamasinya, terutama IL-10 dan TGF-β, seperti yang ditampilkan pada Tabel 5.1. IL-10 yang berikatan dengan IL-10R akan mengaktivasi JAK 1 sehingga menginduksi fosforilasi STAT3. Protein STAT3 akan masuk ke *nucleus* dan mengaktivasi sekuens mRNA *SOSC3* (*Suppressor of cytokine signaling 3*) yang kemudian akan diekspresikan secara intraseluler dan dapat menekan jalur pensinyalan proinflamasi, yaitu *NF-κB*⁹⁸. Penekanan pada jalur *NF-κB* akan menyebabkan penurunan ekspresi dan sekresi sitokin pro-inflamasi diantaranya adalah *TNF-α* dan IL-18.^{98,99}

5.2.2. Efek *SH-MSCS* pada Ekspresi Gen *HIF-2 α* Pada Jaringan Adiposa Tikus Sindrom Metabolik

Peningkatan ekspresi gen *HIF-2 α* pada kondisi sindrom metabolik menunjukkan adanya peningkatan aktivitas transkripsi dan produksi molekul *HIF-2 α* pada jaringan adiposa. *HIF-2 α* merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam respons sel terhadap kondisi hipoksia atau kekurangan oksigen⁵⁰. Peningkatan ekspresi gen *HIF-2 α* pada sindrom metabolik dimungkinkan terkait dengan kondisi hipoksia atau tekanan oksidatif pada jaringan adiposa tikus sindrom metabolik¹⁰. Peningkatan proliferasi dan akumulasi lemak pada jaringan adiposa sindrom metabolik dapat menyebabkan kebutuhan oksigen meningkat⁷⁵. Selain itu, adiposit yang berkembang secara cepat dan berlebihan dapat menyebabkan dysregulasi vaskularisasi, mengakibatkan distribusi oksigen yang tidak merata di dalam jaringan adiposa¹⁰⁰. Kondisi ini akan memicu mikrohipoksia di dalam jaringan adiposa¹⁰¹. Hal ini sesuai dengan data pada gambar 5.4. yang menunjukkan bahwa ekspresi gen *HIF-2 α* pada tikus sindrom metabolik yang diinduksi diet tinggi kalori mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok sehat.

Penghambatan ekspresi *HIF-2 α* oleh *SH-MSCS* diduga karena kandungan molekul anti-inflamasinya, terutama IL-10 dan TGF- β , melalui jalur *NF- κ B* dan SMAD. Inaktivasi faktor transkripsi

tersebut, akan menghambat transkripsi gen *c-Myc* (*cellular Myelocytomatosis oncogene*), yang merupakan faktor transkripsi untuk gen *HIF-2 α* ¹⁰². Protein *c-Myc* dapat mengatur ekspresi gen *HIF-2 α* baik secara langsung berikatan dengan sekuens promotor gen *HIF-2 α* atau secara tidak langsung melalui jalur AMP-activated protein kinase (AMPK)^{69,103}. Selain itu, TGF- β dari *SH-MSCS* akan berikatan dengan TGF β untuk mengaktivasi kompleks SMAD2/3 yang selanjutnya memfosforilasi SMAD4 untuk translokasi ke dalam inti sel sebagai faktor transkripsi. SMAD4 secara langsung akan berikatan pada promotor gen *c-Myc* sebagai *repressor*⁸⁶. Penurunan ekspresi *c-Myc* selanjutnya berkorelasi dengan ekspresi gen yang diatur, terutama *HIF-2 α* .

Keterbatasan pada penelitian ini mencakup beberapa aspek yang perlu diperhatikan untuk pemahaman yang lebih komprehensif terkait dampak pemberian *SH-MSCSs* pada tikus sindrom metabolik. Pertama, belum dilakukan pemeriksaan ekspresi *SOSC3* dalam konteks penghambatan jalur inflamasi *NF- κ B* setelah terapi dengan *SH-MSCSs*. Meskipun penelitian ini telah memberikan wawasan tentang efek penghambatan inflamasi pada tingkat gen *TNF- α* dan *HIF-2 α* , pengkajian khusus terhadap peran *SOSC3* dalam modulasi jalur *NF- κ B* dapat menjadi tambahan yang esensial.

Selanjutnya, penelitian ini belum menginvestigasi ekspresi *c-Myc* yang mungkin terlibat dalam regulasi ekspresi gen *HIF-2 α*

setelah pemberian *SH-MSCSs* pada tikus sindrom metabolik. Pengungkapan *c-Myc* dalam konteks ini dapat memberikan pencerahan lebih lanjut mengenai mekanisme molekuler yang mungkin terlibat dalam respons terapeutik *SH-MSCSs*. Pemahaman lebih lanjut tentang interaksi antara *c-Myc* dan *HIF-2 α* akan menjadi nilai tambah dalam melihat peran faktor-faktor tersebut dalam konteks sindrom metabolik. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang dapat memperkuat mekanisme aksi terapi *SH-MSCs* pada sindrom metabolik.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan :

1. Ekspresi gen *TNF- α* pada adiposa tikus sindrom metabolik pasca pemberian *SH-MSCSs* dosis 150 μ L dan 300 μ L lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol.
2. Ekspresi gen *HIF-2 α* pada adiposa tikus sindrom metabolik pasca pemberian *SH-MSCSs* dosis 150 μ L dan 300 μ L lebih rendah dibandingkan daripada kelompok kontrol.

6.2. Saran

Saran dari penelitian ini antara lain:

1. Perlu dilakukan pemeriksaan terhadap ekspresi *SOSC3* setelah pemberian *SH-MSCSs* pada tikus sindrom metabolik.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan terhadap ekspresi *c-Myc* setelah pemberian *SH-MSCSs* pada tikus sindrom metabolik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Herningtyas EH. Prevalence and distribution of metabolic syndrome and its components among provinces and ethnic groups in Indonesia. Published online 2019:1-12.
2. Vishvanath L, Gupta RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *J Clin Invest.* 2019;129(10):4022-4031. doi:10.1172/JCI129191
3. Ormazabal V, Nova-Lampeti E, Rojas D, et al. Secretome from Human *Mesenchymal Stem Cells*-Derived Endothelial Cells Promotes Wound Healing in a Type-2 Diabetes Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):1-13. doi:10.3390/ijms23020941
4. Fahed G, Aoun L, Zerdan MB, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 786. 2022;23(2):786. doi:10.3390/IJMS23020786
5. Leung WKC, Yu AP, Lai CWK, Siu PM. Association of markers of proinflammatory phenotype and beige adipogenesis with metabolic syndrome in Chinese centrally obese adults. *J Diabetes Res.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/8956509
6. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277-287. doi:10.1007/S11154-014-9301-0/METRICS
7. Ferreira-Hermosillo A, Molina-Ayala M, Ramírez-Rentería C, et al. Inflammatory cytokine profile associated with metabolic syndrome in adult patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Res.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/972073
8. Martinez VG, Ontoria-Oviedo I, Ricardo CP, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental *Mesenchymal Stem Cells.* *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1-12. doi:10.1186/s13287-017-0659-2

9. Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab* 2021 310. 2021;3(10):1302-1312. doi:10.1038/s42255-021-00470-z
10. Hanna C, Hubchak SC, Liang X, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α and TGF- β signaling interact to promote normoxic glomerular fibrogenesis. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2013;305(9):1323-1331. doi:10.1152/ajprenal.00155.2013
11. Rodrigues KF, Yong WTL, Bhuiyan MSA, Siddiquee S, Shah MD, Venmathi Maran BA. Current Understanding on the Genetic Basis of Key Metabolic Disorders: A Review. *Biol* 2022, Vol 11, Page 1308. 2022;11(9):1308. doi:10.3390/BIOLOGY11091308
12. Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S, et al. Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-*Mesenchymal Stem Cells* in Indonesia. *F1000Research* 2021 10228. 2021;10:228. doi:10.12688/f1000research.51191.3
13. Lotfinia M, Lak S, Ghahhari NM, et al. 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. doi:10.18869/acadpub.ijb.21.1.24
14. Sunarto H, Trisnadi S, Putra A, Sa'dyah NAC, Tjipta A, Chodidjah C. The Role of Hypoxic *Mesenchymal Stem Cells* Conditioned Medium in Increasing Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) Levels and Collagen Synthesis to Accelerate Wound Healing. *Indones J Cancer Chemoprevention*. 2020;11(3):134. doi:10.14499/indonesianjcanchemoprev11iss3pp134-143
15. Wang HH, Lee DK, Liu M, Portincasa P, Wang DQH. Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2020;23(3):189. doi:10.5223/PGHN.2020.23.3.189
16. Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med*.

- 2021;42(3):199-214. doi:10.1055/A-1263-0898/ID/R8170-0018/BIB
17. Arozal W, Louisa M, Soetikno V. Selected Indonesian medicinal plants for the management of metabolic syndrome: Molecular basis and recent studies. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:520376. doi:10.3389/FCVM.2020.00082/BIBTEX
 18. Dobrowolski P, Prejbisz A, Kurylowicz A, et al. Metabolic syndrome a new definition and management guidelines. *Arch Med Sci.* 2022;18(5):1133-1156. doi:10.5114/aoms/152921
 19. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med.* 2016;26(4):364-373. doi:10.1016/J.TCM.2015.10.004
 20. Kim R, Song BW, Kim M, et al. Regulation of alternative macrophage activation by MSCs derived hypoxic conditioned medium, via the TGF- β 1/Smad3 pathway. *BMB Rep.* 2020;53(11):600. doi:10.5483/BMBREP.2020.53.11.177
 21. Bartaula-Brevik S, Bolstad AI, Mustafa K, O Pederson T. Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *Int J Stem Cell Res Ther.* 2017;4(1):3:045. doi:10.23937/2469-570x/1410045
 22. Sabry D, Mohamed A, Monir M, Ibrahim HA. The effect of Mesenchymal Stem Cells derived microvesicles on the treatment of experimental CCL4 induced liver fibrosis in rats. *Int J Stem Cells.* 2019;12(3):400-409. doi:10.15283/IJSC18143
 23. Putra A, Alif I, Hamra N, et al. MSC-released TGF- β regulate α -SMA expression of myofibroblast during wound healing. *J Stem Cells Regen Med.* 2020;16(2):73. doi:10.46582/JSRM.1602011
 24. Karimi M, Maghsoud Z, Halabian R. Effect of Preconditioned Mesenchymal Stem Cells with Nisin Prebiotic on the Expression of Wound Healing Factors Such as TGF- β 1, FGF-2, IL-1, IL-6, and IL-10. *Regen Eng Transl Med.* 2021;7(1):30-40. doi:10.1007/S40883-021-00194-2/FIGURES/6

25. Chang C, Yan J, Yao Z, Zhang C, Li X, Mao HQ. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Paracrine Signals and Their Delivery Strategies. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(7):2001689. doi:10.1002/ADHM.202001689
26. Shibabaw T, Molla MD, Teferi B, Ayelign B. Role of ifn and complements system: Innate immunity in sars-cov-2. *J Inflamm Res.* 2020;13:507-518. doi:10.2147/JIR.S267280
27. di Somma M, Vliora M, Grillo E, et al. Role of VEGFs in metabolic disorders. *Angiogenesis 2019 232.* 2019;23(2):119-130. doi:10.1007/S10456-019-09700-1
28. Gao W, He R, Ren J, et al. Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow *Mesenchymal Stem Cells* increases angiogenesis via the JNK/HIF-1 α pathway. *FEBS Open Bio.* 2021;11(5):1364-1373. doi:10.1002/2211-5463.13142
29. Isobe T, Aoyagi K, Koufuji K, et al. Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) expression in gastric cancer. *Int J Clin Oncol.* 2013;18(2):293-304. doi:10.1007/S10147-012-0378-8
30. Al-Azzawi B, McGuigan DH, Koivula FNM, et al. The Secretome of *Mesenchymal Stem Cells* Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. *Open Stem Cell J.* 2020;6(1):1-12. doi:10.2174/1876893802006010001
31. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The Role of *TNF- α* Induced *MSCs* on Suppressive Inflammation.pdf. 2018;6(10):1779-1783.
32. Astari L, Cahyono H, Widjajanto E. Correlation of Interleukin-10, Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) Levels with HbA1c in Pediatric Type 1 Diabetes Mellitus. *J Trop Life Sci.* 2017;7(3):286-292. doi:10.11594/jtls.07.03.15
33. Silveira BM, Ribeiro TO, Freitas RS, et al. Secretome from human adipose-derived *Mesenchymal Stem Cells* promotes blood vessel formation and pericyte coverage in experimental skin repair. *PLoS One.* 2022;17(12 December). doi:10.1371/journal.pone.0277863

34. 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;2:100069. doi:10.1016/J.CRP HAR.2021.100069
35. Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice. *Mol Biol.* 2019;53(5):653-664. doi:10.1134/S0026893319050121
36. Zulaikhah ST, Wahyuwibowo J, Suharto MN, Enggartiasto BH, Ortanto MIR, Pratama AA. Effect of Tender Coconut Water (TCW) on *TNF- α* , IL-1 and IL-6 in Streptozotocin (STZ) and Nicotinamid (NA) Induced Diabetic Rats. *Pharmacogn J.* 2021;13(2):500-505. doi:10.5530/pj.2021.13.63
37. Nugraha J. Macrophage Autophagy in Immune Response. *Indones J Clin Pathol Med Lab.* 2018;24(1):95. doi:10.24293/ijcpml.v24i1.1164
38. Lampropoulou IT, Stangou M, Sarafidis P, et al. *TNF- α* pathway and T-cell immunity are activated early during the development of diabetic nephropathy in Type II Diabetes Mellitus. *Clin Immunol.* 2020;215:108423. doi:10.1016/J.CLIM.2020.108423
39. Omote K, Gohda T, Murakoshi M, et al. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A(y) mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(11). doi:10.1152/AJPRENAL.00509.2013
40. Hu J, Liu X, Chi J, et al. Resveratrol Enhances Wound Healing in Type 1 Diabetes Mellitus by Promoting the Expression of Extracellular Vesicle-Carried MicroRNA-129 Derived from *Mesenchymal Stem Cells*. *J Proteome Res.* 2022;21(2):313-324. doi:10.1021/ACS.JPROTEOME.1C00248/SUPPL_FILE/PR1C00248_SI_001.PDF
41. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation : Impact on Stability ,. 2016;4(February):1-14. doi:10.3389/fcell.2016.00011

42. Lee DC, Choi H, Oh J-M, et al. Urban particulate matter regulates tight junction proteins by inducing oxidative stress via the Akt signal pathway in human nasal epithelial cells. Published online 2020. doi:10.1016/j.toxlet.2020.07.017
43. Hornsby PJ. Regulation of cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J Biol Chem.* 1980;255(9):4020-4027. doi:10.1016/S0021-9258(19)85626-0
44. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis.* 2017;22(3):357-368. doi:10.1007/s10495-016-1323-5
45. M M, E C, M N, et al. Pro-inflammatory M1/Th1 type immune network and increased expression of TSG-6 in the eutopic endometrium from women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;218:99-105. doi:10.1016/J.EJOGRB.2017.08.014
46. Bakshi HA, Quinn GA, Nasef MM, et al. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via *TNF- α* /NF-kB/VEGF Pathways. *Cells.* 2022;11(9):1-15. doi:10.3390/cells11091502
47. Li M, Xu J, Shi T, Yu H, Bi J, Chen G. Epigallocatechin-3-gallate augments therapeutic effects of *Mesenchymal Stem Cells* in skin wound healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(11):1115-1124. doi:10.1111/1440-1681.12652
48. Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes.* 2013;6(1):0-7. doi:10.1186/1756-0500-6-275
49. Lakshmanan J, Zhang B, Wright K, et al. Tender coconut water suppresses hepatic inflammation by activating AKT and JNK signaling pathways in an in vitro model of sepsis. *J Funct Foods.* 2020;64:103637. doi:10.1016/J.JFF.2019.103637

50. Tafani M, Sansone L, Limana F, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/3907147
51. Ahmad S, Akhter F, Shahab U, et al. Do all roads lead to the Rome? The glycation perspective! *Semin Cancer Biol.* 2018;49:9-19. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2017.10.012
52. Esser TU, Roshanbinfar K, Engel FB. Promoting vascularization for tissue engineering constructs: current strategies focusing on HIF-regulating scaffolds. *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19(2):105-118. doi:10.1080/14712598.2019.1561855
53. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, et al. *Mesenchymal Stem Cells* from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells.* 2019;12(2):218-226. doi:10.15283/ijsc18034
54. Scott S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Quality. *Bio-Techne.* Published online 2015:5-6.
55. View of Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of *Mesenchymal Stem Cells.* Accessed November 29, 2021. <https://univmed.unissula.org/ejurnal/index.php/medicina/article/view/715/565>
56. Mikłosz A, Nikitiuk BE, Chabowski A. Using adipose-derived *Mesenchymal Stem Cells* to fight the metabolic complications of obesity: Where do we stand? *Obes Rev.* 2022;23(5). doi:10.1111/OBR.13413
57. Putra A, Antari AD, Kustiyah AR, et al. *Mesenchymal Stem Cells* accelerate liver regeneration in acute liver failure animal model. *Biomed Res Ther.* 2018;5(11):2802-2810. doi:10.15419/bmrat.v5i11.498
58. Wynn A, Vacheron A, Zuber J, Solomon SS. Metformin Associated With Increased Survival in Type 2 Diabetes Patients With Pancreatic Cancer and Lymphoma. *Am J Med Sci.* 2019;358(3):200-203. doi:10.1016/J.AMJMS.2019.06.002

59. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, et al. Hypoxia-preconditioned *MSCs* have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(3):305-310. doi:10.3889/oamjms.2019.049
60. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;12(1):1-14. doi:10.1186/s12967-014-0260-8
61. Matsushita K. *Mesenchymal Stem Cells and Metabolic Syndrome: Current Understanding and Potential Clinical Implications.* Published online 2016. doi:10.1155/2016/2892840
62. Xiong M, Zhang Q, Hu W, et al. Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells: The Emerging Roles and Applications in Tissue Regeneration of Plastic and Cosmetic Surgery. *Front Cell Dev Biol.* 2020;0:931. doi:10.3389/FCELL.2020.574223
63. Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME. Molecular Sciences *Mesenchymal Stem Cells* Empowering Tendon Regenerative Therapies. Published online 2019. doi:10.3390/ijms20123002
64. Fu X, Chen Y, Xie FN, et al. *Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells and Bone Marrow.* Vol 21.; 2015. doi:10.1089/ten.tea.2013.0651
65. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(6):449-453. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2010.10.005
66. Preetha PP, Girija Devi V, Rajamohan T. Effects of coconut water on carbohydrate metabolism and pancreatic pathology of alloxan induced diabetic rats. *Eur J Integr Med.* 2013;5(3):234-240. doi:10.1016/J.EUJIM.2012.12.005
67. Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Dalamaga M. Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and

- Perspectives. *Curr Obes Rep.* 2019;8(3):317-332. doi:10.1007/S13679-019-00352-2/METRICS
68. Pant R, Fimal P, Shah VK, Alam A, Chattopadhyay S. Epigenetic Regulation of Adipogenesis in Development of Metabolic Syndrome. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:619888. doi:10.3389/FCELL.2020.619888/BIBTEX
69. Ahmad B, Serpell CJ, Fong IL, Wong EH. Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Front Mol Biosci.* 2020;7. doi:10.3389/FMOLB.2020.00076/FULL
70. Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell.* 2010;9(5):667-684. doi:10.1111/J.1474-9726.2010.00608.X
71. Han TS, Lean MEJ. Metabolic syndrome. *Medicine (Baltimore).* 2015;43(2):80-87. doi:10.1016/J.MPMED.2014.11.006
72. Ariq Nazar M, Cahyani D, Sari R, Putra A, Arfian N. Effect of High-Fat Diet on SOD2, GPx, NeuN and BDNF Expression on Frontal Lobe of Obese Rats. *Malaysian J Med Heal Sci.* 2021;17(4):162-165.
73. Tanaka M, Itoh H. Hypertension as a Metabolic Disorder and the Novel Role of the Gut. *Curr Hypertens Rep.* 2019;21(8):1-10. doi:10.1007/S11906-019-0964-5/FIGURES/2
74. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Diabetes and sexual dysfunction: Current perspectives. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2014;7:95-105. doi:10.2147/DMSO.S36455
75. Márquez V, Ballesteros G, Dobner T, González RA. Adipocyte commitment of 3T3-L1 cells is required to support human adenovirus 36 productive replication concurrent with altered lipid and glucose metabolism. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12. doi:10.3389/FCIMB.2022.1016200/FULL
76. Rahimi B, Panahi M, Saraygord-Afshari N, et al. The secretome of *Mesenchymal Stem Cells* and oxidative stress: challenges and opportunities in cell-free regenerative medicine. *Mol Biol Rep.* 2021;48(7):5607-5619. doi:10.1007/s11033-021-06360-7

77. Al Naem M, Bourebaba L, Kucharczyk K, Röcken M, Marycz K. Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders. *Stem Cell Rev Reports*. 2020;16(2):301-322. doi:10.1007/s12015-019-09932-0
78. Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med* 2019, Vol 8, Page 1025. 2019;8(7):1025. doi:10.3390/JCM8071025
79. Mrahleh M Al, Matar S, Jafar H, Wehaibi S, Aslam N, Awidi A. Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells Primed by Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ Modulate the Innate and Adaptive Immune Cells of Type 1 Diabetic Patients. *Front Immunol*. 2021;12:3906. doi:10.3389/FIMMU.2021.732549/BIBTEX
80. Trisnadi S, Muhar AM, Putra A, Kustiyah AR. Hypoxia-preconditioned Mesenchymal Stem Cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β inhibition. 2020;39(1):97-104. doi:10.18051/UnivMed.2020.v39.97-104
81. Hamra NF, Putra A, Tjipta A, Amalina ND, Nasihun T. Hypoxia Mesenchymal Stem Cells Accelerate Wound Closure Improvement by Controlling α -smooth Muscle actin Expression in the Full-thickness Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci*. 2021;9(A):35-41. doi:10.3889/oamjms.2021.5537
82. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 6008. 2019;20(23):6008. doi:10.3390/IJMS20236008
83. Fathy M, Okabe M, Eldien HMS, Yoshida T. AT-*MSCs* antifibrotic activity is improved by Eugenol through modulation of TGF- β /Smad signaling pathway in rats. *Molecules*. 2020;25(2):1-17. doi:10.3390/molecules25020348
84. Giacoppo S, Thangavelu SR, Diomede F, et al. Anti-inflammatory effects of hypoxia-preconditioned human periodontal ligament cell secretome in an experimental model of multiple sclerosis: a key role of IL-37. *FASEB J*.

- 2017;31(12):5592-5608. doi:10.1096/FJ.201700524R/-/DC1
85. Ristikj-Stomnaroska D, Risteska-Nejashmikj V, Papazova M. Role of Inflammation in the Pathogenesis of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(14):2267. doi:10.3889/OAMJMS.2019.646
 86. Kowalik TF. Smad about E2F: TGF β repression of *c-Myc* via a Smad3/E2F/p107 complex. *Mol Cell.* 2002;10(1):7-8. doi:10.1016/S1097-2765(02)00584-1
 87. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, et al. P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast.* 2013;22(S2). doi:10.1016/J.BREAST.2013.07.005
 88. Rianti N, Putra A, Subchan P. INTERNATIONAL JOURNAL OF The Effect of Secretome Hypoxia *Mesenchymal Stem Cells* on PDGF and IL-1b Gene Expression (Experimental Study on Wistar Rats Hyperglycemic Wound Models). 2023;6(12):5624-5636. doi:10.47191/ijmra/v6-i12-24
 89. Sari MI, Jusuf NK, Munir D, et al. The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis. *Biomedicines.* Published online 2023. doi:10.3390/biomedicines11082325
 90. Umi R. PENGARUH PEMBERIAN N-Acetyl cysteine (NAC) TERHADAP PROFIL LIPID DAN *TNF- α* (STUDI IN VIVO PADA TIKUS JANTAN GALUR WISTAR YANG DIBERI DIET TINGGI KOLESTEROL). Published online 2021.
 91. Ndukaku O, Emmanuel E, Mercy E, Caroline N. Evaluation of the Serum Liver Enzymes Markers, Lipid Profile and Kidney Function Parameters in Typhoid Patients. *Int J Trop Dis Heal.* 2015;8(2):79-89. doi:10.9734/ijtdh/2015/17322
 92. Santos TC, Oliveira MF, Papa PC, Dantzer V, Miglino MA. VEGF system expression by immunohistochemistry and real-time RT-PCR study on collared peccary placenta. *Theriogenology.* 2014;82(6):834-843. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.06.016

93. Kosnayani AS, Dharmana E, Hadisaputro S, Riwanto I. Pengaruh Kombinasi Metformin dan Ekstrak Air Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn .) terhadap Perbaikan Status Obesitas Tikus Sprague Dawley Jantan Effect Combination of Metformin and Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn .) Water Extract on the Improvement of O. Published online 2021:1-7. doi:10.20473/amnt.v5i1.2021.
94. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pr.* 2014;105(2):141-150. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006
95. Alzamil H. Elevated Serum *TNF- α* Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Associated with Glycemic Control and Insulin Resistance. *J Obes.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/5076858
96. Khalaf H, Jass J, Olsson PE. Differential cytokine regulation by *NF- κ B* and AP-1 in Jurkat T-cells. *BMC Immunol.* 2010;11:1-12. doi:10.1186/1471-2172-11-26
97. Li Z, Wei H, Deng L, Cong X, Chen X. Expression and secretion of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated *Mesenchymal Stem Cells*. *FEBS J.* 2010;277(18):3688-3698. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07770.x
98. Mühl H, Dhingra S, Booz GW, et al. IL-10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benzimidazole. *Front Immunol / www.frontiersin.org.* 2019;1:1267. doi:10.3389/fimmu.2019.01267
99. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-181. doi:10.1038/nri2711
100. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277-287. doi:10.1007/S11154-014-9301-0/METRICS
101. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(2):163-177. doi:10.1016/j.beem.2013.02.005

102. Kumar H, Choi DK. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/584758
103. Seong HA, Manoharan R, Ha H. Smad proteins differentially regulate obesity-induced glucose and lipid abnormalities and inflammation via class-specific control of AMPK-related kinase MPK38/MELK activity. *Cell Death Dis* 2018 95. 2018;9(5):1-13. doi:10.1038/s41419-018-0489-x

