

**PENGARUH PEMBERIAN AIR ALKALI DAN SECRETOME *HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHYDE DAN EKSPRESI GEN p65
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar
Model Diabetes Mellitus Tipe 2)**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Disusun Oleh:

**Irni Savitri Nasution
MBK2322010387**

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

HALAMAN PENGESAHAN**TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN AIR ALKALI DAN SECRETOME *HYPOXIA*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHYDE DAN EKSPRESI GEN p65
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar
Model Diabetes Mellitus Tipe 2)**

Disusun oleh :
Irni Savitri Nasution
MBK.2322010387

akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 21 Februari 2025
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

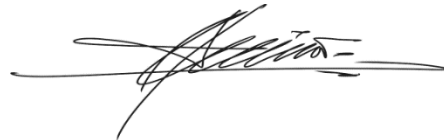
Menyetujui,

Pembimbing I



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

Pembimbing II



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

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Unissula



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

PERNYATAAN

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

Semarang, 21 Februari 2025
Yang menyatakan,



Irni Savitri Nasution

KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH PEMBERIAN AIR ALKALI DAN SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYDE DAN EKSPRESI GEN p65 (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Model Diabetes Mellitus Tipe 2).** Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S.2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan Tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H.,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
6. Ibu saya yang tercinta Hj. Nuraini Harahap dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa sehingga saya dapat menyelesaikan proposal tesis ini.
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. Aamiin yaa rabbal alamin.

Semarang, 21 Februari 2025
Penulis,

Irni Savitri Nasution

ABSTRAK

Latar Belakang: Diabetes Mellitus tipe 2 merupakan penyakit gangguan metabolisme kronis dengan karakteristik hiperglikemia yang disebabkan oleh resistensi insulin dan kerusakan sel β pankreas. Air alkali memiliki efek antioksidan yang dapat menurunkan stres oksidatif dan mengurangi proses inflamasi yang terjadi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian kombinasi secretome *hypoxia mesenchymal stem cells* (SMSCs) dan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus model DMT 2.

Metode: Penelitian eksperimental in vivo dengan desain penelitian *Post test Only Control Group Design*. Jumlah sampel 25 ekor tikus jantan wistar, dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok Sehat, kelompok K-, kelompok K+, kelompok P1 dan kelompok P2 serta diberikan perlakuan selama 21 hari. Hasil pengujian kadar MDA diuji menggunakan uji *Kruskall Wallis* dilanjutkan dengan uji *Post hoc Mann Whitney* dan ekspresi gen p65 diuji menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *Post hoc LSD*.

Hasil: Penelitian ini menunjukkan bahwa berhasil dilakukan induksi DMT2 pada tikus sehat. Hasil pengukuran kadar MDA terdapat perbedaan pada kelompok P2 dibanding K- sig.p=0,004 dan K+ p=0,037, beda kadar P1 dan K- menunjukkan perbedaan sig.p=0,004. Nilai rerata terendah untuk kadar MDA ditemukan pada kelompok P2 136,651±143,911. Ekspresi gen p65 mengalami penurunan pada kelompok P1 dan P2 dibandingkan dengan kontrol K- dan K+, dengan nilai rerata terendah pada kelompok P2 20,448±10,677 setelah diberikan perlakuan.

Kesimpulan: Pemberian kombinasi SMSCs dan Air Alkali berpengaruh dalam menurunkan Kadar MDA dan Ekspresi gen p65 pada tikus model DM tipe 2.

Kata Kunci: Air Alkali, Ekspresi gen p65, Hipoksia, Kadar MDA, Sekretom MSCs

ABSTRACT

Background: Type 2 Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by hyperglycemia caused by insulin resistance and pancreatic β -cells dysfunction. Alkaline water has antioxidant effects that can reduce oxidative stress and help mitigate the inflammatory process that occurs in DMT2. This study aims to evaluate the effect of combination of secretome hypoxia mesenchymal stem cells (SMSCs) and alkaline water on MDA levels and p65 gene expression in DMT2 model rats.

Method: Experimental in vivo study conducted using a post-test only control group design. The number of samples was 25 male Wistar rats, divided into five groups. Group Sh (healthy rats), group K-, group K+, group P1 and group P2 and given treatment for 21 days. The results of the MDA levels were analyzed using the Kruskal Wallis test followed by the post hoc Mann Whitney test and p65 gene expression was analyzed using the One Way Anova test followed by the post hoc LSD test.

Results: This study demonstrates the successful induction of DMT2 in healthy rats. The result of MDA levels in group P2 were significantly different compared to K- $p = 0.004$ and K+ $p = 0.037$, while a significant difference also observed between of P1 and K- $p = 0.004$. The lowest mean value for MDA levels was found in group P2 136.651 ± 143.911 . The expression of the p65 gene decreased in groups P1 and P2 compared to the K- and K+ controls, with the lowest mean value observed in group P2 20.448 ± 10.677 after treatment.

Conclusion: The combination of SMSCs and Alkaline Water effectively reduced MDA levels and p65 gene expression in type 2 DM model mice, indicating its potential to mitigate oxidative stress and inflammation in diabetes.

Keywords: Alkaline Water, Hypoxia, MDA levels, MSCs secretome, p65 gene expression

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian	4
1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II	8
TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. <i>Malondialdehyde</i> (MDA)	8
2.1.1. Definisi	8
2.1.2. Peran MDA pada DMT2	9
2.2. Gene Subunit p65	10
2.2.1. Definisi p65	10
2.2.2. Peran p65 pada DMT2	11
2.3. Air Alkali	12
2.3.1. Definisi	12
2.3.2. Peran Air Alkali sebagai Antioksidan	13
BAB III	20
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	20
3.1. Kerangka Teori	20
3.2. Kerangka Konsep	22
3.3. Hipotesis	22

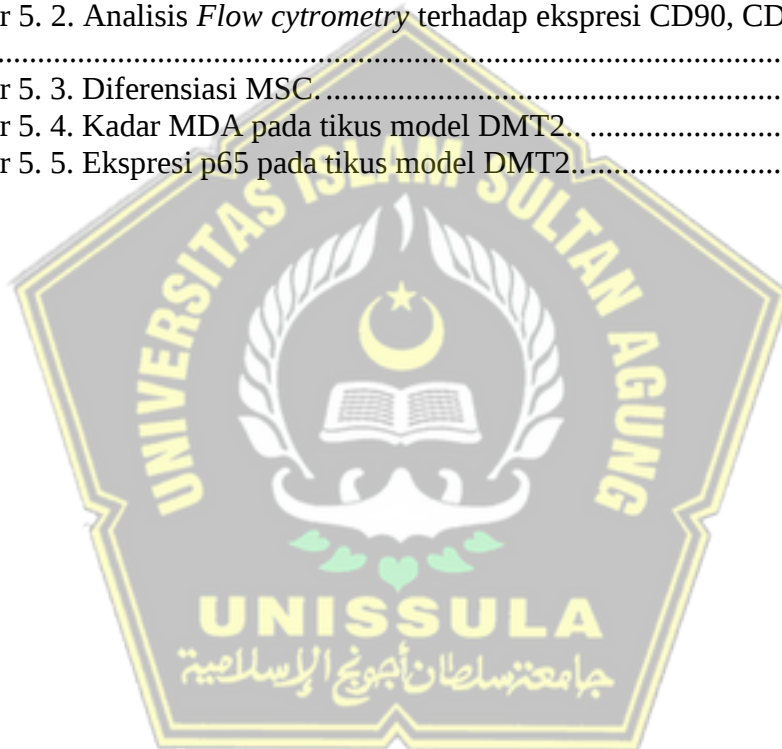
BAB IV	23
METODE PENELITIAN	23
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	23
4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	24
4.2.1. Variabel Penelitian	24
4.2.2. Definisi Operasional	25
4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	26
4.3.1. Subjek Penelitian	26
4.3.2. Sampel Penelitian	27
4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian	27
4.3.4. Besar Sampel	28
4.4. Alat dan Bahan	29
4.4.1. Alat	29
4.4.2. Bahan	30
4.5. Cara Penelitian	30
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	30
4.5.2. Pemeliharaan Hewan Coba	30
4.5.3. Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2	31
4.5.4. Perhitungan Resistensi Insulin (HOMA-IR)	31
4.5.5. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	31
4.5.6. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	32
4.5.7. Uji Differensiasi MSCs	34
4.5.8. Proses Hipoksia dan TFF	35
4.5.9. Validasi SMSCs	35
4.5.10. Perlakuan Hewan Coba	36
4.5.11. Pengambilan Sampel Darah Tikus	36
4.5.12. Pengambilan Sampel Jaringan	36
4.5.13. Analisis Kadar MDA dengan ELISA	36
4.5.14. Analisis Kuantitatif Ekspresi p65 menggunakan RT-PCR	37
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	38
4.7. Analisa Data	38
4.8. Alur Penelitian	39
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	41
5.1 Hasil Penelitian	42
5.1.1 Validasi Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2 dan Resistensi Insulin pada tikus Wistar	42
5.1.2. Isolasi Sekretom pada <i>Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>	443
5.1.3. Efek Pemberian SMSCs dan Air Alkali terhadap Kadar MDA pada Model Tikus DMT2	46
5.1.4. Efek Pemberian SMSCs dan Air Alkali terhadap Ekspresi p65 pada Model Tikus DMT2	49
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	49
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1 Kesimpulan	55

6.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56
LAMPIRAN.....	64
Lampiran 1. Ethical Clearence	64
Lampiran 2. Surat Keterangan Penelitian	69
Lampiran 3. Uji Statistik Kadar MDA	68
Lampiran 4. Uji Statistik Ekspresi Gen p65	71
Lampiran 5. Dokumentasi Kegiatan Penelitian	74
Lampiran 6. Uji Validasi GDP Tikus Model DMT2	75



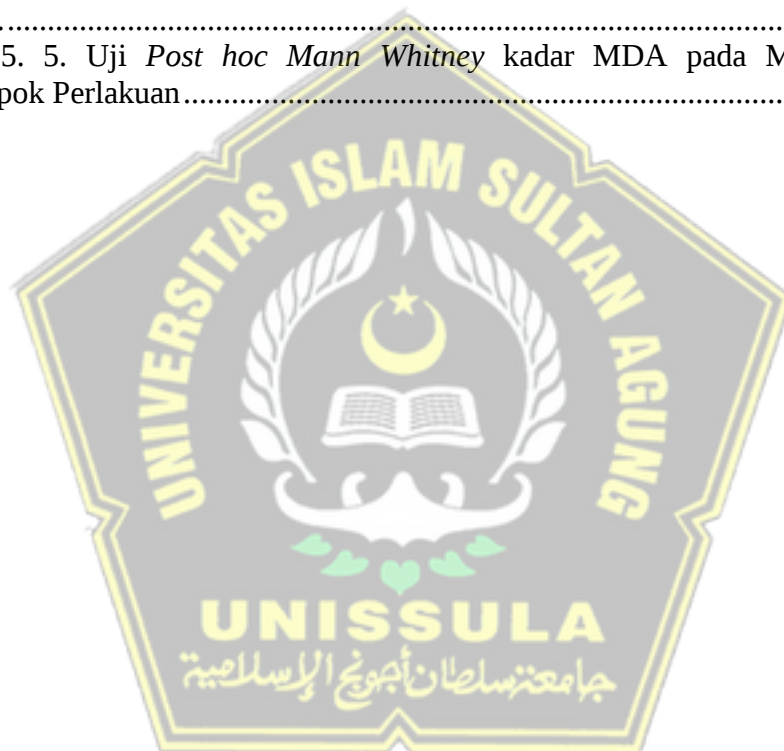
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Mekanisme stress oksidatif pada DMT2.....	10
Gambar 2. 2. Mekanisme aksi NF- κ B	12
Gambar 2. 3. Sumber mesenchymal stem cell (MSCs)	16
Gambar 2. 4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs.....	17
Gambar 2. 5. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS	18
Gambar 3. 1. Kerangka Teori.....	21
Gambar 3. 2. Kerangka Konsep	22
Gambar 4. 1. Skema Rancangan Penelitian	23
Gambar 4. 2. Alur Penelitian.....	40
Gambar 5. 1. Isolasi SPM dengan sel berbentuk spindle-like.....	43
Gambar 5. 2. Analisis <i>Flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31.	44
Gambar 5. 3. Diferensiasi MSC.....	45
Gambar 5. 4. Kadar MDA pada tikus model DMT2.. ..	48
Gambar 5. 5. Ekspresi p65 pada tikus model DMT2.....	49



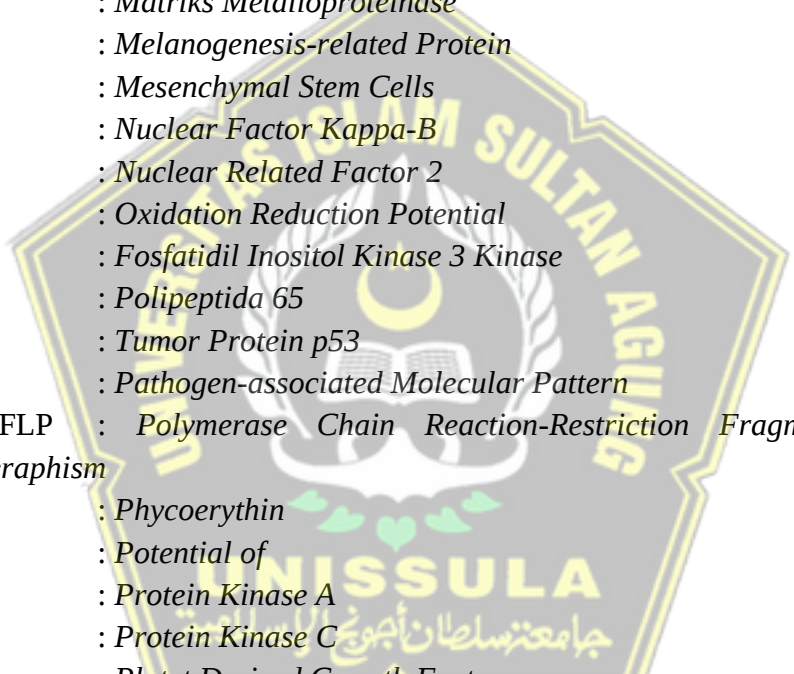
DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4. 1 . Reagen yang digunakan dalam flow cytometry	33
Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 4.2. Reagen yang digunakan dalam <i>Flow Cytometry</i>	32
Tabel 5. 1. Hasil validasi glukosa darah puasa tikus jantan galur Wistar pada kelompok induksi STZ dibandingkan dengan tikus sehat.....	42
Tabel 5. 2. Hasil validasi resitensi insulin pada tikus jantan galur Wistar pada kelompok induksi STZ dibandingkan dengan tikus sehat.....	43
Tabel 5. 3. Hasil validasi sekretom MSCs dalam kondisi hipoksia.	46
Tabel 5. 4. Data Hasil Penelitian Kadar MDA dan Ekspresi p65 pada Tikus Model DMT2.....	46
Tabel 5. 5. Uji <i>Post hoc Mann Whitney</i> kadar MDA pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan.....	47



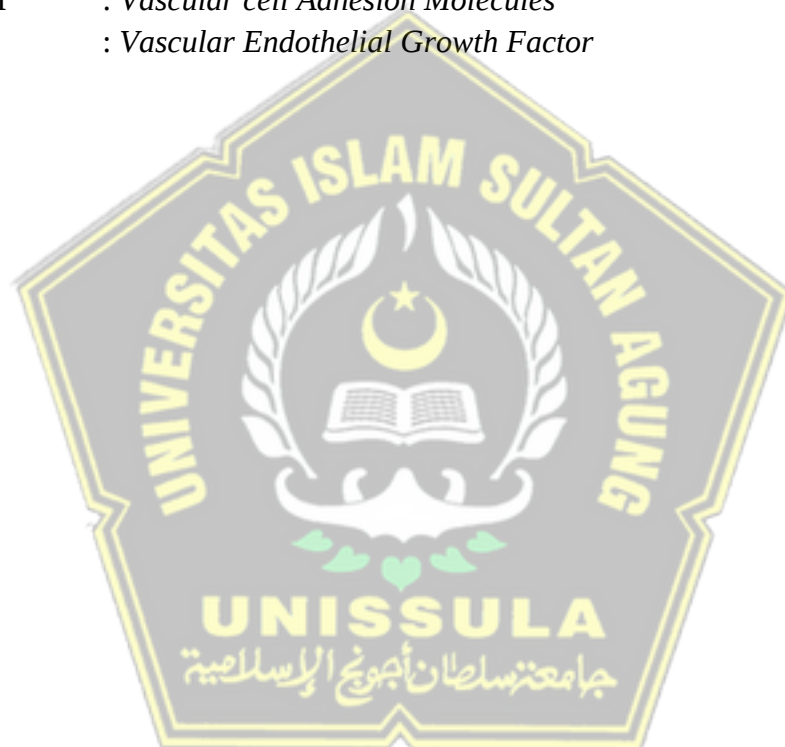
DAFTAR SINGKATAN

α – SMA	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AIW	: <i>Alkali ionized Water</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CCL2	: <i>CC Motif Chemokine Ligand 2</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	: <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase 2</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamenete Traacetic</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS	: <i>endothelial Nitric Oxide Ssynthase</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
EWARW	: <i>Electrolyzed Weakly Alkaline Reduced Water</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	: <i>Floureseein Isothiocyanate</i>
GAPDH	: <i>Gen Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte-Colony Stimulated Factor</i>
gDNA	: <i>Genomic Deoxcryribonucleic Acid</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
GM-CSF	: <i>Granulosit Macropagh Coloni Stimulation Factor</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HK-2	: <i>Heksokinase 2</i>
hMSC	: <i>human Mesenchymal Stem Cells</i>
HOMA-IR	: <i>Homeostatic Model Assessment of Insulin</i> \\\
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
IKK	: <i>IkB Kinase</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>



IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
JNK	: <i>The c-Jun N-terminal Kinase</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>
LSD	: <i>Least Significant Difference</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases v</i>
MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MEM	: <i>Minimum Essential Medium</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
Nrf2	: <i>Nuclear Related Factor 2</i>
ORP	: <i>Oxidation Reduction Potential</i>
PI3K	: <i>Fosfatidil Inositol Kinase 3 Kinase</i>
p65	: <i>Polipeptida 65</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PCR-RFLP	: <i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length</i>
Polymeraphism	
PE	: <i>Phycoerythin</i>
PH	: <i>Potential of</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
PDX-1	: <i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1)</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
SMSCs	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
SPM	: <i>Sel Punca Mesenkimal</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>

TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TFF	: <i>Trefoil Factor Family</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VCAM	: <i>Vascular cell Adhesion Molecules</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia kronis akibat resistensi insulin dan disfungsi sel beta pancreas.^{1,2} Kondisi hiperglikemia pada DMT2 dapat memicu peningkatan stress oksidatif dan inflamasi yang berperan dalam progresivitas komplikasi penyakit.² Penelitian terdahulu melaporkan bahwa status stress oksidatif ditandai dengan peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) sehingga menghambat enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) untuk melindungi sel dari stress oksidatif dengan mengeliminasi ROS melalui konversi anion menjadi hidrogen peroksida.^{3,4} Peningkatan kadar ROS juga berkaitan dengan aktivasi sel-sel imun adaptif melalui pelepasan sitokin proinflamasi seperti *interleukin-6* (IL-6), *interleukin-1* (IL-1), dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) yang diatur oleh nuclear factor kappa beta (NF- κ B) dengan subunit p65 dan p50 pada DMT2.⁵ Ekspresi gen p65 yang merupakan subunit dari faktor transkripsi NF- κ B berperan penting dalam regulasi respon inflamasi.⁶ Keberhasilan mengatur ekspresi sitokin-sitokin inflamasi dan menekan stress oksidatif dapat memperbaiki patogenesis DMT2.⁷

Pada tahun 2021, sekitar 537 juta orang dewasa (20-79 tahun) hidup dengan diabetes, atau 1 dari 10 orang dewasa.^{8,9} Diperkirakan jumlah ini akan meningkat menjadi 643 juta pada tahun 2030 dan 783 juta pada tahun 2045.¹⁰

Prevalensi global DMT2 diproyeksikan meningkat menjadi 7.079 individu per 100.000 pada tahun 2030, dengan lebih dari 95% orang dengan diabetes memiliki DMT2.¹¹ Di Indonesia, kasus DMT2 masih menduduki urutan pertama penyakit yang harus mendapatkan penanganan jangka panjang dengan 1 dari 11 orang dewasa hidup dengan DMT2. Faktor risiko yang terus meningkatkan kasus DMT2 antara lain obesitas, kurangnya aktivitas fisik, dan faktor genetik berkontribusi pada perkembangan DMT2.¹² Kasus *underdiagnosis* dan *misdiagnosis* menyebabkan penderitaan DMT2 harus menggunakan terapi insulin seumur hidup dengan berbagai komplikasi lain yang terjadi.¹³

Air alkali telah dilaporkan memiliki efek antioksidan yang dapat menurunkan stres oksidatif.^{14,15} Di sisi lain, secretome *hypoxia mesenchymal stem cells* (SMSCs) mengandung berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin yang berpotensi memiliki efek anti-inflamasi dan regeneratif.^{16,17} SMSCs yang dimodulasi dalam kondisi hipoksia telah terbukti mengandung kadar tinggi faktor-faktor terapeutik seperti GM-CSF, VEGF, IL-6, dan IGF-1.^{18,19} Secretom MSCs dapat memperbaiki mengurangi resistensi insulin dengan merangsang proliferasi dan angiogenesis melalui peningkatan fosforilasi Akt dan Erk.^{20,21} *Conditioned medium* MSCs dapat memperbaiki kondisi kerusakan endothel, inflamasi dan stress oksidatif pada tikus model *old diabetes* melalui penurunan kadar IL-6, TNF- α , ROS dan peningkatan eNOS.²² IL-10 yang dilepaskan MSCs dapat mendownregulasi produksi sitokin inflamasi pada DMT2.⁵ Kontrol inflamasi pada DMT2 ditandai

dengan penurunan kadar gula darah yang di regulasi oleh NF-kB salah satunya sub unit p65.²³ Meskipun demikian, pengaruh kombinasi air alkali dan secretome MSCs terhadap penanda stres oksidatif dan inflamasi pada DMT2 belum banyak diteliti.

Air alkali dapat meningkatkan pH cairan interstisial yang rendah pada kondisi diabetes mellitus. pH cairan interstisial yang rendah menyebabkan resistensi insulin dengan mengurangi afinitas pengikatan insulin ke reseptornya.^{24,25} Peningkatan pH cairan interstisial oleh air alkali dapat memperbaiki resistensi insulin. Air alkali juga terbukti mengandung antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas.²⁵ SMSCs yang berpotensi menekan inflamasi dan mengurangi stress oksidatif menjanjikan untuk dikombinasi dengan air alkali pada terapi DMT2. Penelitian terkait kemampuan penerapan SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali dalam proses penekanan stress oksidatif dengan menekan kadar MDA dan perbaikan inflamasi melalui regulasi p65 untuk mengembalikan sensitivitas insulin serta memperbaiki sel β pankreas pada DMT2 masih belum banyak dilakukan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengungkap peran SMSCs dengan dosis 500 μ L yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada model tikus DMT2.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2 ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh pemberian SMSCs pada dosis 500 μ l yang dikombinasi dengan air alkali 5 mL/hari terhadap kadar MDA pada tikus jantan galur wistar model DMT2.
- b. Membuktikan pengaruh pemberian SMSCs pada dosis 500 μ l yang dikombinasi dengan air alkali terhadap ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai peran pengaruh pemberian SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemanfaatan pemberian SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar

MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1. 1. Originalitas Penelitian

Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil
Kalil Alves de Lima, Gislane L. V. de Oliveira, Juliana Navarro Ueda Yaochite, Daiel Guariz Pinheiro, 2016 ²⁶	<i>Transcriptional profiling reveals intrinsic alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients</i>	Eksperimen tal, Studi Klinik	MSCs dari <i>bone marrow</i> meneregulasi molekul immunomodulatory seperti VCAM-1, CXCL 12, HGF, CCL2, serta mengaktivasi jalur JAKSTAT pada pasien DMT1.
Ping Nie, Xue Bai, Yan Lou, Yiexin Zhu, Shan Jiang, Lina Zhang, Na Tian, Ping Luo, Bing Li, 2021 ²⁷	<i>Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce oxidative damage and apoptosis in diabetic nephropathy by activating Nrf2</i>	<i>In Vitro</i> , Eksperiment al	Human MSCs menurunkan kadar gula darah pada model DMT2 yang diinduksi STZ dengan mekanisme mengaktivasi Nrf2 dan menurunkan MDA melalui <i>PI3K pathway</i>
Katarzyna Kornicka, jenny Houston, Krzysztof Marycz, 2018 ²⁸	<i>Dysfunction of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetic Patients as Result of Oxidative Stress and Autophagy may Limit Their Potential Therapeutic Use</i>	Eksprimen tal, Studi klinik	Pemberian MSCs dapat menurunkan produksi ROS pada pasien DMT2.

Songyan Yu, Yu Cheng, Linxi Zhang, Yaqi Yin, Jing Xue, Bing Li, Zhengyuan Gong, Jieqing Gao, Yiming Mu, 2019 ²⁹	<i>Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exert anti-diabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats</i>	In vivo, Eksperiment al	Pemberian MSCs menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6, IL1B, dan TNF-α serta meningkatkan ekspresi Il-10 pada tikus model DMT2.
Isabella Dias, Daphne Pinheiro, karina Ribeiro Silva, Ana Carolina Stumbo, Alessandra Thole, Erika Cortez, Lais de Carvalho, Simone Nunes Carvalho, 2021 ²³	<i>Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured two-dimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes</i>	In Vivo, Eksperiment al	<i>Conditioned medium</i> dari adipose tissue-derived stem cells terbukti menurunkan produksi insulin dan PDX-1 pada tikus model DMT1 di induksi streptozocin.
Agung Putra, Zakariya Hadi Suwiryo, Adi Muradi Muhar, Agus Widyatmoko, Fifin Luthfia Rahmi, 2021 ³⁰	<i>The Role of Mesenchymal Stem Cells in Regulating PDGF and VEGF during Pancreatic Islet Cells Regeneration in Diabetic Animal Model</i>	In Vivo, Eksperiment al	Pemberian MSCs menurunkan kadar gula darah tikus model diabetes melalui regulasi PDGF dan VEGF.
Satrio Adi Wicaksono, Dina Hisan Nabyla, Silistiyati bayu Utami, 2022 ³¹	<i>The effect of Alkaline Reduced Water Administration to the Fasting Blood Glucose Levels in Patientes with Type 2 Diabetes Mellitus</i>	Studi klinik, Eksperiment al	Pemberian alkaline reduced water (ARW) menurunkan kadar gula darah di bandingkan air mineral pada pasien DMT2

Penelitian sebelumnya menggunakan MSCs dari *bone marrow*

untuk meregulasi molekul immunomodulator seperti VCAM-1, CXCL 12, HGF, CCL2, serta mengaktivasi jalur JAKSTAT pada pasien DMT1.²⁶

Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan

SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus model DMT2. Penelitian lain juga menggunakan secretome MSCs tanpa prekondisi hipoksia dengan mengamati efek angiogenik pada sel *Zucker diabetic fatty rats (ZDF) diabetes type 2*.²⁷ Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus model DMT2. Penelitian tentang MSCs yang dapat terbukti menurunkan produksi ROS pada pasien DMT2.²⁸ Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus model DMT2. Penelitian pemberian MSCs dapat menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IL-6, IL-1B, dan TNF-a serta meningkatkan ekspresi IL-10 pada tikus model DMT2.²⁹ Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus model DMT2. Penelitian menggunakan *conditioned medium* dari *adipose tissue-derived stem cells* yang dapat menurunkan produksi insulin dan PDX-1 pada tikus model DMT1 di induksi streptozocin.²³ Serta penelitian lain juga menggunakan pemberian MSCs dapat menurunkan kadar gula darah tikus model DM melalui regulasi PDGF dan VEGF.³⁰ Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus model DMT2.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Malondialdehyde* (MDA)

2.1.1. Definisi

Malondialdehyde (MDA) adalah senyawa organik dengan rumus nominal $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Ini adalah senyawa yang sangat reaktif yang terjadi secara alami dan merupakan penanda stres oksidatif. MDA sebagian besar ada dalam bentuk enol, dan dalam pelarut organik, isomer cis lebih disukai, sedangkan dalam air, isomer trans lebih dominan. MDA dihasilkan dari peroksidasi lipid asam lemak poliunsaturasi dan merupakan produk utama dalam sintesis tromboksan A_2 .^{31,32} DMT2 diketahui dapat mengakibatkan pembentukan ROS.³³ ROS dapat menyerang lipid pada sel-sel dengan menimbulkan proses peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai di mana radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan lipid membran sel, menghasilkan radikal bebas lainnya.^{34,35} Oleh karena itu, hiperglikemia pada DMT2 dapat memicu terbentuknya ROS melalui peroksidasi lipid, yang pada gilirannya dapat menyebabkan kerusakan sel pankreas dan berkontribusi pada resistensi insulin.

MDA digunakan sebagai biomarker stres oksidatif dalam banyak masalah kesehatan seperti penyakit metabolik, photoaging kanker, dan penyakit paru obstruktif kronis.^{36,37} MDA diproduksi oleh lipid membran sebagai respons terhadap ROS dan dapat digunakan sebagai indikator untuk mengevaluasi tingkat kerusakan membran plasma sel. MDA adalah salah satu produk akhir

peroksidasi asam lemak poliunsaturasi dalam sel dan dapat menyebabkan kerusakan dan lisis protein pada sistem membran sel dan menyebabkan kematian sel pankreas dalam kasus yang parah.

2.1.2. Peran MDA pada DMT2

Peran malondialdehyde (MDA) pada diabetes mellitus tipe 2 (DMT2): Penanda stres oksidatif, MDA merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid dan digunakan sebagai penanda stres oksidatif pada DMT2. Kadar MDA yang tinggi menunjukkan peningkatan stres oksidatif pada penderita DMT2. Indikator kerusakan sel, MDA adalah produk yang sangat toksik dan dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel, termasuk membran eritrosit pada penderita DMT2. Peningkatan kadar MDA menunjukkan adanya kerusakan oksidatif pada sel-sel tubuh.

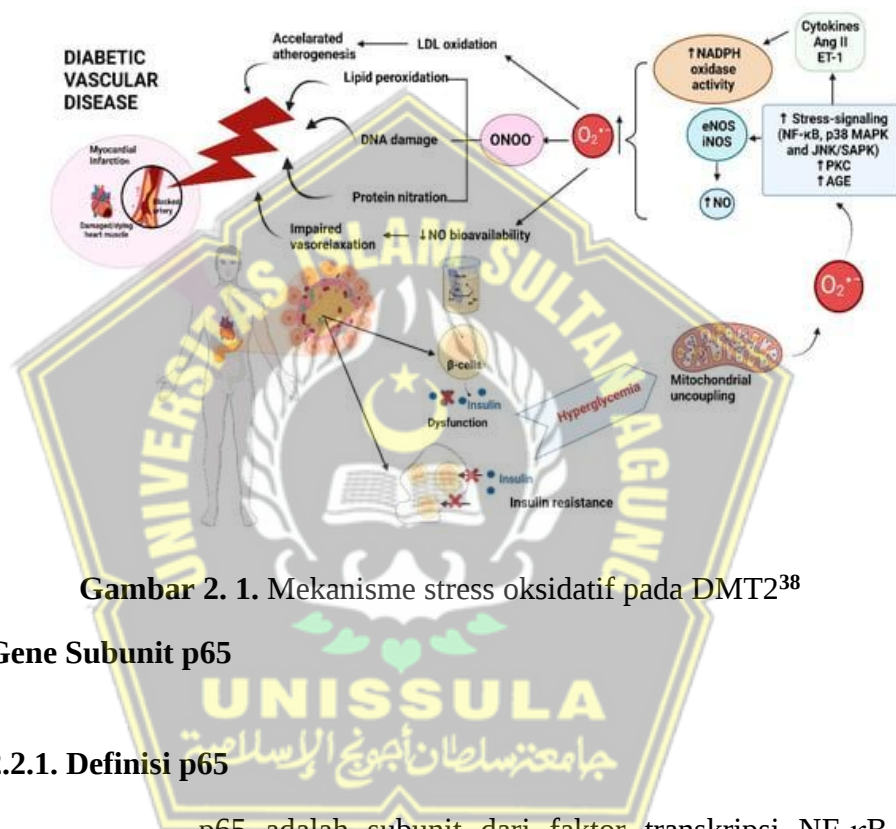
Hubungan dengan komplikasi DMT2, kadar MDA yang tinggi berkorelasi dengan perkembangan komplikasi mikrovaskuler pada DMT2, seperti retinopati diabetik. Peningkatan MDA dapat berkontribusi pada perkembangan komplikasi kardiovaskular pada penderita DMT2.

Korelasi dengan kontrol glikemik, beberapa penelitian menunjukkan adanya korelasi positif antara kadar MDA dengan HbA1c, yang merupakan indikator kontrol glikemik jangka panjang. Semakin buruk kontrol glikemik, semakin tinggi kadar MDA yang terdeteksi.

Biomarker diagnostik dan prognostik, MDA dapat digunakan sebagai biomarker untuk mendiagnosis adanya stres oksidatif pada

penderita DMT2. Kadar MDA juga dapat digunakan untuk memantau perkembangan penyakit dan risiko komplikasi pada DMT2.

Target terapi, penurunan kadar MDA melalui intervensi antioksidan atau terapi lainnya dapat menjadi target dalam pengelolaan DMT2 dan pencegahan komplikasinya.³⁸



Gambar 2. 1. Mekanisme stress oksidatif pada DMT2³⁸

2.2. Gene Subunit p65

2.2.1. Definisi p65

p65 adalah subunit dari faktor transkripsi NF-κB yang memiliki peran dalam inflamasi. Aktivasi dan translokasi p65 ke dalam nukleus berperan dalam memicu respons inflamasi. Pada DMT2, terjadi aktivasi NF-κB dan translokasi p65 menuju nukleus yang dimediasi oleh berbagai faktor.

Aktivasi p65 subunit NF-κB dapat memicu inflamasi dan cedera pada neuron bermielin, yang berkaitan dengan komplikasi neuropati

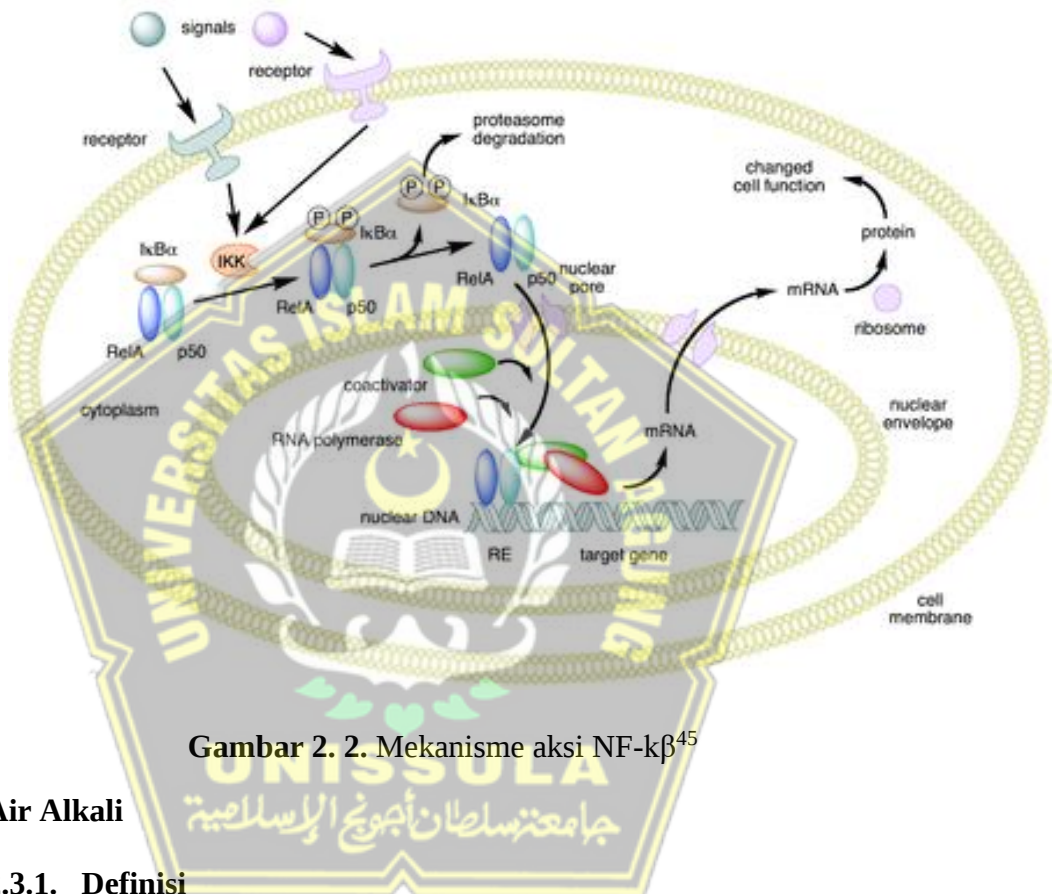
diabetik. Penghambatan aktivasi NF- κ B dan translokasi p65 dapat menjadi target potensial dalam pengembangan terapi untuk DMT2 dan komplikasinya. Stres oksidatif yang meningkat pada DMT2 dapat mengaktifkan NF- κ B dan meningkatkan translokasi p65, sehingga memperparah kondisi inflamasi.⁶

2.2.2. Peran p65 pada DMT2

Sub unit p65 diaktifkan di sel oleh stress oksidatif dan menginduksi berbagai gen termasuk IL-1 dan TNF yang selanjutnya merangsang jalur transduksi sinyal untuk mengaktifkan kompleks sub unit p50/p65. Sub unit p50/p65 juga diketahui menginduksi ekspresi gen siklo-oksigenase 2 (COX-2) dan endotelin. COX-2 terlibat dalam sintesis prostaglandin E2 (PGE2) dari asam arakidonat dan PGE2 dan endotelin diketahui resistensi insulin.⁴

Sub unit p50/p65 adalah salah satu mediator utama dari proses inflamasi seluler dan diketahui bahwa hiperglikemia dapat meningkatkan aktivitas transkripsi NF- κ B, menghasilkan sinyal inflamasi kronis. Sel pankreas yang tidak memiliki respon seimbang dalam produksi insulin menunjukkan peningkatan ekspresi sitokin inflamasi IL-1 β , IL-6, IL-8, dan TNF- α melalui jalur NF- κ B.³⁹ TLR diekspresikan dalam sel Langerhans dan sangat penting dalam identifikasi patogen dan respons imun. Telah ditunjukkan bahwa TLR memiliki fungsi penting dalam peradangan yang dimediasi obesitas melalui jalur pensinyalan hilirnya yang melibatkan NF- κ B. Secara khusus, sel langerhans mensekresi RNA nonkode yang dapat mengaktifkan TLR3 dan menginduksi respon inflamasi, seperti TNF- α dan

IL-6.^{40,41} Sel langerhans memiliki ekspresi TNFR yang dominan, dan TNF- α dapat mengaktifkan berbagai jalur inflamasi melalui NF- κ B dan MAPK.⁴² Telah terbukti bahwa TNF- α dapat menyebabkan apoptosis sel melalui jalur reseptor TNFR-1 atau p55 sehingga terjadi resistensi insulin.^{43,44}



Gambar 2. 2. Mekanisme aksi NF- κ B⁴⁵

2.3. Air Alkali

2.3.1. Definisi

Air alkali, juga dikenal sebagai air terionisasi atau air elektrolisis, adalah air yang memiliki pH lebih tinggi dari air minum biasa, biasanya berkisar antara 8,5 hingga 11,5.¹⁴ Air ini diproduksi melalui proses elektrolisis yang memisahkan molekul asam dan basa dalam air, kemudian membuang kandungan asamnya. Beberapa karakteristik air alkali meliputi:

1. pH basa (8-10)

2. Nilai oxidation-reduction potential (ORP) yang sangat rendah (negatif)
3. Kandungan hidrogen terlarut yang tinggi

2.3.2. Peran Air Alkali sebagai Antioksidan

Peran air alkali sebagai antioksidan dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Kandungan molekul hidrogen terlarut, air alkali yang diionisasi (AIW) mengandung molekul hidrogen terlarut (H_2) dalam jumlah tinggi. Molekul hidrogen ini berperan sebagai antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas dalam tubuh.
2. Menetralkan radikal bebas, air alkali mengandung antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas. Penderita diabetes membutuhkan asupan antioksidan dalam jumlah besar karena peningkatan radikal bebas akibat hiperglikemia.
3. Membantu fungsi organ, antioksidan dalam air alkali dapat membantu organ tubuh, terutama pankreas, untuk bekerja optimal dalam memproduksi insulin.
4. Mengurangi stres oksidatif, air alkali tereduksi lemah (EWARW) dengan pH 8,5 menunjukkan efek anti-oksidatif pada sel epitel tubulus proksimal ginjal (HK-2). EWARW dapat mengurangi stres oksidatif dengan menetralkan radikal bebas, sehingga berpotensi mencegah komplikasi diabetes seperti nefropati diabetik.
5. Potensi penurunan kadar glukosa darah, beberapa penelitian menunjukkan bahwa air alkali dengan $pH > 7$ bersifat antioksidan dan

terbukti menurunkan kadar glukosa darah pada model hewan diabetes.

6. Efek pada mikrobiota usus, perubahan pH air minum dilaporkan dapat mempengaruhi komposisi mikrobiota usus dan metabolisme glukosa, berdasarkan penelitian pada mencit.^{15,24,25}
7. Air alkali berinteraksi dengan lingkungan asam lambung. Lambung secara alami mempertahankan pH rendah (1,5–3,5) karena asam klorida, yang membantu pencernaan dan bertindak sebagai penghalang terhadap mikroorganisme berbahaya. Air alkali akan meningkatkan pH lambung sementara, merangsang sel parietal untuk memproduksi lebih banyak asam guna mengembalikan keasaman normal. Air alkali juga dapat meredakan gejala hiperasiditas atau refluks asam pada beberapa individu tanpa mengganggu pencernaan.
8. Air alkali dapat berkontribusi untuk menyeimbangkan mikrobiota usus, terutama dalam kasus disbiosis, yang merukan kondisi dimana terdapat ketidakseimbangan bakteri baik dan buruk. Lingkungan yang lebih basa dapat mendukung perkembangbiakan bakteri baik, seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, yang tumbuh pada pH 8. Bakteri baik memainkan peran penting dalam menjaga kesehatan usus, mendukung pencernaan, memproduksi asam lemak rantai pendek (SCFA), dan mengatur respons imun.

9. Air alkali dapat memengaruhi produksi SCFA pada *colon*, yang sangat penting bagi homeostasis *colon*. Bakteri baik memfermentasi serat makanan untuk menghasilkan SCFA, seperti butirat, asetat, dan propionat, yang mengurangi peradangan, mendukung metabolisme energi sel *colon*, dan menjaga integritas mukosa. Air alkali dapat menekan radikal bebas sehingga membantu mengurangi stres oksidatif di *colon*, yang berpotensi menurunkan risiko kondisi seperti penyakit radang usus (IBD) atau kanker kolorektal.
10. Air alkali dapat mencegah disbiosis dengan menurunkan kelimpahan bakteri patogen, yang sering kali tumbuh subur di lingkungan *colon* yang asam dan meradang. Netralisasi radikal bebas dan pengurangan stres oksidatif semakin mendukung homeostasis mikroba. Hal ini dapat meningkatkan pencernaan, penyerapan nutrisi, dan meningkatkan kesehatan usus secara keseluruhan.

2.4. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2.4.1. Definisi

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositas, dan neurosit. Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat.⁴⁶ Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel

fibroblast atau jarum. Secara fenotype, MSCS yang diisolasi dari tikus, dimana MSCS tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenic.⁴⁷

2.4.2. Sumber MSCs

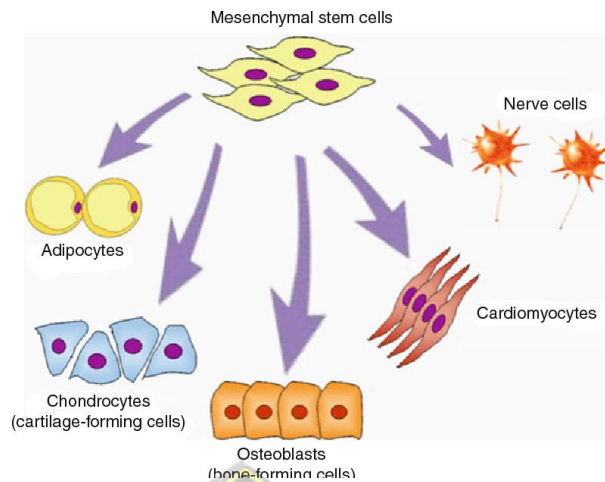
MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta.⁴⁶



Gambar 2. 3. Sumber mesenchymal stem cell (MSCs)⁴⁸

2.4.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit.⁴⁹ Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresikan beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi pankreas.⁵⁰



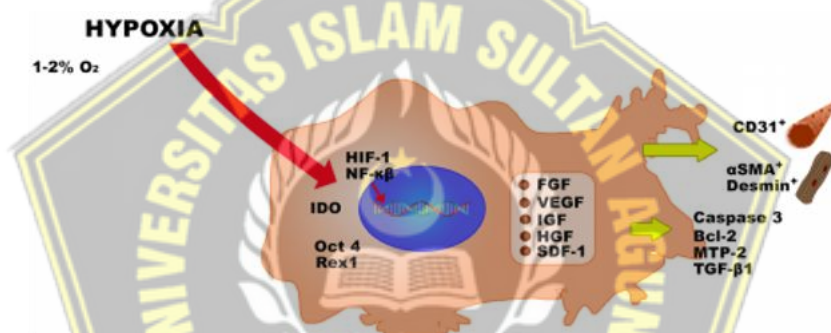
Gambar 2. 4. Kemampuan diferensiasi dari MSCs⁵¹

2.4.4. Peran MSCs

MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan secara *in vivo*. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi.^{52,53}

2.5. Hipoksia

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 MSCs.⁵⁴ Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hypoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs (Gambar 2.5).



Gambar 2. 5. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS⁵⁵

2.6. Sekretom Mesenchymal Stem Cell

MSCs diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut sekretom, biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *growth factor* (GF), hormon, eksosom, mikrovessikel, faktor antiinflamasi dll.^{56,57} Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel. Dalam hal sel pankreas, salah satu sitokin yang bertanggung jawab yaitu $TGF\beta$.^{58,59} $TGF\beta$ memiliki peran kunci dalam regulator sintesis prokolagen I.^{60,61} $TGF\beta$ secara signifikan terbukti menginduksi produksi α -

SMA. $TGF\beta$ juga menginduksi perbaikan pankreas.^{60,61} Disisi lain $TGF\beta$ menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan produksi insulin teraktivasi.⁶² Kandungan IL-10 yang tinggi pada secretom dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53.^{63,64} Secretom MSCs memiliki dosis efektif dalam menurunkan hiperglikemia pada dosis 250uL.



BAB III

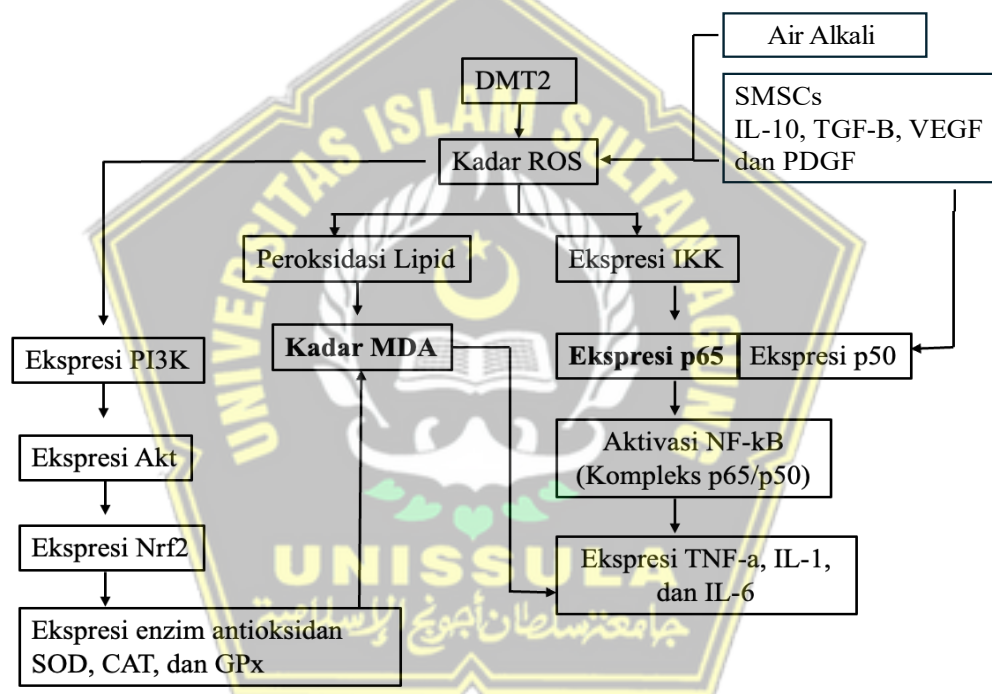
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Induksi STZ menginduksi stress oksidatif (ROS) yang mengaktifkan jalur IKK/NF- κ B dan JNK/AP-1 untuk menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α , dan IFN- γ .^{65,66} Pelepasan sitokin tersebut menyebabkan inflamasi yang berdampak terhadap kerusakan islet Langerhans dan kematian pada sel β -pankreas. Kerusakan tersebut menyebabkan penghambatan sekresi insulin hingga resistensi insulin yang menyebabkan kondisi hiperglikemia. Disisi lain, peningkatan kadar ROS menyebabkan penghambatan ekspresi Nrf2 melalui penghambatan jalur PI3K yang menyebabkan penurunan produksi enzim antioksidan seperti SOD, GPX, dan catalase.⁶⁴ ROS yang meningkat juga menyebabkan mengaktifasi jalur IKK dan meningkatkan ekspresi kompleks p65 dan p50 sehingga menginduksi pelepasan faktor transkripsi proinflamasi seperti IL-6.⁶⁷

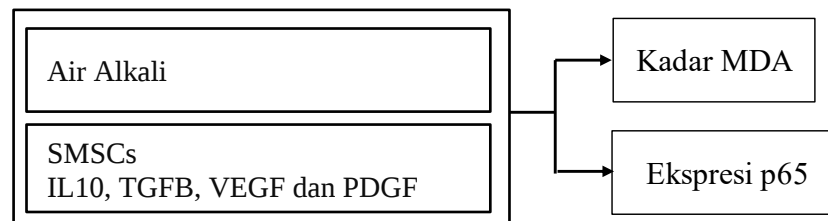
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal.⁴⁹ Sitokin-sitokin dan mediator–mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (H-MSCs). Air alkali memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi berdasarkan penelitian terdahulu pada berbagai

penyakit metabolik.^{14,24} Pada penelitian ini sekretom diberikan secara intraperitoneal. Komponen IL-10 pada SMSCs menginduksi aktivitas enzim SOD sehingga akan menekan kadar ROS. IL-10 dan TGF- β sebagai sitokin anti-inflamasi menghambat ekspresi sitokin inflamasi seperti IL-6, IL-1, dan TNF- α yang akhirnya menyebabkan proliferasi sel β -pankreas sehingga terjadi sekresi insulin dan kadar gula darah menurun.^{3,23}



Gambar 3. 1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3. 2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian SMSCs yang dikombinasi dengan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

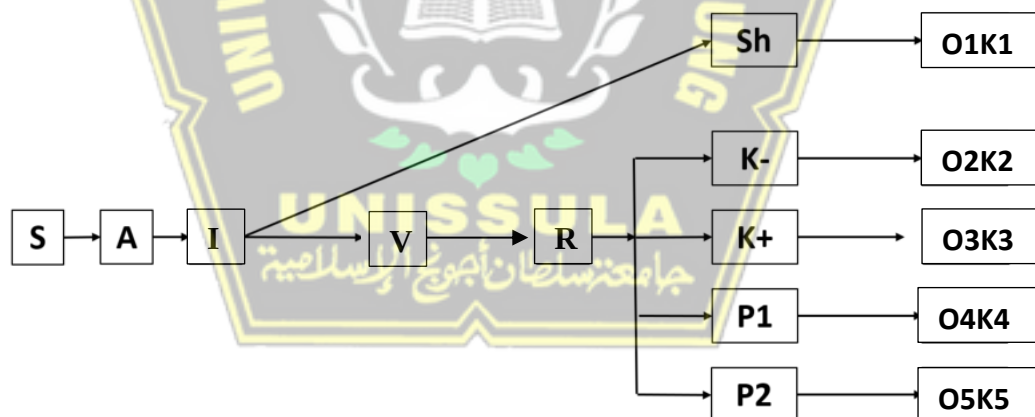


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut yaitu kelompok 1 tikus sehat (Sh), kelompok 2 mendapatkan NaCl 0,9% 500 μ L (K-), kelompok 3 mendapatkan Metformin 45 mg/kgBB peroral (K+), kelompok 4 mendapatkan intervensi terapi SH-MSC 500 μ L tanpa pemberian air alkali (P1), dan kelompok 5 mendapatkan SH-MSC 500 μ L dengan air alkali 5 mL/hari (P2). Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.



Gambar 4. 1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Subjek Penelitian (Tikus) Sehat

A : Aklimitasi

I	: Induksi
V	: Validasi Gula Darah dan HOMA-IR
R	: Randomisasi
Sh	: Kelompok sehat tanpa perlakuan
K-	: Kelompok 1: SDMT 2 dengan NaCl 0,9 %
K+	: Kelompok 2: SDMT 2 dengan Metformin dosis 45 mg/kgBB
P1	: Kelompok 3: SDMT 2 perlakuan Sekretom dosis 500 µl
P2	: Kelompok 4: SDMT 2 perlakuan Sekretom dosis 500 µl dan air alkali
O	: Observasi

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

SMSCs secara injeksi intra peritoneal yang dikombinasi dengan air alkali yang diberikan secara oral.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Kadar MDA dan ekspresi gen p65

4.2.1.3. Variabel Prekondisi

Diabetes mellitus tipe 2

4.2.1.1. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah strain tikus wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi/pakan

tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2. Defenisi Operasional

4.2.2.1. SMSCs

Adalah protein soluble yang mengandung faktor IL-10, VEGF dan PDGF diperoleh dari ko kultur sekresi SPM *Umbilical Cord*. Memiliki karteristik ekspresi CD73, CD90 dan CD105 serta tidak mengekspresikan CD13, CD14,CD16, CD21 pada suhu 37°C pada kondisi 5% 2 selama 24 jam. SMSCs di produksi di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research Indonesia*. Dosis SMSCs adalah 500 µL dengan pemberian secara intraperitonal.

Satuan: µL

Skala: Ordinal

4.2.2.2. Air Alkali

Air alkali adalah air yang memiliki pH lebih dari 8 yang di buat dengan cara menghilangkan kandungan asam didalamnya. Air alkali diberikan secara oral menggunakan metode sonde sebanyak 5 mL/hari, dibagi dalam 2 kali pembagian masing masing 2,5 mL. Diberikan selama 22 hari (hari ke-8 sampai hari ke-30).

Satuan: mL

Skala: rasio

4.2.2.3. Kadar MDA

Kadar MDA adalah kadar penanda stress oksidatif yang diproduksi oleh sel termasuk sel pankreas sebagai respon terhadap kondisi hiperglikemia yang di picu oleh obesitas. Kadar MDA pada penelitian ini diperiksa dari sampel darah tikus yang diambil pada hari ke 22 setelah perlakuan. Kadar MDA dianalisis dengan ELISA.

Satuan: Kadar pg/mL

Skala: rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen p65

Ekspresi gen p65 adalah ekspresi gen sub unit penanda aktivasi jalur Nf-kB sebagai respon inflamasi pada DMT2. Ekspresi gen p65 pada penelitian ini diperiksa dari sampel jaringan pankreas tikus yang diambil pada hari ke 22 pasca perlakuan. Ekspresi gen p65 dianalisis dengan qRT-PCR yang di bandingkan terhadap housekeeping gen GAPDH.

Satuan: Fold rasio mRNA level p65/GAPDH

Skala: rasio

4.3. Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini merupakan Tikus jantan Galur Wistar berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200 - 250gram diberi 10%. Laboratorium Stem Cell and ancer Research Indonesia, Semarang.

Tikus dipelihara dalam kandang plastik yang berukuran 37 x 40 x 18cm dengan kondisi temperatur ruangan 23-25°C, kelembaban 40-70% dan siklus gelap terang setiap 12 : 12 jam. Tikus diadaptasi selama 7 hari dengan diberi pakan standar rat chow pellet dan air minum secara *ad libitum*.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Tikus Putih Jantan Galur Wistar
2. Umur 6-8 minggu
3. Kondisi sehat, tidak ada kelainan anatomis
4. Terbukti DM (GDP > 126 mg/dl dan Nilai HOMA-IR > 2.4)

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya
2. Tikus tidak DM

4.3.2.3. Kriteria Drop Out

1. Tikus mengalami infeksi selama penelitian atau
2. Tikus mati selama penelitian

4.3.3. Cara Penentuan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi

menjadi 5 kelompok yaitu kelompok Sehat (tikus sehat), Kontrol negatif (tikus model DMT2 yang diinjeksi NaCl 0,9%), kontrol positif (tikus model DMT2 yang diinjeksi metformin 45 mg/kgBB, Perlakuan 1 (tikus model DMT2 yang diinjeksi secara intraperitoneal SMSCs 500 uL), dan Perlakuan 2 (tikus model DMT2 yang diinjeksi secara intraperitoneal SMSCs 500uL dan mendapatkan asupan air alkali 5 mL/hari secara peroral).

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan rumus 1, yakni rumus sampel eksperimental dari Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ sehingga didapat hasil 15. Keterangan untuk nilai t adalah banyaknya perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap perlakuan.

$$\text{Rumus Federer} : (t-1)(n-1) \geq 15 \quad (1)$$

$$\text{Sampel tiap Kelompok} : (5-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq 5$$

cadangan 10%, $n = 6$

Keterangan:

t = Treatment (jumlah perlakuan)

n = Banyaknya pengulangan

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor tikus perkelompok.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Pelitian ini menggunakan beberapa peralatan yaitu:

- a. Alat untuk pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus yang terbuat dari plastik berukuran 50cm x 30cm x 20cm dengan tutup kawat dan alasnya diberi sekam. Kandang dilengkapi dengan tempat pakan dan botol air minum.
- b. Alat untuk perlakuan pada tikus seperti timbangan digital, *glove* dan masker
- c. Alat untuk preparasi dan penyimpanan sampel jaringan meliputi tabung hematokrit, spuit 1 cc, *vacutainer* EDTA, *ice pack*, *cool box*, pinset, *centrifuge*, *cryotube* 1,5cc, *vial tube* 1,5cc, dan *cryobox*.
- d. Alat untuk analisis parameter meliputi pinset, *scapel*, *pastel rotor*, *centrifuge*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *micropipet*, *vortex*, *water bath*, *western Bloth Machine*, elektroforesis, Gel doc, optilab, mikroskop, *deckglass*, *staining chamber*, *humidity chamber*, *cover glass*, *BD Accuri C6 Plus flow cytometer*, *Fluorometer Quantus*, *ELISA reader*, *Hypoxia chamber*, *dissolved oxygen meter*, *Tangential flow filtration pulse*, *filter chip* 5-300 kDA, *Liquid Nitrogen* sebagai tempat penyimpanan sel dengan temperature -196 C (dilaboratorium).

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain asam asetat, Streptozotocin, ELISA Kit MDA dan primer p65, *umbilical cord* tikus, *medium alfa* MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), DMEM (Gibco BRL, Grand island, NY, USA), Trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA), fungizone 1%, *Triptan blue* (Sigma, St Louis, MO, USA), stopper, NaCl 0,9%, PBS (*Phospat Buffer Saline*), *Ficoll Hypaque*, Alkohol 70%, 80%, 95%, dan 100%, streptomycin- penicillin 1% dan xylol. Sedangkan untuk validasi adalah Anti-Rat CD90 PerCP, Anti-Rat CD29Alexa Fluor 647, Anti-Rat CD31 PE, dan Anti-Rat CD45 FITC, Media Basal Diferensiasi Adipogenik MesenCult, *Oil Red O*, *Alizarin Red*.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diperoleh dari Komisi Bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar umur 6 sampai 8 minggu, berat 150-200gram didapatkan dari Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Tikus dipelihara dalam kandang plastik yang berukuran 37 x 40 x 18cm dengan kondisi temperatur ruangan 23-25° C, kelembaban 40-70% dan siklus gelap terang setiap 12 : 12 jam.

Tikus diadaptasi selama 5 hari dengan diberi pakan standar BR A591K dan air minum secara *ad libitum*

4.5.3. Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2

Seluruh tikus (25 ekor) diinjeksi STZ dengan dosis 50 mg/kg berat badan dan NA dosis 50 mg/kgbb secara intra peritoneal dengan spuit 1 cc, serta diberi minum larutan sukrosa 30 % sebanyak 50 cc secara *ad libitum* selama 2 hari. Pengukuran glukosa darah puasa 4-6 jam diambil dari pembuluh darah ekor/vena lateralis dan penimbangan berat badan tikus dilakukan 7 hari setelah suntikan STZ terakhir, masing-masing menggunakan glukometer glucoDR Bio-sensor dan timbangan digital (total 7 hari induksi diabetes). Tikus dinyatakan diabetes apabila glukosa darah puasa > 126 mg/dL.

4.5.4. Perhitungan Resistensi Insulin (HOMA-IR)

Serum darah diambil dari vena sub orbita tikus 4-6 jam puasa, kadar insulin dievaluasi dengan ELISA. Glukosa darah puasa dihitung menggunakan alat pengukur gula darah. Penghitungan HOMA-IR menggunakan rumus 3:

$$\frac{\text{Insulin darah puasa } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glukosa darah puasa}}{(\text{mmol/ml}) \ 22,5} \quad (3)$$

4.5.5. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cell dari Umbilical Cord

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety* cabinet class 2, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. *Umbilical cord* beserta janin tikus dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* beserta janin tikus diletakkan ke petri dish, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

4.5.6. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow*

Cytometry

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BDTM accutaseTM *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment soluution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer (cat. No. 554656) atau

Phospat Buffer Saline (PBS) buffer. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel ke dalam masing-masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

Tabel 4. 1 . Reagen yang digunakan dalam flow cytometry

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC mouse anti-human CD29	5 μ l
2	PE mouse anti-human CD90	5 μ l
3	PerCP-CyTm 5.5 mouse anti-human CD45	5 μ l
4	APC Mouse anti-human CD31	5 μ l
5	Kosong	-
6	hMSC positive isotype control cocktail	20 μ l
	hMSC negative isotype control cocktail	20 μ l
	hMSC positive cocktail	20 μ l
7	PE hMSC negative cocktail	20 μ l

4.5.7. Uji Differensiasi MSCs

MSCs dikultur dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel /well. Sel ditumbuhkan dalam 24 well plate dengan media standar yang mengandung DMEM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), dilengkapi dengan 10% FBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) dan 1% penisilin (100 U / mL) / streptomisin (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) pada suhu 37 °C, 5% CO₂ dan kelembapan $\geq 95\%$. Setelah 80% konfluen, media standar disedot dan diganti dengan media diferensiasi osteogenik yang mengandung Media Basal Diferensiasi Osteogenik *MesenCult*™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) ditambah dengan 20% Suplemen Diferensiasi Osteogenik *MesenCult*™ 5X (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) dan 1% L-Glutamine (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Media diferensiasi diperbarui setiap 3 hari. Setelah terbentuk matrikstulang selama kurang lebih 21 hari, diferensiasi osteogenik divisualisasikan dengan pewarnaan 1 mL larutan *Alizarin Red* 2% (Sigma, St. Louis, MO, USA).

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

4.5.8. Proses Hipoksia dan TFF

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam hypoxic chamber.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan SMSCs.

4.5.9. Validasi SMSCs

Kandungan molekul proinflamasi, antiinflamasi dan growth factor pada sekretom MSCs hipoksia divalidasi menggunakan ELISA kit. Sampel sekretom MSCs hipoksia dianalisis kadar molekul proinflamasinya, seperti TNF- α , IL-6; molekul antiinflamasi seperti IL-10 dan TGF- β ; dan *growth factor* seperti VEGF, FGF dan PDGF. Sekretom dengan kandungan molekul antiinflamasi dan growth factor tinggi serta kandungan molekul proinflamasi yang rendah akan digunakan untuk penelitian.

4.5.10. Perlakuan Hewan Coba

Setelah terbentuk tikus model DMT2 tikus diinjeksi sekretom dengan dosis dan 500 uL secara intraperitoneal pada hari ke 1, 7 dan 14, serta setiap hari mendapatkan asupan minum berupa air alkali dosis 5 mL/hari *ad libitum*. Tikus kontrol disuntik dengan NaCl.

4.5.11. Pengambilan Sampel Darah Tikus

Pengambilan sampel darah tikus melalui vena orbita menggunakan tabung hematokrit. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum. Pengambilan serum dilakukan pada hari ke 30 setelah perlakuan.

4.5.12. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan pancreas dilakukan pada hari ke 30 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Sampel jaringan dimasukkan didalam RNA later. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.5.13. Analisis Kadar MDA dengan ELISA

Perhitungan kadar MDA dilakukan menggunakan metode ELISA dengan cara sebagai berikut :

1. Menyampurkan standard dan dilusi standard menjadi konsentrasi 300, 150, 75, 37,5 , 18,7 , dan 0 pg/ml.

2. Menyiapkan sumuran kosong, sumuran standard, dan sumuran sampel.
3. Menambahkan cairan conjugasi 50 μ l ke sumuran standard.
4. Menambahkan dilusi spesial sebanyak 40 μ l dan sampel 10 μ l.
5. Menambahkan 50 μ l *horseradish peroxidase* (HRP) pada tiap lubang, lalu inkubasi 60 menit pada suhu 37° C.
6. Buang cairan dan keringkan tiap sumuran.
7. Beri cairan pencuci, aduk, dan kocok selama 30 menit ulangi sebanyak 5 kali lalu keringkan.
8. Beri 50 μ l *chromogen solution A* dan *chromogen solution B* pada tiap sumuran. Aduk rata dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C.
9. Beri larutan *stopper* 50 μ l pada tiap sumuran
10. Baca menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.

4.5.14. Analisis Kuantitatif Ekspresi p65 menggunakan RT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA⁶⁸ Isolasi RNA jaringan pankreas dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol®, (Invitrogen Life Technologies) dan pembuatan cDNA menggunakan iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad iScript gDNA Clear cDNA synthesis Kit Catalog) menggunakan Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) thermal cycler C1000 (Bio-Rad).
2. Penentuan ekspresi gen p65 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR Master mix

solution (iNtRON®, nomer katalog 25027) di dalam tabung vial 0,2 mL dengan volume total 50 uL untuk 1 sampel. PCR dilakukan menggunakan siklus termal DNA: Terapan Biosistem Veriti.

3. Perhitungan ekspresi gen p65 dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *house keeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *house keeping*.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia Semarang. Pemeliharaan, induksi hewan coba, dan perlakuan hewan coba dilakukan di Animal Model Research Center SCCR Indonesia. Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2024 – Januari 2025.

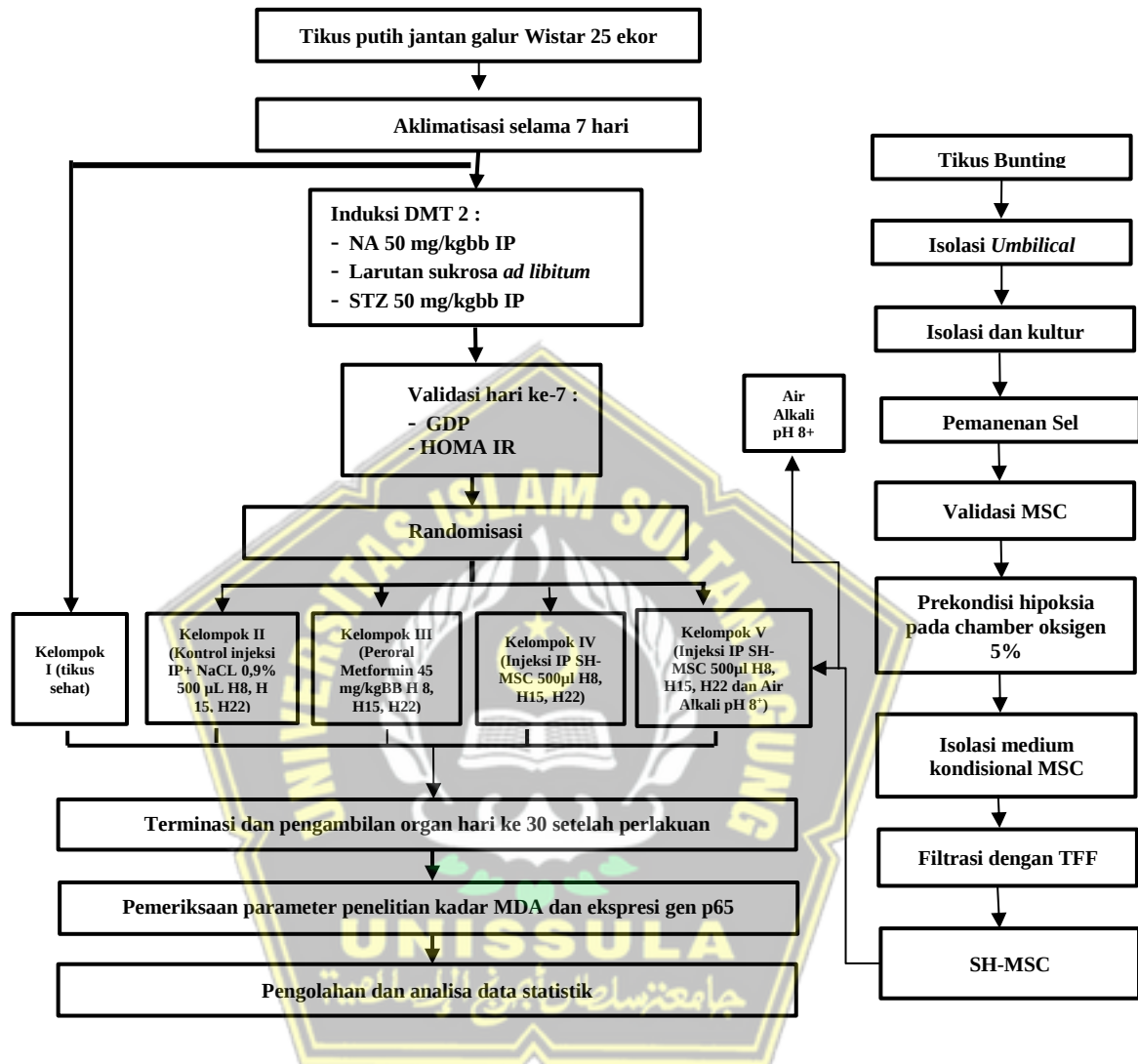
4.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan homogenitas menggunakan *Saphiro wilk* dan *Levene* menunjukkan data MDA terdistribusi normal dan homogen ($p > 0.05$). Data MDA selanjutnya dilakukan uji beda *analysis of variance* (ANOVA) dan *post hoc least significant difference* (LSD). Analisis normalitas menggunakan *Saphiro wilk* menunjukkan data p65 tidak terdistribusi normal ($p < 0.05$). Data p65 selanjutnya dilakukan uji beda *kruskall wallis* dan *post hoc mann whitney*. Nilai $p < 0.05$ pada uji beda dan *post hoc* menunjukkan data yang signifikan.

Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4. 2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi sekretom SMSCs dan air alkali terhadap kadar MDA dan ekspresi p65 pada model tikus DMT2. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Oktober 2024 sampai dengan bulan Januari 2025 bertempat di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.

Tikus putih jantan galur Wistar menjadi subjek penelitian dengan jumlah tikus yang digunakan sebanyak 25 tikus. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, kelompok tikus sehat (Sh), kelompok tikus DMT2 (K-), kelompok DMT2 dengan Metformin 45 mg/kgBB peroral (K+), kelompok DMT2 dengan intervensi terapi SH-MSC 500 uL tanpa pemberian air alkali (P1), dan kelompok DMT2 dengan SH-MSC 500 uL dengan air alkali 5 mL/hari (P2).

Isolasi *mesenchymal stem cells* dari *umbilical cord* dilakukan pada tikus dengan usia bunting 19 hari. Validasi MSCs dilakukan dengan menggunakan differensiasi osteogenik dan adipogenik. Validasi membran marker sel dilakukan menggunakan *flowcytometri*. MSCs yang sudah tervalidasi kemudian di inkubasi dengan kondisi hipoksia selama 24 jam dengan 5% O₂.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Validasi Induksi Diabetes Mellitus Tipe 2 dan Resistensi Insulin pada tikus Wistar.

Validasi model tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan resistensi insulin pada tikus jantan galur Wistar yang diinduksi streptozocin (STZ) dikonfirmasi melalui analisis kadar glukosa darah puasa (GDP) serta perhitungan *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR), yang menunjukkan adanya perbedaan dibandingkan kelompok kontrol. Tabel 5.1 menunjukkan bahwa kandungan GDP pada tikus DMT2 mempunyai nilai >126 mg/dL, yang menunjukkan kondisi diabetes.⁶⁸

Tabel 5. 1. Hasil validasi glukosa darah puasa tikus jantan galur Wistar pada kelompok induksi STZ dibandingkan dengan tikus sehat.

Kelompok	Glukosa Darah Puasa (mg/dL)	Induksi diabetes (>126 mg/dL)
	Rerata $\pm$ SD	
Sehat	105.000 $\pm$ 0.189	Tidak
Tikus induksi STZ	481.833 $\pm$ 3.791	Iya

Untuk mengetahui apakah tikus kelompok perlakuan memiliki resistensi insulin, maka dilakukan validasi menggunakan perhitungan HOMA-IR. Table 5.2 menunjukkan bahwa hasil HOMA-IR pada tikus dengan induksi STZ menunjukkan rerata yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok sehat, hal ini menunjukkan bahwa resistensi insulin berhasil diinduksi pada tikus dengan pemberian STZ. Nilai HOMA-IR antara 0.5-1.4 dapat dikategorikan dalam keadaan normal, nilai ≥ 1.9 menunjukkan resistensi insulin tahap awal, nilai ≥ 2.4 menandakan adanya resistensi insulin.⁶⁹ Diketahui hasil HOMA-IR pada kelompok tikus dengan induksi STZ memiliki nilai $\geq 2,4$ dan memiliki nilai GDP yang tinggi,

fenomena ini menunjukkan pada penelitian ini induksi DMT2 pada tikus jantan galur wistar berhasil dilakukan.

Tabel 5. 2. Hasil validasi resistensi insulin pada tikus jantan galur Wistar pada kelompok induksi STZ dibandingkan dengan tikus sehat.

Kelompok	HOMA-IR Rerata $\pm$ SD	Resistensi Insulin ($\geq 2,9$)
Sehat	0.770 $\pm$ 0.045	Tidak
Tikus induksi STZ	20.913 $\pm$ 3.03	Iya

5.1.2. Isolasi Sekretom pada *Hypoxia Mesenchymal Stem Cell*.

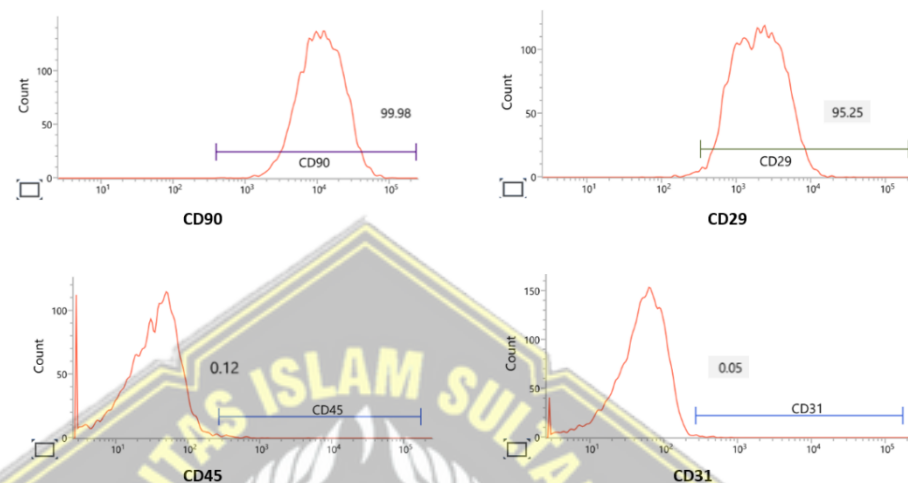
Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang yang menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 19 hari. Hasil isolasi kemudian di kultur pada flask plastik dengan medium khusus. Hasil kultur MSCs setelah passage ke 5 didapatkan gambaran morfologi *spindle-like cell* pada dasar flask (Gambar 5.1.).



Gambar 5. 1. Isolasi MSCs dengan sel berbentuk *spindle-like* (ditunjuk anak panah) pada pembesaran 40x.

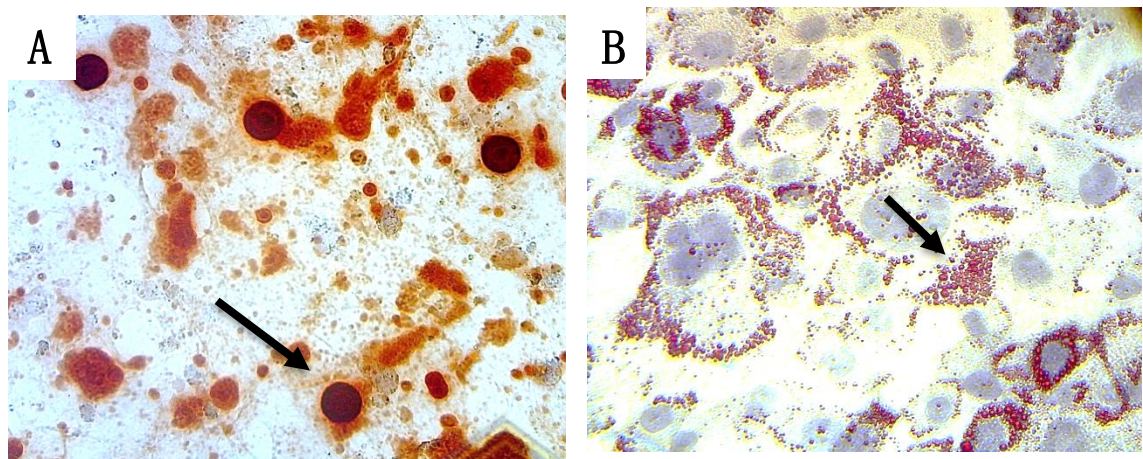
Hasil isolasi sel MSCs kemudian divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk kemudian dilihat kemampuannya dalam mengekspresikan berbagai macam *surface marker* khusus yang dimiliki oleh MSCs. Pada penelitian

ini menunjukkan bahwa MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99.98%) dan CD29 (95.25%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (0.12%) dan CD31 (0.05%) (Gambar 5.2.).



Gambar 5. 2. Analisis *Flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45 dan CD31.

Untuk mengetahui apakah MSCs mampu berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel *mature*, maka dilakukan uji validasi differensiasi osteogenic dan adipogenik. Sel punca MSCs diberikan medium khusus agar mampu berdiferensiasi masing-masing menjadi osteofit dan adiposit. Hasil pengujian validasi menunjukkan bahwa sel MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit maupun adiposit, hal ini diindikasikan dari warna merah hasil pewarnaan *Alizarin Red* yang menunjukkan adanya endapan kalsium pada osteosit (gambar 5.3.A) dan deposisi lemak berwarna merah pada sampel setelah diwarnai menggunakan *oil red O* (gambar 5.3.B).



Gambar 5. 3. (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit. **(B)** MSCs mampu berdiferensiasi menjadi Adiposit. Endapan kalsium dan lemak dapat terlihat setelah pemberian pewarnaan *alizarin red* dan *oil red O* pada pembesaran 400x (ditunjukkan dengan panah hitam).

Setelah dilakukan validasi MSCs, kemudian MSCs diinkubasi dalam keadaan hipoksia dengan konsentrasi O_2 5% selama 24 jam didalam *chamber hypoxia*. Medium kultur yang sudah mengandung sekretom kemudian dikumpulkan dan difiltrasi dengan metode *Tangential flow filtration* (TFF) untuk memperoleh molekul berukuran 10-100 kDa yang mengandung sitokin-sitokin proinflamasi, antiinflamasi dan growth factor.⁷⁰ Sekretom yang didapat kemudian divalidasi, hasil validasi dari SMSCs dapat dilihat pada tabel 5.3. Sekretom yang sudah tervalidasi kemudian akan dikombinasikan dengan air alkali dan diberikan sebagai treatment pada tikus yang sudah diinduksi dengan diabetes mellitus tipe 2.

Tabel 5. 3. Hasil validasi sekretom MSCs dalam kondisi hipoksia.

Parameter	Hasil	Standar
VEGF	1064.74 pg/mL	>500 pg/mL
SDF	7374.94 pg/mL	>500 pg/mL
IL-10	523.23 pg/mL	>400 pg/mL
pH	7.2	6 – 9
Osmolaritas	320 mOsm/kg	275 – 340 mOsm/kg
Mikoplasma	Negative	Negative
Endotoksin	<0.125 EU	<0.125 EU

5.1.3. Efek Pemberian SMSCs dan Air Alkali terhadap Kadar MDA pada Model Tikus DMT2

Kadar MDA menjadi penanda dari stress oksidatif yang diproduksi membran lipid sebagai respon terhadap ROS dan menjadi indikator untuk mengevaluasi tingkat kerusakan membran plasma sel.^{71,72} Pada kasus DMT2, MDA berkorelasi dengan tingkat komplikasi, kontrol glikemik, serta berperan sebagai biomarker diagnostik dan prognostik.^{73–75} Oleh karena itu, MDA sering dijadikan target terapi dalam pengelolaan DMT2.⁷⁶

Tabel 5. 4. Data Hasil Penelitian Kadar MDA dan Ekspresi p65 pada Tikus Model DMT2.

Variabel	Kelompok				P Value
	K-	K+	P1	P2	
	Rerata±SD DMT2	Rerata±SD Metformin	Rerata±SD SMSCs	Rerata±SD SMSCs+ Alkali	
Kadar MDA (pg/mL)	848,231±175,527	404,025±254,343	158,168±140,995	136,651±143,911	<0.05 ^a 0.444 ^b 0.002 ^c
Ekspresi p65 (fold)	39,536±18,705	28,194±17,011	26,224±11,933	20,448±10,677	>0.05 ^a 0.078 ^b 0.271 ^d

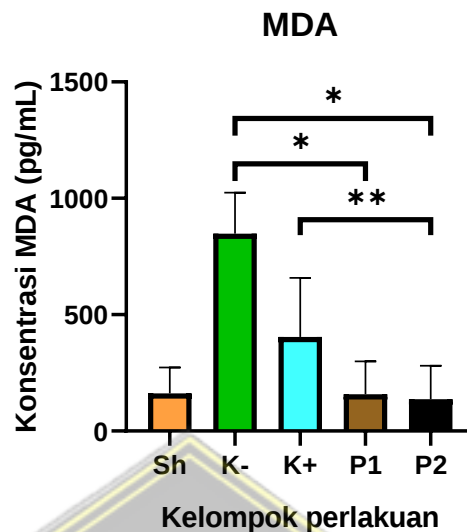
^a: Saphiro Wilk (p>0,05= normal), ^b: Levene's Test (p>0,05= homogen)

^c: Kruskal Wallis non parametic, ^d: One Way Anova (p<0,05 = signifikan)

Berdasarkan tabel 5.4 kelompok Sh memiliki kadar MDA dan ekspresi p65 yang rendah. Hal ini dikarenakan MDA merupakan marker obesitas pada penderita diabetes, sedangkan p65 merupakan marker inflamasi yang umumnya tidak ditemukan pada kondisi sehat tanpa adanya peradangan.^{52,71} Pada kelompok DMT2, rerata paling tinggi kadar MDA terdapat pada kelompok treatment K- diikuti oleh kelompok K+, P1 dan yang paling rendah adalah kelompok P2. Data kadar MDA keempat kelompok DMT2 tidak terdistribusi secara normal (Tabel 5.4), oleh karena itu dilakukan uji non parametrik *Kruskal wallis*. Hasil uji statistik non parametrik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna diantara rerata kadar MDA yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0.002$ ($p < 0.05$). Hasil uji *Kruskal wallis* yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Post hoc Mann Whitney* untuk melihat perbedaan makna antar kelompok (tabel 5.5).

Tabel 5. 5. Uji *post hoc Mann Whitney* kadar MDA pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Sig.	Berbeda signifikan
K-	K+	0,016	Iya
	P1	0.004	Iya
	P2	0.004	Iya
K+	K-	0.016	Iya
	P1	0.078	Tidak
	P2	0.037	Iya
P1	K-	0.004	Iya
	K+	0.078	Tidak
	P2	0.631	Tidak
P2	K-	0.004	Iya
	K+	0.037	Iya
	P1	0.631	Tidak



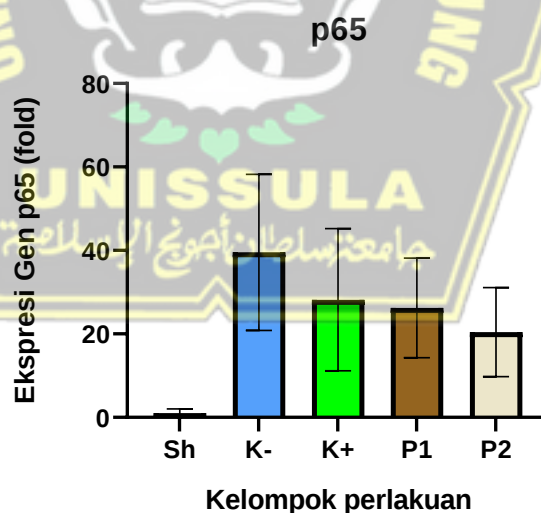
Gambar 5. 4. Kadar MDA pada tikus model DMT2. Kelompok P1 dan P2 menunjukkan penurunan signifikan pada kadar MDA dibandingkan kelompok K-. Kombinasi SMSCs dan alkali menunjukkan penurunan kadar MDA dibandingkan dengan control positif K+. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

Hasil pengujian kadar MDA setelah pemberian SMSCs 500 μ L dan kombinasi SMSCs dengan air alkali 5 ml pada tikus model DMT2 menunjukkan penurunan signifikan dibandingkan dengan kontrol tikus model DMT2 tanpa perlakuan K- (gambar 5.4). Grafik K- menunjukkan ekspresi MDA tertinggi, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya dimana MDA pada pasien DMT2 akan mengalami kenaikan ekspresi.⁷³ Pemberian SMSCs dan kombinasi SMSCs+Alkali menunjukkan penurunan ekspresi MDA yang signifikan dibandingkan dengan K-. Hal menarik dari hasil penelitian ini adalah perlakuan kombinasi SMSCs+Air Alkali mampu menurunkan kadar MDA secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+). Hasil ini menunjukkan bahwa kemampuan kombinasi SMSCs dan Air alkali lebih efektif dalam meregulasi kadar MDA dibandingkan dengan metformin. Untuk memahami apakah penurunan kadar MDA

berkaitan dengan regulasi p65, maka dilakukan pengujian ekspresi p65 pada tikus model DMT2.

5.1.4. Efek Pemberian SMSCs dan Air Alkali terhadap Ekspresi p65 pada Model Tikus DMT2

Hasil pengujian ekspresi p65 pada tikus model DMT2 menunjukkan bahwa rata-rata tertinggi ekspresi gen p65 terdapat pada kelompok treatment K-, diikuti oleh kelompok K+, kelompok P1 dan yang paling rendah pada kelompok P2 (Tabel 5.4). Uji *One way Anova* data rerata ekspresi p65 ini dilakukan setelah diketahui data terdistribusi normal. Hasil uji parametrik *One way Anova* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dengan $p=0.271$ ($p<0.05$), sehingga uji *post hoc* tidak dilakukan.



Gambar 5. 5. Ekspresi p65 pada tikus model DMT2. Kelompok P1 dan P2 menunjukkan penurunan pada ekspresi p65 dibandingkan kelompok K-. Kombinasi SMSCs dan Air Alkali menunjukkan penurunan ekspresi p65 dibandingkan dengan kontrol positif K+.

Grafik hasil pengujian ekspresi p65 pada tikus model DMT2 (Gambar 5.5.) menunjukkan tren penurunan yang sejalan dengan grafik pengujian kadar MDA (Gambar 5.4). Ekspresi p65 pada kelima kelompok perlakuan memiliki tren yang sama dengan kadar MDA pada tikus DMT2. Seperti yang sudah diketahui sebelumnya, bahwa peningkatan level MDA berpengaruh terhadap modulasi ekspresi molekul-molekul proinflamasi⁷⁷. Oleh karena itu, jika terjadi penurunan kadar MDA maka akan diikuti oleh turunnya ekspresi p65. Diketahui pada gambar 5.5 dapat diamati bahwa kombinasi SMSCs dan air alkali (P2) menghasilkan ekspresi p65 paling rendah, bahkan lebih rendah dibandingkan penggunaan metformin (K+). Hal ini menunjukkan potensi kombinasi SMSCs dan air alkali dalam menekan ekspresi p65 secara lebih efektif dibandingkan terapi standar pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

5.2. Pembahasan

Inflamasi merupakan respons biologis kompleks terhadap berbagai rangsangan, termasuk infeksi patogen, sel yang rusak, ataupun bahan-bahan kimia berbahaya, dengan tujuan utama menghilangkan penyebab infeksi, membersihkan sel yang rusak, dan memulai proses penyembuhan jaringan.⁷⁸ Proses inflamasi dimulai oleh aktivasi sel imun akibat pelepasan sinyal bahaya, seperti *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs).⁷⁹ Pada DMT2, DAMPs akan menyebabkan makrofag tipe 1 mensekresikan sitokin-sitokin proinflamasi yang dimodulasi oleh NF- κ B melalui sub-unit p65 dan p50.⁵

Inflamasi pada DMT2 dipicu oleh kondisi hiperglikemia yang menyebabkan peningkatan stress oksidatif dan inflamasi, kedua hal ini sangat

berperan dalam progresivitas komplikasi penyakit.² Hiperglikemia pada DMT2 diketahui memicu pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS)³³, yang dapat memicu peroksidasi lipid, suatu reaksi berantai di mana radikal bebas menyerang lipid membran sel, menghasilkan lebih banyak radikal bebas, dan akhirnya menyebabkan kerusakan seluler lebih lanjut.^{34,35} Proses ini tidak hanya berkontribusi terhadap disfungsi sel β pankreas, tetapi juga memperparah resistensi insulin, yang menjadi ciri khas DMT2.⁸⁰

Peningkatan kadar MDA, sebagai produk akhir peroksidasi lipid, berperan dalam induksi molekul-molekul proinflamasi seperti IL-25, IL-6, IL-8, dan ICAM-1, yang memperkuat inflamasi sistemik.⁸¹ NF- κ B merupakan faktor transkripsi utama dalam aktivasi makrofag M1, yang kemudian mensekresikan sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-8, IL-12, dan TNF- α .⁸² Selain NF- κ B, PKC dan p38 MAPK juga termasuk molekul utama yang diaktifkan oleh MDA, yang semakin memperburuk inflamasi.⁸¹

Pada penelitian ini, kombinasi SMSCs dan air alkali terbukti mampu menurunkan kadar MDA pada tikus model DMT2, dengan kadar MDA paling rendah ditemukan pada perlakuan kombinasi SMSCs dan air alkali (gambar 5.4). Hasil ini menunjukkan bahwa air alkali mampu meningkatkan efektivitas SMSCs dalam menekan inflamasi, terutama dengan mengurangi stress oksidatif yang berkontribusi terhadap aktivasi jalur NF- κ B. Penurunan inflamasi yang ditandai dengan penurunan kadar MDA diduga terkait dengan kandungan sitokin antiinflamasi dalam SMSCs, diantaranya IL-10 dan TGF β .⁵¹ IL-10 yang terdapat dalam SMSCs dapat menghambat aktivasi NF- κ B melalui mekanisme IL-10

STAT3 *pathways*.⁸² IL-10 akan berikatan dengan IL-10R, mengaktifkan JAK1 yang kemudian menginduksi fosforilasi STAT3. Protein STAT3 akan masuk ke dalam nucleus dan mengaktifasi sekuens mRNA SOCS3 kemudian yang akan diekspresikan secara intraseluler dan menekan jalur persinyalan NF- κ B, sehingga terjadi penurunan ekspresi sitokin proinflamasi.

Selain IL-10, TGF β mampu menghambat aktivasi NF- κ B dengan berbagai jalur persinyalan, diantaranya jalur Smad, inhibisi TAK1, dan peningkatan I κ B α .^{83–85} Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa SMSCs mampu menurunkan sitokin proinflamasi IL-18 dan TNF- α pada tikus model diabetes mellitus.⁸⁶ Selain penggunaan SMSCs dosis tunggal, kombinasi SMSCs dengan air alkali mampu menunjukkan efek yang lebih signifikan dalam menekan inflamasi yang ditandai dengan penurunan level MDA. Hal ini konsisten dengan penelitian sebelumnya dimana air alkali mampu menurunkan proinflammatory sitokin pada sel *human kidney* (HK)-2 melalui jalur JAK/STAT.⁸⁷ Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa air alkali diketahui mampu menurunkan kadar MDA pada liver tikus model T2DM.⁸⁸ Evaluasi kadar MDA pada penderita diabetes dapat dijadikan biomarker dari stress oksidatif.⁷⁵ Oleh karena itu, penurunan kadar MDA dalam penelitian ini dapat menunjukkan bahwa pemberian SMSCs dikombinasikan dengan air alkali mampu secara signifikan menekan efek stress oksidatif, yang berkontribusi dalam perbaikan kondisi inflamasi dan metabolic pada DMT2.

Peningkatan ekspresi subunit p65, berkontribusi terhadap regulasi berbagai sitokin proinflamasi,⁶ sehingga memperburuk inflamasi dan mempercepat progresivitas DMT2. Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal

SMSCs dan dikombinasi dengan air alkali mampu menurunkan kadar p65 pada tikus model DMT2 (gambar 5.5). Hal ini diduga karena terdapat sitokin anti-inflamasi didalam SMSCs yang akan berinteraksi dengan p65, seperti TGF β .⁸³ TGF β akan berikatan dengan TGF β reseptor II dan II (TGF β 1/ TGF β 2) yang kemudian akan mengaktifkan jalur Smad2/3, fosforilasi Smad2/3 akan membentuk komplek dengan Smad4, kemudian masuk kedalam nukleus dan menghambat ekspresi transkrip faktor p65, sehingga menekan ekspresi oleh NF- κ B.⁸³ TGF β juga menghambat TAK1, sehingga p65 tetap terikat dengan I κ B dalam keadaan inaktif, sehingga p65 tidak dapat masuk kedalam nucleus.⁸⁴ Selain itu TGF β dapat meningkatkan ekspresi I κ B α , sehingga mengakibatkan NF- κ B tidak bisa berpindah menuju nucleus dan berikatan dengan p65.⁸² Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya dimana SMSCs menurunkan kadar p65 dan TNF- α pada tikus model inflamasi.⁸⁹ Ekspresi p65 paling rendah ditunjukkan pada kelompok perlakuan kombinasi SMSCs dan air alkali, hal ini menunjukkan bahwa air alkali meningkatkan efektivitas SMSCs dalam menekan ekspresi sitokin proinflamasi. Air alkali diketahui mampu menurunkan p65 pada penelitian sebelumnya⁹⁰ begitupula dengan SMSCs,⁹¹ kombinasi keduanya diketahui efektif dalam menurunkan ekspresi p65 dalam penelitian ini.

Terapi berbasis SMSCs dikombinasikan dengan air alkali berpotensi menjadi alternatif terapi untuk DMT2, terutama dalam mengurangi komplikasi akibat stres oksidatif dan inflamasi kronis. Pengurangan ekspresi p65 dapat mencegah komplikasi DMT2, seperti retinopati diabetik, nefropati diabetik, dan neuropati diabetik. Rekomendasi penelitian lanjutan penelitian ini adalah studi

lebih lanjut mengenai dosis optimal dan mekanisme seluler lebih mendalam dari efek terapi ini. Analisis efek jangka panjang dari SMSCs dan air alkali terhadap regenerasi pankreas dan homeostasis glukosa juga perlu dilakukan.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian SMSCs pada dosis 500 μ l yang dikombinasi dengan air alkali mampu menurunkan kadar MDA pada tikus jantan galur wistar model DMT2.
2. Pemberian SMSCs pada dosis 500 μ l yang dikombinasi dengan air alkali mampu menurunkan ekspresi gen p65 pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

6.2 Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengukuran kadar IL-10 setelah dilakukan pemberian kombinasi SMSCs dan air alkali pada tikus jantan galur wistar model DMT2.
2. Penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ke manusia karena keterbatasan penelitian pada hewan coba.
3. Perlu dilakukan penelitian histopatologi sel β pankreas pada tikus jantan galur wistar model DMT2.

DAFTAR PUSTAKA

1. Banerjee M. Genetic polymorphisms of cytokine genes in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014;5:493.
2. Madi M, Babu S, Kumari S, Shetty S, Achalli S, A M. Status of Serum and Salivary Levels of Superoxide Dismutase in Type 2 Diabetes Mellitus with Oral Manifestations: A Case Control Study. *Ethiop J Health Sci*. 2016;26:523–32.
3. O NB, H B, K E amadi, F E, N N. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Levels in Patients with Long Standing Type 2 Diabetes in Port Harcourt, Rivers State, Nigeria. *Int J Sci Res IJSR*. 2016;5:1282–8.
4. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2014;1840:2709–29.
5. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281:16–35.
6. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res*. 2018;11:407–19.
7. Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, IL-1 β GMKS. IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm*. 2006;2006:1–6.
8. Sapra A, Bhandari P. *Diabetes Mellitus*. StatPearls Publishing; 2021.
9. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37:81–90.
10. Pareek S. Prevalence of Pre-diabetes and Diabetes mellitus among the Northern Railway Employees: A retrospective study. *Int J Adv Nurs Manag*. 2017;5:347.
11. W.H.O. Proportional mortality (% of total deaths, all ages) in Diabetes Mellitus. World Health Organization; 2016. 1 p.
12. Kumar NP, Moideen K, George PJ, Dolla C, Kumaran P, Babu S. Coincident diabetes mellitus modulates Th1-, Th2-, and Th17-cell responses in latent tuberculosis in an IL-10- and TGF- β -dependent manner. *Eur J Immunol*. 2016;46:390–9.
13. Janež A, Guja C, Mitrakou A, Lalic N, Tankova T, L C. Insulin Therapy in Adults with Type 1 Diabetes Mellitus: a Narrative Review. *Diabetes Ther*. 2020;11:387–409.

14. Bajgai J, Kim CS, Rahman MH, Jeong ES, Jang HY, KE K. Effects of Alkaline-Reduced Water on Gastrointestinal Diseases. *Processes*. 2022;10.
15. Lee M, Fadriqela A, Antonio JM, Kim CS, Cho IY, KE K. Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults. *Processes*. 2022;10.
16. Hoare M, Ito Y, Kang TW, Weekes MP, Matheson NJ, DA P. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol*. 2016;18:979–92.
17. Prayitno GD, Lestari K, Sartika CR, Djuwantono T, Widjaya A, R M. Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment: A Systematic Review. *Medicines*. 2022;10:3.
18. Utami A, Putra A, Wibowo JW, Amalina ND, Satria Irawan RC. Hypoxic secretome mesenchymal stem cells inhibiting interleukin-6 expression prevent oxidative stress in type 1 diabetes mellitus. *Med Glas Zenica*. 2023;20.
19. Munoz-Perez E, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Mesenchymal stromal cell secretome for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: Latest trends in isolation, content optimization and delivery avenues. *Pharmaceutics*. 2021;13.
20. Katuchova J, Harvanova D, Spakova T, Kalanin R, Farkas D, P D. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocr Pathol*. 2015;26:95–103.
21. Gao X, Song L, Shen K, Wang H, Qian M, W N. Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;388:41–50.
22. Motawea SM, Noreldin RI, Naguib YM. Potential therapeutic effects of endothelial cells trans-differentiated from Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells on altered vascular functions in aged diabetic rat model. *Diabetol Metab Syndr*. 2020;12:1–13.
23. Dias I, Pinheiro D, Ribeiro Silva K, Stumbo AC, Thole A, E C. 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.
24. Antonio JM, Fadriqela A, Jeong YJ, Kim CS, Kim SK. Alkaline reduced water attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and innate immune response triggered by intestinal epithelial dysfunction. *Processes*. 2021;9.

25. Rias YA, Kurniawan AL, Chang CW, Gordon CJ, Tsai HT. Synergistic effects of regular walking and alkaline electrolyzed water on decreasing inflammation and oxidative stress, and increasing quality of life in individuals with type 2 diabetes: A community based randomized controlled trial. *Antioxidants*. 2020;9:1–17.
26. KA L, GLV O, JNU Y, DG P, JTC A, WA S. Transcriptional profiling reveals intrinsic mRNA alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:1–17.
27. Ribot J, Caliaperoumal G, Paquet J, Boisson-vidal C, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J Cell Mol Med*. 2017;21:349–63.
28. Kornicka K, Houston J, Marycz K. Dysfunction of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetic Patients as Result of Oxidative Stress and Autophagy may Limit Their Potential Therapeutic Use. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14:337–45.
29. Yu S, Cheng Y, Zhang L, Yin Y, Xue J, B L. Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10:1–18.
30. Putra A, Suwiryo ZH, Muhar AM, Widyatmoko A, Rahmi FL. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Regulating PDGF and VEGF during Pancreatic Islet Cells Regeneration in Diabetic Animal Model. *Folia Med (Plovdiv)*. 2021;63:875–83.
31. Lotfi A, Shahryar HA, Ebrahimnezhad Y, Shayegh J. Effect of in ovo ghrelin administration on serum malondialdehyde level in newly-hatched chickens. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2:47–9.
32. Morales M, Malondialdehyde MBS. Facts and Artifacts. *Plant Physiol*. 2019;180:1246–50.
33. Xing X, Dan Y, Xu Z, Xiang L. Implications of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Treatment of Hyperpigmentation Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;
34. Santosa IE, Harmita DANI. Pengukuran Etilen Hasil Proses Peroksidasi Lipid pada Biocream yang Diinduksi Sinar Ultraviolet menggunakan Detektor Fotoakustik.
35. GM CTP, IN GBRMH, IA GTI, MU Y, SA AS, AB SS. Potensi Ekstrak *Spirulina platensis* sebagai Tabir Surya terhadap Paparan Ultraviolet B

Potency of *Spirulina platensis* Extract as Sunscreen on Ultraviolet B Exposure. 2020.

36. Ansarin K, Khoubnasabjafari M, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*. 2017;5:123–7.
37. Maurya RP, Prajapat MK, Singh VP, Roy M, Todi R, S B. Serum Malondialdehyde as a Biomarker of Oxidative Stress in Patients with Primary Ocular Carcinoma: Impact on Response to Chemotherapy. *Clin Ophthalmol*. 2021;15:871–9.
38. Astari L, Cahyono H, Widjanto 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;7:286–92.
39. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, S P. The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *Eur Cardiol Rev*. 2019;14:50–9.
40. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, YJ C. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol*. 2006;72:850–9.
41. Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, CH P. Poly(I: C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2015;80:54–60.
42. Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, Iddamalgoda A, Ito K, H K. Protecting Skin Photoaging by NF- κ B Inhibitor. *Curr Drug Metab*. 2010;11:431–5.
43. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomark*. 2013;2013:1–8.
44. Zóka A, Muzes G, Somogyi A, Varga T, Szémán B, Z AA. Altered immune regulation in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*. 2013;
45. Kuo YH, Chen CW, Chu Y, Lin P, Chiang HM. In vitro and in vivo studies on protective action of N-phenethyl caffeamide against photodamage of skin. *PLoS ONE*. 2015;10:1–13.
46. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, C F. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12:218–26.

47. Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. R&D systems; 2018.
48. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment. Stem Cells Metastasis. 2011;
49. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med.* 2019;38:164.
50. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol.* 2019;10:1–10.
51. Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014. p. 135–56.
52. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. Vol. 2. *Curr Stem Cell Rep*; 2016. 168–173 p.
53. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Approach for Diabetes and Pancreatic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 16;19(9):2783.
54. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M, 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 Feb 15;7(3):305–10.
55. 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;12:1–14.
56. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells.* 2019;8:467.
57. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6:552.
58. Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H, et al. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep.* 2017 Apr 20;7(1):991.
59. Range K, D.M.Y.A.M. 基因的改变 NIH Public Access. Vol. 23. *Bone*; 2012. p. 1–7.

60. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, HY K. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *J Formos Med Assoc.* 2017;116:351–8.
61. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1482–91.
62. Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct interaction with Smad4 protein. *J Biol Chem.* 2013;288:8737–49.
63. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280:1196–202.
64. Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1–15.
65. Zhou Q, Xu H, Yu W, Li E, Wang M. Anti-inflammatory effect of an apigenin-maillard reaction product in macrophages and macrophage-endothelial cocultures. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
66. Gomes KB. IL-6 and type 1 diabetes mellitus: T cell responses and increase in IL-6 receptor surface expression. *Ann Transl Med.* 2017;5(1):16–8.
67. Ibrahim MM, Bond J, Bergeron A, Miller KJ, Ehanire T, C Q. A novel immune competent murine hypertrophic scar contracture model: A tool to elucidate disease mechanism and develop new therapies. *Wound Repair Regen.* 2014;22:755–64.
68. Fardhani IM, Firdaus J, Febianti Z, Hairrudin H, Abrori C, Sakinah EN. THE EFFECT OF NEEM GUM ON THE REDUCTION IN RAT BLOOD GLUCOSE LEVELS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN. *Bul Vet Udayana.* 2023 Jul 23;982.
69. Jiménez-Maldonado A, García-Suárez PC, Rentería I, Moncada-Jiménez J, Plaisance EP. Impact of high-intensity interval training and sprint interval training on peripheral markers of glycemic control in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2020 Aug 1;1866(8):165820.

70. Mann DL. Chapter 11 - Activation of Inflammatory Mediators in Heart Failure. In: Mann DL, editor. Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition) [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2011 [cited 2025 Feb 4]. p. 163–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416058953100117>
71. Sulaiman AG, Sangging PRA. Malondialdehyde (MDA) sebagai Marker Stres Oksidatif Berbagai Penyakit.
72. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update. *Molecules*. 2023 Aug 9;28(16):5979.
73. Hou Y, Lin M, Qiu X, He M, Zhang Y, Guo F. Effect of Type-2 Diabetes Mellitus in Retinopathy Patients on MDA, SOD Activity and its Correlation with HbA1c. *Braz Arch Biol Technol*. 2022 Jan 5;64:e21200075.
74. Shirzaei M, Dalirsani Z. The effect of glycemic control on salivary lipid peroxidation in type II diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2019 May 1;13(3):1991–4.
75. Shawki HA, Elzebery R, Shahin M, Abo-hashem EM, Youssef MM. Evaluation of some oxidative markers in diabetes and diabetic retinopathy. *Diabetol Int*. 2020 Jun 27;12(1):108–17.
76. Andreadi A, Muscoli S, Tajmir R, Meloni M, Muscoli C, Ilari S, et al. Recent Pharmacological Options in Type 2 Diabetes and Synergic Mechanism in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan;24(2):1646.
77. Polaka S, Katare P, Pawar B, Vasdev N, Gupta T, Rajpoot K, et al. Emerging ROS-Modulating Technologies for Augmentation of the Wound Healing Process. *ACS Omega*. 2022 Sep 6;7(35):30657–72.
78. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017 Dec 14;9(6):7204–18.
79. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018 Aug 13;18(4):e27.
80. Dlodla PV, Mabhida SE, Ziqubu K, Nkambule BB, Mazibuko-Mbeje SE, Hanser S, et al. Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: Implications of inflammation and oxidative stress. *World J Diabetes*. 2023 Mar 15;14(3):130–46.
81. Raghavan S, Subramaniam G, Shanmugam N. Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2012;92(5):1055–67.

82. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017 Jul 14;2(1):1–9.
83. Said MM, Azab SS, Saeed NM, El-Demerdash E. Antifibrotic Mechanism of Pinocembrin: Impact on Oxidative Stress, Inflammation and TGF- β /Smad Inhibition in Rats. *Ann Hepatol*. 2018 Mar 1;17(2):307–17.
84. Choi ME, Ding Y, Kim SI. TGF- β signaling via TAK1 pathway: Role in kidney fibrosis. *Semin Nephrol*. 2012 May;32(3):244–52.
85. Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM. TGF β /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells*. 2019 Aug 24;8(9):969.
86. Irawan RCS, Putra A, Setyo T, Ghaisani SS, Hidayah N. Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells decrease tumor necrosis factor- α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes mellitus model rats. *Universa Med*. 2023 Dec 23;42(3):320–8.
87. Sharma S, Lee KJ, Bajgai J, Trinh TT, Antonio JM, Rahman MH, et al. Anti-Oxidative and Anti-Diabetic Effects of Electrolyzed Weakly Alkaline Reduced Water on Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Processes*. 2022 Oct;10(10):2025.
88. Huang CH, Chao YC, Chiang MT. Influence of Alkaline Reduced Water Supplementation on Glucose and Lipid Metabolism in Non-Diabetic and Diabetic Rats. *Nutrients*. 2024 Nov 27;16(23):4082.
89. Faculty of Medicine, Sultan Agung Islamic University, St Kaligawe KM 4 Semarang 50012, Indonesia, Octavianti Y, Munir D, Faculty of Medicine, Sultan Agung Islamic University, St Kaligawe KM 4 Semarang 50012, Indonesia, Sumarawati T, Faculty of Medicine, Sultan Agung Islamic University, St Kaligawe KM 4 Semarang 50012, Indonesia. The Effect of Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) in Reducing P65 and TNF-A Gene Expression in Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Multidiscip Res Anal [Internet]*. 2024 Jan 6 [cited 2025 Feb 6];07(01). Available from: <https://ijmra.in/v7i1/4.php>
90. Chen J, Xu XW, Kang JX, Zhao BC, Xu YR, Li JL. Metasilicate-based alkaline mineral water confers diarrhea resistance in maternally separated piglets via the microbiota-gut interaction. *Pharmacol Res*. 2023 Jan 1;187:106580.
91. Mayasari YI, Subchan P, Putra A, Chodijah C, Hussana A, Sumarawati T, et al. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells Inhibited Ultraviolet Radiation by Inhibiting Interleukin-6 through Nuclear Factor-Kappa Beta Pathway in Hyperpigmentation Animal Models. *Open Access Maced J Med Sci*. 2023 Jan 19;11(A):188–94.