

**PENGARUH *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS* (SH-MSC) DAN *ALKALINE WATER*
TERHADAP EKSPRESI GLUT4 DAN FOXO1**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model
Diabetes Melitus Tipe 2)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister Ilmu Biomedik



Magister Ilmu Biomedik

Dian Fatmawati

MBK. 2322010401

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

HALAMAN PENGESAHAN
TESIS
PENGARUH SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS
(SH-MSC) DAN ALKALINE WATER TERHADAP EXPRESI GLUT4 DAN
FOXO1
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Diabetes Tipe
2)

Disusun oleh :

Dian Fatmawati

MBK. 2322010401

Yang dipertahankan di depan tim penguji pada 20 Februari 2025 dan dinyatakan
telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I,



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

NIK. 210123160

Pembimbing II,



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

NIK. 210199050

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung



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

NIK. 210123160

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 atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 13 Februari 2025



Dian Fatmawati

ABSTRAK

Latar Belakang: Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) ditandai dengan resistensi insulin yang berhubungan dengan gangguan ekspresi GLUT4 dan FOXO1. Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) dan air alkali diketahui memiliki potensi sebagai terapi alternatif dengan sifat antiinflamasi dan antioksidan. Tujuan penelitian ini mengevaluasi pengaruh kombinasi SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi GLUT4 dan FOXO1 pada tikus jantan galur Wistar model DMT2.

Metode: Studi eksperimental dengan rancangan post-test only control group. Sebanyak 25 tikus dibagi menjadi lima kelompok: kontrol sehat (K1), kontrol DMT2 +NaCl (K2), DMT2 + metformin (K3), DMT2 + SH-MSC (K4), dan DMT2 + SH-MSC + air alkali (K5). Ekspresi GLUT4 dan FOXO1 dianalisis menggunakan qRT-PCR setelah 29 hari perlakuan.

Hasil: Hasil: Penelitian menunjukkan bahwa ekspresi GLUT4 meningkat pada kelompok perlakuan, dengan nilai tertinggi pada K5 ($27,97 \pm 10,93$), diikuti K4 ($21,70 \pm 10,57$). Uji statistik menunjukkan perbedaan signifikan antara K4 dan K2 ($p < 0,05$), sementara K5 berbeda signifikan dibandingkan K2 dan K3. Ekspresi FOXO1 tertinggi pada K2 ($15,36 \pm 2,14$), sedangkan K5 ($2,82 \pm 1,50$) memiliki ekspresi terendah di antara kelompok T2DM. Uji statistik menunjukkan K5 berbeda signifikan dibandingkan K2 dan K3 ($p < 0,05$). Kombinasi SH-MSC dan air alkali tidak menunjukkan perbedaan signifikan dibanding SH-MSC saja pada ekspresi GLUT4 dan FOXO1.

Kesimpulan: Pemberian SH-MSC dan air alkali berpotensi sebagai terapi tambahan dalam pengelolaan DMT2 dengan meningkatkan ekspresi GLUT4 dan menekan ekspresi FOXO1.

Kata kunci: Air Alkali, Diabetes Melitus Tipe 2, FOXO1, GLUT4, *Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells*.

ABSTRACT

Background: Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is characterized by insulin resistance associated with dysregulated expression of GLUT4 and FOXO1. Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC) and alkaline water have potential as alternative therapies due to their anti-inflammatory and antioxidant properties. This study evaluate the effect of SH-MSC and alkaline water combination on GLUT4 and FOXO1 expression in Wistar rats with T2DM.

Methods: An experimental study with a post-test only control group design. A total of 25 rats were divided into five groups: healthy control (K1), T2DM + NaCl control (K2), T2DM + metformin (K3), T2DM + SH-MSC (K4), and T2DM + SH-MSC + alkaline water (K5). GLUT4 and FOXO1 expression was analyzed using qRT-PCR after 29 days of treatment.

Results: Results: This study demonstrated an increase in GLUT4 expression in the treatment groups, with the highest levels observed in K5 (27.97 ± 10.93), followed by K4 (21.70 ± 10.57). Statistical analysis revealed a significant difference between K4 and K2 ($p < 0.05$), while K5 was significantly different from K2 and K3. FOXO1 expression was highest in K2 (15.36 ± 2.14), whereas K5 (2.82 ± 1.50) had the lowest expression among T2DM groups. Statistical tests confirmed a significant difference between K5 and both K2 and K3 ($p < 0.05$). The combination of SH-MSCs and alkaline water showed no significant difference compared to SH-MSCs alone in GLUT4 and FOXO1 expression.

Conclusion: SH-MSC and alkaline water have potential as adjunct therapies in T2DM management by enhancing GLUT4 expression and suppressing FOXO1 expression.

Keywords: Alkaline Water, FOXO1, GLUT4, Secretome Hypoxia-Mesenchymal Stem Cells, Type 2 Diabetes Mellitus.

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 *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSC) dan *Alkaline Water* Terhadap Ekspresi GLUT4 dan FOXO1 (Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Diabetes Melitus 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 dan dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk

membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

4. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku pembimbing II dalam penelitian sekaligus Ketua Program Studi Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji I yang telah memberikan masukan dan saran dalam penulisan dan penyelesaian tesis
6. Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji II yang telah memberikan masukan dan saran dalam penulisan dan penyelesaian tesis
7. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku penguji III yang telah memberikan masukan dan saran dalam penulisan dan penyelesaian tesis
8. Seluruh dosen di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberikan masukan dan sara dalam penulisan tesis
9. 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.
10. Orang tua tercinta, Bapak Alm. H. E. Nursholeh, Ibu Hj. Eneng Mardianah, suami dan anaK2anak yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa, sehingga saya dapat menyelesaikan proposal tesis ini.
11. 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, 13 Februari 2025

Dian Fatmawati



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
ABSTRAK	v
<i>ABSTRACT</i>	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat penelitian	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 <i>Diabetes Melitus</i>	8
2.2. Glucose Transporter 4 (GLUT4)	15
2.3. FOXO1	18
2.4 <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC)</i>	22
2.5 Air Alkali	26
BAB III	28
3.1 Kerangka Teori	28
3.2 Kerangka Konsep	30
3.3 Hipotesis	30
BAB IV	31
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	31
4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	32

4.3	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	34
4.4	Alat dan Bahan	37
4.5	Cara Penelitian.....	38
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian	47
4.7	Analisa Data	47
4.8	Alur Penelitian.....	48
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN		49
5.1	Hasil Penelitian.....	49
5.2	Pembahasan	58
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN		62
6.1.	Kesimpulan.....	62
6.2.	Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA		63
LAMPIRAN.....		73



DAFTAR SINGKATAN

AMPK	: <i>Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase</i>
AS160	: <i>Akt Substrate of 160 kDa</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
DMT1	: <i>Diabetes Melitus Tipe 1</i>
DMT2	: <i>Diabetes Melitus Tipe 2</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FOXO1	: <i>Forhead Box O1</i>
FOXO1 α	: <i>Hypoxia Inducible Factor 1-α</i>
G6Pase	: <i>Glucose-6-Phosphatase</i>
GAP	: <i>GTPase-Activating Protein</i>
GAPDH	: <i>Gliseraldehyd-3-fosfat dehidrogenase</i>
GIP	: <i>Gastric Inhibitory Polypeptide</i>
GLP-1	: <i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GLUT4	: <i>Glucose Transporter 4</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
GSH-Px	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroxidase</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IDF	: <i>International Diabetes Federation</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IGF-1	: <i>Insulin Growth Factor-1</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IR	: <i>Insulin Receptor</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MnSOD	: <i>Manganese Superoxide Dismutase</i>
mTOR	: <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NA	: <i>Nicotinamide</i>

NAD(P)H	: <i>Nikotinamida Adenina Dinukleotida Fosfat</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
OH	: <i>Hidroksida</i>
ONOO	: <i>Peroxynitrite</i>
OS	: <i>Oxidative Stress</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDSH	: <i>PhosphoGLUT4itide Dependent Kinase-1</i>
PEPCK	: <i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>
PI3K/AKT	: <i>PhosphoGLUT4itide 3-Kinase/Protein Kinase B</i>
PIK5	: <i>Phosphatidyl-inositol-3,4-bisphosphate</i>
PIP3	: <i>Phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphate</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SGLT2	: <i>Sodium Glucose Cotransporter 2</i>
SH-MSC	: <i>Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells</i>
SLC2A	: <i>Solute Carrier Family 2</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-β</i>
VEGF	: <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1. Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 4. 1. Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i>	44
Tabel 5. 1. Profil Sitokin SH-MSC	52
Tabel 5. 2. Hasil Validasi Tikus Diabetes Tipe 2.....	52
Tabel 5. 3. Hasil Analisis Statistik Data Ekspresi GLUT4	58
Tabel 5. 4. Hasil Analisis LSD Ekspresi GLUT4.....	58
Tabel 5. 5. Hasil Analisis Statistik Data Ekspresi FOXO1	60
Tabel 5. 6. Hasil Analisis LSD Ekspresi FOXO1	60



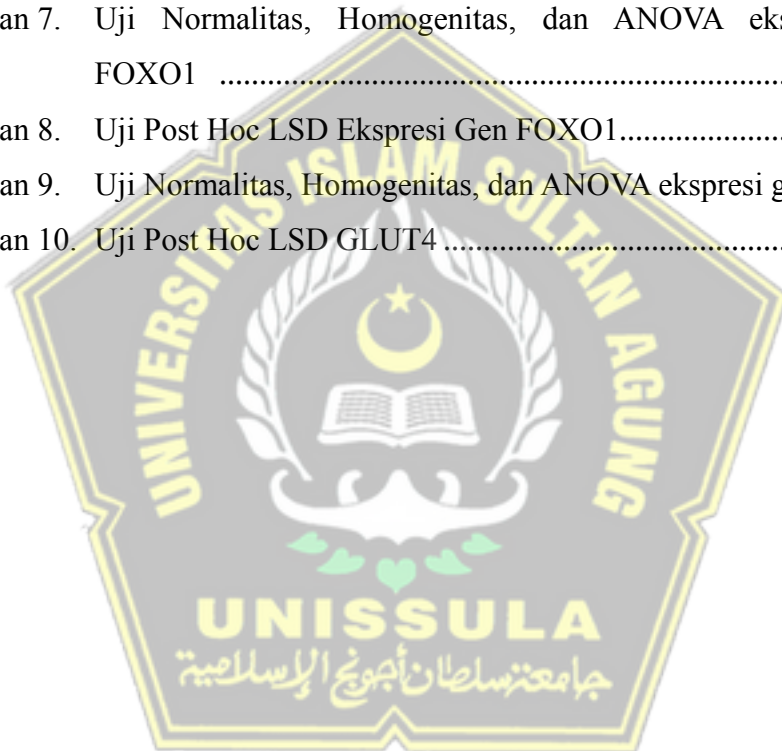
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Interaksi Antara Mitokondria pada DMT2.....	9
Gambar 2. 2. Patofisiologi Diabetes Melitus	11
Gambar 2. 3. Aktivasi Glukosa GLUT4 Transporter oleh Insulin	17
Gambar 2. 4. PI3K/AKT/FOXO Signaling Pathway	20
Gambar 2. 5. Peran AMPK dalam Proses Penyerapan DMT2.....	23
Gambar 3. 1. Kerangka Teori	29
Gambar 3. 2. Kerangka Konsep	30
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	31
Gambar 4. 2 Alur Penelitian.....	48
Gambar 5. 1. Karakteristik MSC.....	50
Gambar 5. 2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi.....	51
Gambar 5. 3. Perbandingan Ekspresi Relatif Gen GLUT4.....	59
Gambar 5. 4. Perbandingan Ekspresi Relatif Gen FOXO1.....	61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearance</i>	73
Lampiran 2.	Surat Keterangan Penelitian	74
Lampiran 3.	Hasil Analisis	75
Lampiran 4.	Dokumentasi Kegiatan	76
Lampiran 5.	Dokumentasi kegiatan Validasi GDP	77
Lampiran 6.	Dokumentasi Kegiatan Penelitian	79
Lampiran 7.	Uji Normalitas, Homogenitas, dan ANOVA ekspresi gen FOXO1	80
Lampiran 8.	Uji Post Hoc LSD Ekspresi Gen FOXO1.....	81
Lampiran 9.	Uji Normalitas, Homogenitas, dan ANOVA ekspresi gen GLUT4	82
Lampiran 10.	Uji Post Hoc LSD GLUT4	83



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus tipe 2 (DMT2) merupakan kondisi terjadinya resistensi insulin akibat gangguan translokasi GLUT4 ke membran plasma, yang mengakibatkan menurunnya pengambilan glukosa oleh sel otot dan adiposa¹⁻⁴. Faktor-faktor yang berkontribusi pada gangguan translokasi GLUT4 salah satunya terjadi ekspresi berlebih dari FOXO1 yang terjadi akibat adanya peradangan kronis dan stres⁵⁻⁷. Gangguan pada kedua protein ini menyebabkan hiperglikemia. Oleh karena itu, menurunkan inflamasi dan stres oksidatif menargetkan perbaikan ekspresi GLUT4 dan FOXO1 dalam DMT2. Sisi lain, secretome mesenchymal stem cell dalam kondisi hipoksia (SH-MSC) telah banyak dikaji mampu menurunkan inflamasi kronis yang terjadi⁸⁻¹¹, serta air alkali dilaporkan mampu menurunkan stres oksidatif akibat radikal bebas¹²⁻¹⁴, sehingga kombinasi SH-MSC dan air alkali diharapkan mampu menurunkan inflamasi kronis dan stres oksidatif yang terjadi pada DMT2. Namun demikian, peran SH-MSC yang dikombinasi air alkali terhadap kadar GLUT4 dan FOXO1 masih belum dikaji.

DM merupakan masalah kesehatan dunia karena prevalensi dan insidensi penyakit yang terus meningkat, baik di negara maju maupun negara berkembang termasuk Indonesia. Berbagai penelitian epidemiologi menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan angka insidensi dan

prevalensi DM di berbagai penjuru dunia. Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF) tahun 2021 prevalensi penderita DM di dunia sebanyak 536,6 juta atau 10,5% hidup dengan DM dan diperkirakan akan meningkat sebesar 783,2 juta atau menjadi 12,2% dari jumlah penduduk dunia pada tahun 2045. Sedangkan berdasarkan data IDF 2021 terjadi peningkatan penderita Diabetes di Indonesia dimana Indonesia menempati urutan ke 5 dunia dan urutan ke 3 di Asia Tenggara dengan penderita sebanyak 11,3% dari jumlah usia 20 sampai 79 tahun. Dari 90% kasus *Diabetes Melitus* yang ada, 80% menderita DMT2.¹⁵

Pengobatan DMT2 yang menjadi standar pengobatan saat ini meliputi metformin, sulfonilurea, dan SGLT2 inhibitor, masing-masing memiliki efek samping, seperti diare, hipoglikemia, dan infeksi. Hal ini menyebabkan penting untuk mencari terapi yang tidak menimbulkan efek samping untuk meminimalkan risiko dan meningkatkan kualitas hidup pasien secara lebih aman dan berkelanjutan¹⁶.

Berbagai penelitian terkini melaporkan bahwa *Secretome Hypoxia* dari *Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSC) mengandung sitokin dan *growth factor* seperti IL-10, TGF- β , HGF, dan VEGF yang mendukung perbaikan jaringan dan regenerasi sel beta pankreas.⁸⁻¹¹ Protein dalam SH-MSC memodulasi jalur sinyal seperti insulin/IGF, PI3K/AKT, dan NF- κ B, yang terlibat dalam regulasi glukosa, diferensiasi sel beta pancreas, dan respon inflamasi, sehingga berpotensi menurunkan peradangan, memperbaiki

fungsi sel beta pancreas hingga mengurangi resistensi insulin pada penderita DMT2⁸⁻¹¹.

Air alkali diketahui memiliki fungsi sebagai antioksidan secara *in-vitro* karena sifat bioaktifnya. Air alkali yang mengandung banyak ion hidroksida (OH^-) mampu mengurangi kadar radikal bebas dalam tubuh sehingga menurunkan stres oksidatif. Penelitian terdahulu telah melaporkan bahwa air alkali mampu mengontrol gula darah pada pasien diabetes. Namun demikian, belum dikaji mekanisme bagaimana air alkali menurunkan kadar gula pada penderita diabetes^{13,17,18}.

Penelitian terdahulu telah menemukan adanya peran SH-MSC dan air alkali dalam menekan inflamasi serta diabetes, namun demikian kombinasi antar kedua terapi tersebut belum dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kombinasi SH-MSC dan air alkali dalam meningkatkan GLUT4 dan menekan FOXO1 pada tikus model DMT2.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian SH-MSC dan Air Alkali terhadap GLUT4 dan FOXO1 pada Tikus Jantan Galur Wistar Model Diabetes Tipe 2?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSC dan Air Alkali terhadap peningkatan ekspresi GLUT4 dan penurunan

aktivitas FOXO1 pada Tikus Jantan Galur Wistar Model *Diabetes Melitus* Tipe 2.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Penelitian ini bertujuan membuktikan adanya peningkatan ekspresi GLUT4 pada Tikus Jantan Galur Wistar Model *Diabetes Melitus* Tipe 2 yang diberikan SH-MSC dosis 500 µl dan Air Alkali 5 mL secara oral.
- b. Penelitian ini bertujuan membuktikan adanya penurunan aktivitas FOXO1 pada Tikus Jantan Galur Wistar Model *Diabetes Melitus* Tipe 2 yang diberikan SH-MSC dosis 500 µl dan Air Alkali 5 mL secara oral.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Manfaat didapat dari penelitian ini adalah adanya hasil ilmiah peran SH-MSC dan Air Alkali terhadap peningkatan ekspresi GLUT4 dan penurunan aktivitas FOXO1 pada Tikus Jantan Galur Wistar yang mengalami *diabetes melitus* tipe 2.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan bermanfaat bagi masyarakat mengenai kegunaan SH-MSC dan Air Alkali pada penderita DMT2. Bagi praktisi kesehatan, hasil penelitian ini diharapkan

dapat memberikan wawasan baru terkait potensi terapi dengan SH-MSC dan Air Alkali sebagai agen anti inflamasi dan antioksidan bagi individu yang mengalami diabetes tipe 2.

1.5. Originalitas Penelitian

Berdasarkan review literatur mengenai penggunaan SH-MSC dan Air Alkali sebagai agen anti inflamasi atau pun regenerasi, beberapa studi terkait telah diidentifikasi dan akan ditampilkan dalam Tabel 1.1. :

Tabel 1. 1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Ribot et al., 2017 ¹⁹	<i>Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition angiogenic Properties</i>	<i>In vivo</i>	Penurunan inflamasi dan perbaikan fungsi pankreas
2	Wicaksono et al., 2020 ¹⁸	<i>The Effects of Alkaline Reduced Water Administration to the Fasting Blood Glucose Levels in Patients with Type 2 Diabetes Melitus</i>	<i>In vivo</i>	Pemberian air pH 9 1L/hari menurunkan kadar gula puasa pada orang DMT2
3	Vivi et al., 2023 ³	<i>GLUT4 as A Protein Target for T2DM Therapy with Natural Compounds</i>	<i>In vitro</i>	Peningkatan translokasi GLUT4 dan pengambilan glukosa dari ekstrak tanaman yang membantu menurunkan kadar glukosa darah pada kondisi DMT2

4	Dwi Agustanti & Purbianto, 2019 ¹³	<i>Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood Sugar Levels of Diabetes Melitus Patients</i>	<i>In vivo</i>	Konsumsi air ph 8,5-9,5 2L/hari dapat menurunkan kadar gula darah puasa pasien DMT2
5	Sun et al., 2018 ²⁰	<i>Human Mesenchymal Stem Cell Derived Secretomes Alleviate Type 2 Diabetes Melitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β-Cell Destruction</i>	<i>In vivo</i>	<i>Secretome Hypoxia</i> MSC mampu merestorasi kerusakan sel beta pankreas dan meningkatkan sensitivitas insulin
6	Rahmi et al., 2021 ⁴	<i>Effect of Exercise Intensity in GLUT4 Expression on Type 2 Diabetes Melitus Rat</i>	<i>In vivo</i>	Peningkatan ekspresi GLUT4 yang lebih tinggi akibat latihan dengan intensitas tinggi yang berimplikasi pada pengelolaan glikemik yang lebih baik pada pasien DMT2
7	Yugal et al., 2009	<i>FOXO1 Plays an Important Role in Enhanced Microvascular Cell Apoptosis and Microvascular Cell Loss in Type 1 and Type 2 Diabetic Rats</i>	<i>In vivo</i>	FOXO1 yang memainkan peran penting dalam hilangnya sel mikrovascular pada retinopati diabetik melalui mekanisme yang dimediasi oleh TNF dan ROS

Penelitian sebelumnya oleh Ribot et al. (2017) menunjukkan

bahwa DMT2 mengubah komposisi secretome MSC, termasuk sifat angiogeniknya, namun belum mengeksplorasi potensi secretome hipoksia dalam memperbaiki resistensi insulin atau mengatur ekspresi gen seperti

FOXO1 dan GLUT4. Sun et al. (2018) membuktikan bahwa secretome MSC dapat mengurangi resistensi insulin dan melindungi sel β -pankreas, tetapi fokusnya belum pada ekspresi gen spesifik yang terlibat dalam jalur metabolik.

Studi terkait air alkali oleh Wicaksono et al. (2020) dan Dwi Agustanti & Purbianto (2019) menunjukkan potensinya dalam menurunkan kadar glukosa darah pasien DMT2, namun tidak meneliti mekanisme molekuler seperti regulasi gen GLUT4, yang berperan penting dalam transport glukosa ke otot, atau FOXO1, yang terkait dengan apoptosis dan disfungsi vaskular pada diabetes seperti yang dilaporkan oleh Yugal et al. (2009). Penelitian lain oleh Rahmi et al. (2021) dan Vivi et al. (2023) telah mengidentifikasi GLUT4 sebagai target penting dalam terapi DMT2, namun tidak meneliti sinergi terapi berbasis air alkali dan SH-MSC, oleh karena itu keterbaruan dari penelitian ini terletak pada kombinasi SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi FOXO1 dan GLUT4, sehingga penelitian ini layak untuk dilakukan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

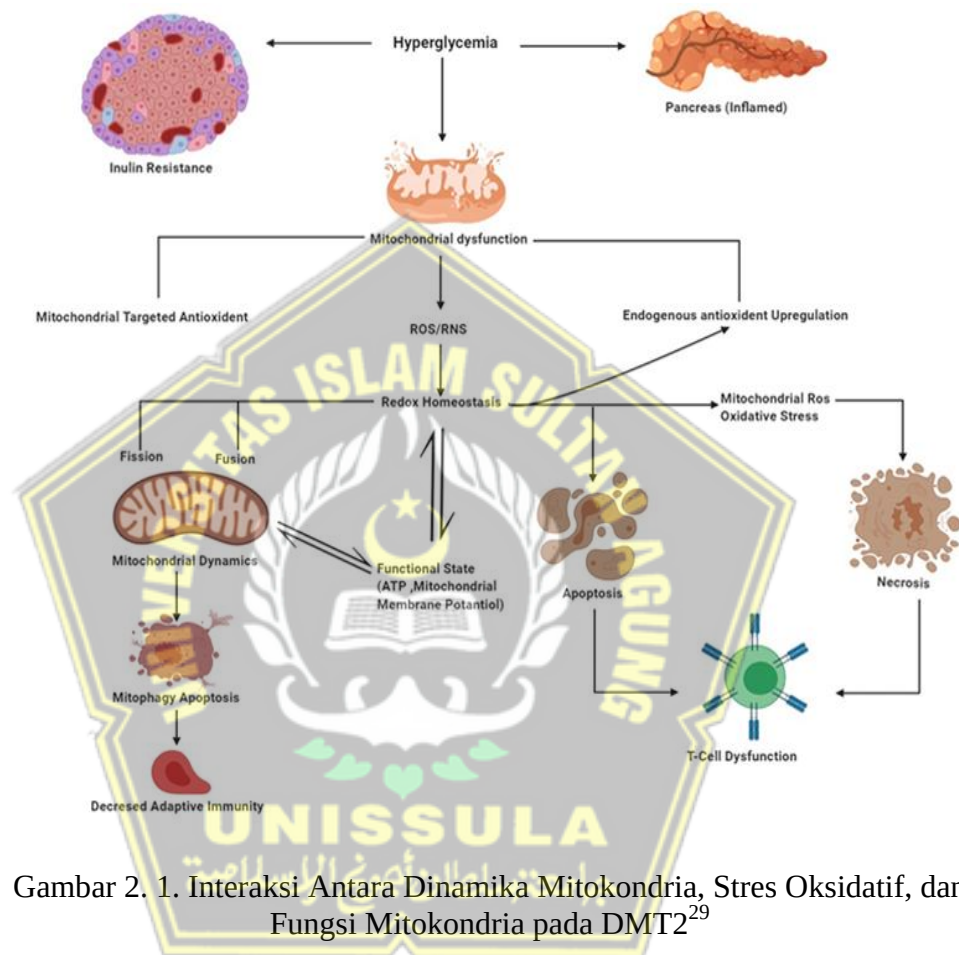
2.1 *Diabetes Melitus*

Diabetes Melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) dan ketidakcukupan produksi atau aksi insulin yang dihasilkan oleh pankreas dalam tubuh²¹. Insulin adalah protein yang disintesis di sel beta pankreas sebagai respons terhadap berbagai rangsangan seperti glukosa, sulfonilurea, dan arginin, namun glukosa adalah penentu utama²². Peningkatan kadar glukosa darah dalam jangka panjang dikaitkan dengan komplikasi makro dan mikro vaskular yang menyebabkan penyakit jantung stroke, kebutaan, dan penyakit ginjal^{21,23}. Selain hiperglikemia, ada beberapa faktor lain yang berperan besar dalam patogenesis diabetes seperti hiperlipidemia dan stress oksidatif yang meningkatkan risiko komplikasi^{21,23,24}.

Oxidative Stress (OS) pada gangguan metabolisme kronis memainkan peran penting dalam patogenesis penyakit DM2.^{25–28}

Oxidative Stress merupakan suatu kondisi yang disebabkan oleh adanya peningkatan produksi radikal bebas atau berkurangnya aktivitas pertahanan antioksidan atau keduanya. Kondisi ini dikenal dengan istilah *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). Pada konsentrasi rendah, ROS dan RNS dianggap sebagai pengatur sinyal utama dan penting untuk aktivitas seluler normal. Produksi ROS dan *Nitric*

Oxide (NO) yang berlebihan dapat menyebabkan keadaan redoks sel menjadi tidak stabil dan dapat menyebabkan kerusakan sel yang *irrevisibel* atau permanen apoptosis^{25–28}.



Gambar 2. 1. Interaksi Antara Dinamika Mitokondria, Stres Oksidatif, dan Fungsi Mitokondria pada DMT2²⁹

Diabetes melitus dapat diklasifikasikan menjadi beberapa jenis seperti²¹:

1. *Diabetes Melitus* tipe 1 (tergantung insulin) disebabkan oleh penghancuran sel beta yang dimediasi oleh sistem imun, yang mengakibatkan kekurangan insulin.
2. *Diabetes idiopatik* adalah diabetes tipe 1 tanpa etiologi yang diketahui dan diwariskan.

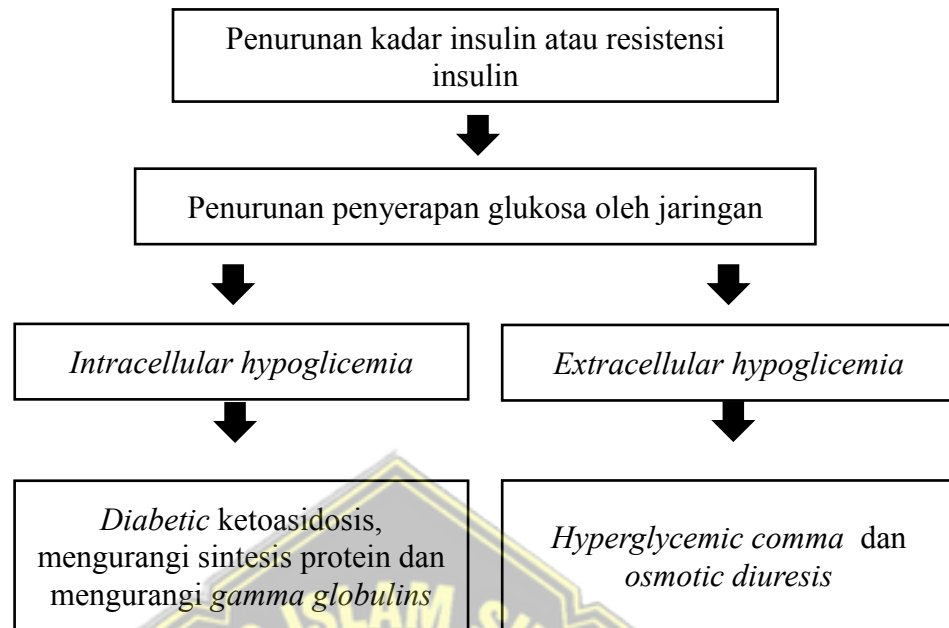
3. *Diabetes Melitus* tipe 2 (tidak tergantung insulin) disebabkan oleh cacat sekresi insulin dan resistensi insulin
4. *Diabetes Melitus* gestasional yaitu segala bentuk intoleransi terhadap glukosa yang muncul atau pertama kali dikenali selama kehamilan.

Namun, diabetes umumnya diklasifikasikan menjadi dua jenis utama, yaitu *Diabetes Melitus* Tipe 1 (DMT1) dan DMT2.

2.1.1. Patofisiologi Diabetes

Kadar glukosa dalam darah terus meningkat setiap kali seseorang makan, hal ini kemudian merangsang sekresi insulin sehingga meningkatkan transportasi, biotransformasi, dan penyimpanan di otot dan jaringan lemak. Dalam kondisi puasa, glukosa dalam darah disediakan oleh hati yang digunakan oleh otak tanpa ketergantungan pada insulin. Selain menyimpan glukosa, insulin juga menghambat sekresi glukagon dan menurunkan konsentrasi asam lemak serum, yang mengakibatkan penurunan produksi glukosa oleh hati^{21,23,24}.

Kekurangan insulin atau resistensi terhadap insulin dalam tubuh mengakibatkan penurunan penyerapan glukosa oleh jaringan, yang menyebabkan hipoglikemia intraseluler dan hiperglikemia ekstraseluler. Hipoglikemia intraseluler menyebabkan glukogenesis dan glukoneogenesis yang mengarah pada ketoasidosis diabetik dan penurunan sintesis gamma globulin, sementara hiperglikemia ekstraseluler menyebabkan koma hiperglikemik dan diuresis osmotik.³⁰⁻³⁴



Gambar 2. 2. Patofisiologi Diabetes Melitus³⁵⁻³⁷

2.1.2. Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes Melitus Tipe 2 ditandai oleh ketidakpekaan terhadap insulin akibat resistensi insulin, penurunan produksi insulin, dan akhirnya kegagalan sel beta pankreas. Hal ini menyebabkan penurunan transportasi glukosa ke hati, sel otot, dan sel lemak, serta peningkatan pemecahan lemak dengan hiperglikemia. Fungsi sel alfa yang terganggu juga diakui dalam patofisiologi DMT2²¹.

Akibat disfungsi ini, kadar glukagon dan glukosa hati yang meningkat saat puasa tidak ditekan setelah makan, menyebabkan hiperglikemia. Hormon *incretin* yang merupakan hormon yang berasal dari usus seperti GLP-1, penting dalam pelepasan insulin dan penekanan glukagon. Meskipun aktivitas GIP terganggu pada penderita DMT2, efek

insulinotropik GLP-1 tetap terjaga, menjadikannya opsi terapi yang potensial. Namun, GLP-1 cepat diaktifkan oleh DPP-IV dalam tubuh²¹.

Dua pendekatan terapi telah dikembangkan. GLP-1 dengan waktu paruh lebih lama dan inhibitor DPP-IV yang mencegah pemecahan GLP-1 dan GIP endogen. Kedua kelas agen ini menunjukkan potensi untuk menormalkan kadar glukosa puasa dan postprandial serta meningkatkan fungsi dan massa sel beta²¹.

Beberapa penelitian yang sedang berlangsung mengenai peran disfungsi mitokondria dalam perkembangan resistensi insulin dan etiologi DMT2 menjelaskan bahwa jaringan adiposa juga berperan penting sebagai organ endokrin yang mengeluarkan berbagai adipositokin seperti leptin, TNF- α , resistin, dan adiponektin yang terlibat dalam resistensi insulin dan kemungkinan disfungsi sel beta²¹.

Sebagian besar penderita DMT2 mengalami obesitas dengan adipositas visceral sentral. Oleh karena itu, jaringan adiposa memainkan peran penting dalam patogenesis DMT2. Hipotesis portal/visceral dan sindrom penyimpanan lemak ektopik merupakan kerangka kerja untuk mempelajari interaksi antara resistensi insulin dan disfungsi sel beta dalam DMT2 serta hubungan antara lingkungan obesogenik dan risiko diabetes di dekade mendatang²¹.

2.1.3. Stress Oksidatif dalam Diabetes Melitus (DM)

Stres oksidatif memainkan peran krusial dalam patofisiologi diabetes melitus tipe 2 (T2DM). Hiperglikemia kronis menyebabkan peningkatan

produksi reaktif oksigen (ROS) yang berlebihan, mengganggu sinyal insulin dan fungsi sel β pankreas. Kerusakan oksidatif akibat ROS memicu inflamasi, peroksidasi lipid, dan disfungsi mitokondria, yang berkontribusi terhadap resistensi insulin. Selain itu, stres oksidatif mengaktifkan jalur stres seperti NF- κ B dan JNK, mempercepat apoptosis sel β dan menurunkan sekresi insulin. Mekanisme pertahanan antioksidan, seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione, sering mengalami gangguan pada T2DM, memperparah kerusakan oksidatif. Mengurangi stres oksidatif melalui antioksidan dan perubahan gaya hidup dapat menjadi strategi potensial untuk meningkatkan sensitivitas insulin dan kelangsungan hidup sel β pankreas pada T2DM.²⁵⁻²⁷

2.1.4. Patofisiologi Oxidative Stress dalam Diabetes Melitus

Pembentukan radikal bebas pada diabetes melalui glikasi non-enzimatik protein, oksidasi glukosa, dan peningkatan peroksidasi lipid menyebabkan kerusakan enzim, mesin seluler, dan peningkatan resistensi insulin akibat OS²⁵⁻²⁷.

Berdasarkan beberapa penelitian terbaru, lipid dan komponen apolipoprotein dari LDL membentuk agregat tidak larut secara oksidatif karena ikatan silang radikal hidroksil antara monomer apo-B yang bertanggung jawab atas kerusakan oksidatif dalam komplikasi diabetes.²⁵⁻

27

Selama metabolisme oksidatif di mitokondria, sebagian oksigen yang digunakan diubah menjadi air, dan sisa oksigen diubah menjadi

radikal bebas oksigen yang kemudian diubah menjadi RS lain seperti ONOO^- , $\text{OH}^\cdot$, dan H_2O_2 . Sinyal insulin dimodulasi oleh ROS/RNS dengan dua cara. Di satu sisi, sebagai respons terhadap insulin, ROS/RNS diproduksi untuk menjalankan fungsi fisiologisnya, dan sisi lain, ROS dan RNS memiliki regulasi negatif pada sinyal insulin yang menyebabkan resistensi insulin, faktor risiko untuk DM2.²⁵⁻²⁷

2.1.5. Oxidative Stress dan Komplikasi Diabetes Melitus

Beberapa bukti dari penelitian menunjukkan hubungan antara DM dan OS dengan mengukur berbagai biomarker, termasuk biomarker kerusakan DNA dan produksi peroksidasi lipid. Radikal bebas memainkan peran utama dalam timbulnya dan perkembangan komplikasi diabetes lanjut karena kemampuannya merusak lipid, protein, dan DNA. Berbagai kondisi patologis seperti artritis reumatoid, DM, dan kanker yang dipicu oleh OS.²⁵⁻²⁷

Komplikasi akibat radikal bebas dan OS pada DM meliputi penyakit arteri koroner, neuropati, nefropati, retinopati, dan stroke. Studi *in-vivo* mendukung hiperglikemia dalam menghasilkan OS yang menyebabkan disfungsi endotel pada pembuluh darah pasien DM. peningkatan kadar glukosa dan insulin bersama dengan dislipidemia pada pasien diabetes mengembangkan makroangiopati yang menyebabkan OS dan berujung pada aterosklerosis.²⁵⁻²⁷

2.2. Glucose Transporter 4 (GLUT4)

2.2.1. Definisi

GLUT (*Glucose Transporter*) adalah sekelompok protein membran yang bertanggung jawab untuk transportasi glukosa melintasi membran sel. Protein GLUT termasuk dalam kelas transporter membran integral yang dikenal sebagai keluarga pengangkut fasilitatif. Terdapat beberapa isoform GLUT yang masing-masing memiliki fungsi spesifik dan distribusi jaringan yang berbeda. Misalnya, GLUT1 terdapat di hampir semua jaringan dan berperan penting dalam transportasi glukosa dasar, sedangkan GLUT4 terutama ditemukan di jaringan otot dan adiposa serta diatur oleh insulin. Isoform lain seperti GLUT2 dan GLUT3 juga memiliki peran penting dalam metabolisme glukosa di berbagai organ^{38,39}.

Gen yang mentranskripsikan protein GLUT adalah bagian dari keluarga gen SLC2A (*solute carrier family 2*). Masing-masing isoform GLUT dikodekan oleh gen spesifik, seperti SLC2A1 untuk GLUT1, SLC2A2 untuk GLUT2, dan SLC2A4 untuk GLUT4. Ukuran molekul protein GLUT bervariasi tergantung pada isoformnya, tetapi umumnya mereka memiliki berat molekul sekitar 50 kDa. Struktur protein GLUT terdiri dari 12 segmen transmembran yang memungkinkan mereka untuk menyeberangkan membran lipid bilayer sel dan memfasilitasi transportasi glukosa melalui mekanisme difusi terfasilitasi^{38,39}.

2.2.2. Jalur Aktivasi dan Peran GLUT4 pada Diabetes Melitus Tipe 2

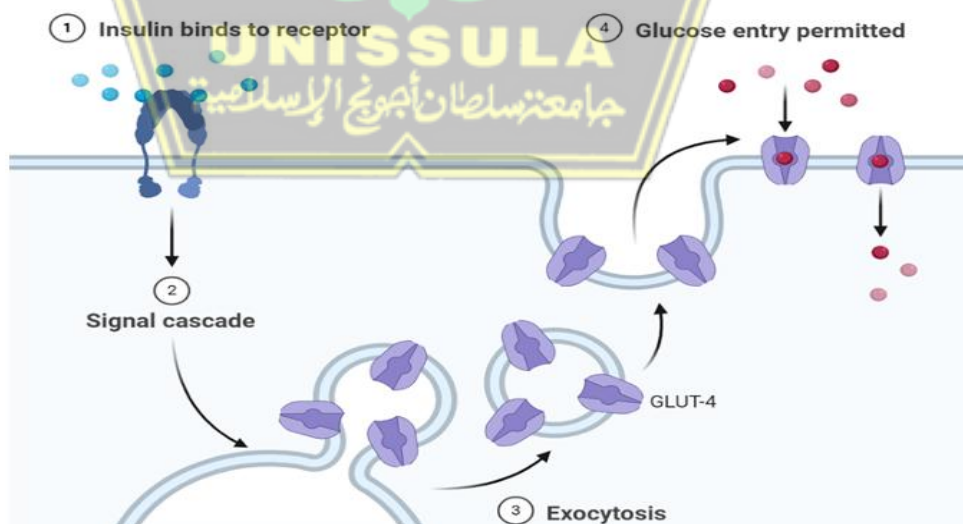
Pada DMT2, jalur aktivasi dan peran GLUT4 sangat penting dalam memahami gangguan metabolisme glukosa. GLUT4 adalah protein pengangkut glukosa yang terutama ditemukan dalam jaringan otot rangka dan adiposa, yang pergerakannya ke membran plasma diatur oleh insulin. Ketika insulin dilepaskan oleh pankreas setelah makan, ia berikatan dengan *insulin receptor* (IR) pada membran sel otot dan adiposa, menyebabkan autofosforilasi tirosin pada reseptor insulin dan mengaktifkan aktivitas tirosin kinase dari reseptor tersebut^{2,40-42}.

Reseptor insulin yang terfosforilasi kemudian memfosforilasi protein IRS (terutama IRS-1 dan IRS-2), yang bertindak sebagai adaptor untuk memulai sinyal downstream. IRS yang terfosforilasi merekrut dan mengaktifkan PI3K (*PhosphoGLUT4itide 3-Kinase*), yang mengubah PIK5 (*Phosphatidyl-inositol-3,4-bisphosphate*) menjadi PIP3 (*Phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphate*). PIP3 kemudian merekrut PDSH (*PhosphoGLUT4itide-dependent kinase-1*) dan Akt (juga dikenal sebagai protein kinase B) ke membran plasma, di mana PDSH mengaktifkan Akt melalui fosforilasi⁴⁰⁻⁴².

Akt yang terfosforilasi kemudian mengaktifkan mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) dan memfosforilasi AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*). Fosforilasi AS160 menyebabkan inaktivasi GAP (*GTPase-activating protein*) yang menghambat translokasi GLUT4. Dengan inaktivasi GAP oleh AS160, vesikel yang mengandung GLUT4 dapat

bergerak dan menyatu dengan membran plasma, memungkinkan pengambilan glukosa dari darah ke dalam sel⁴⁰⁻⁴².

Pada DMT2, terdapat resistensi insulin yang menyebabkan gangguan pada jalur sinyal insulin yang dijelaskan di atas. Akibatnya, translokasi GLUT4 ke membran plasma berkurang, mengakibatkan penurunan pengambilan glukosa oleh sel otot dan adiposa. Beberapa faktor yang berkontribusi terhadap resistensi insulin meliputi penurunan atau gangguan fosforilasi IRS, yang mengurangi aktivasi PI3K dan downstream signaling; penurunan aktivitas PI3K dan Akt, yang menghambat fosforilasi AS160 dan translokasi GLUT4; serta peradangan kronis dan stres oksidatif, di mana sitokin pro-inflamasi dan stres oksidatif dapat mengganggu sinyal insulin. Disfungsi jalur sinyal insulin dan translokasi GLUT4 pada DMT2 menyebabkan hiperglikemia, yang merupakan karakteristik utama dari penyakit ini⁴⁰⁻⁴².



Gambar 2. 3. Aktivasi Glukosa GLUT4 Transporter oleh Insulin⁴³

2.3. FOXO1

FOXO1 (*Forkhead box O1*) adalah salah satu anggota dari keluarga faktor transkripsi FOXO, yang berperan penting dalam regulasi berbagai proses fisiologis, termasuk metabolisme glukosa, proliferasi sel, apoptosis, dan respons stres oksidatif. FOXO1 memainkan peran sentral dalam patofisiologi DM2, terutama dalam hal pengaturan metabolisme glukosa dan sensitivitas insulin⁴⁴⁻⁴⁶.

2.3.1. Struktur dan Regulasi FOXO1

FOXO1 adalah faktor transkripsi yang teraktivasi oleh berbagai sinyal, termasuk stres oksidatif, deprivasi nutrisi, dan hormon tertentu seperti insulin dan glukagon. Aktivitas FOXO1 terutama diatur melalui fosforilasi, yang dimediasi oleh jalur sinyal insulin, yaitu jalur PI3K/Akt. Ketika insulin terikat pada reseptornya, terjadi aktivasi PI3K, yang selanjutnya mengaktifkan Akt. Akt kemudian memfosforilasi FOXO1, menyebabkan FOXO1 bertranslokasi dari nukleus ke sitoplasma, sehingga menekan aktivitas transkripsionalnya. Sebaliknya, dalam kondisi rendah insulin atau resistensi insulin, FOXO1 tetap aktif di nukleus dan mengatur ekspresi gen target yang terlibat dalam glukoneogenesis dan ketogenesis⁴⁴⁻

⁴⁶.

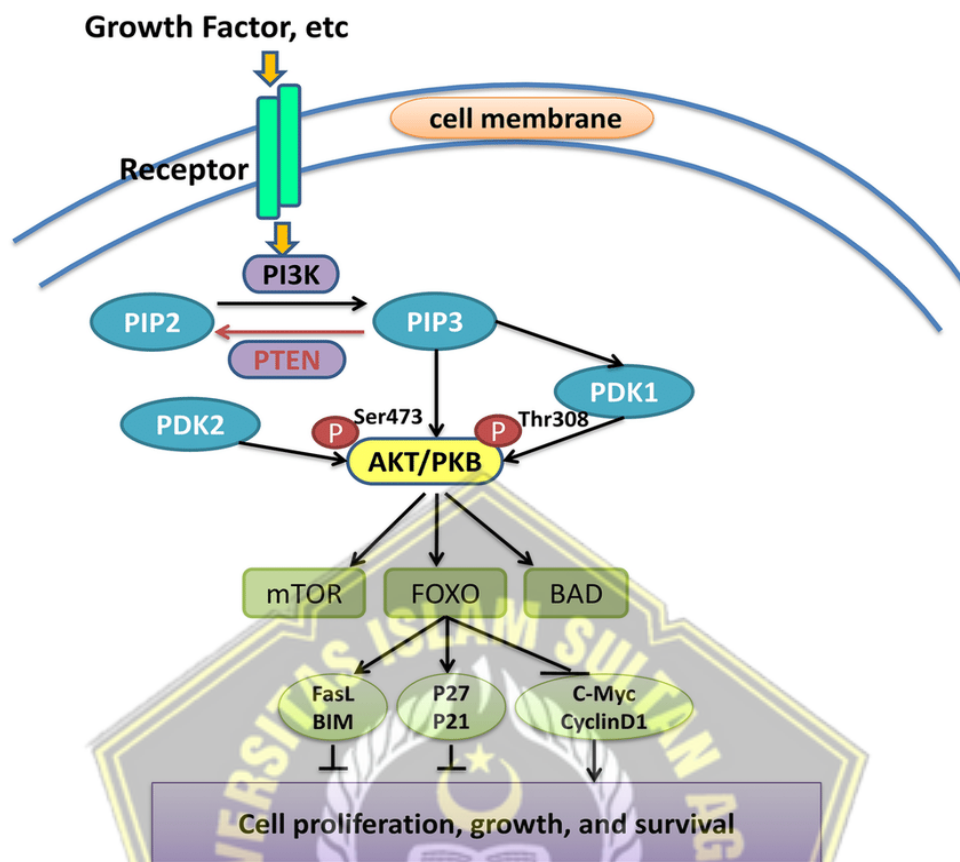
2.3.2. Peran FOXO1 dalam Metabolisme Glukosa

FOXO1 memainkan peran kunci dalam regulasi metabolisme glukosa, terutama melalui pengaruhnya pada hati. Dalam kondisi puasa

atau rendah insulin, FOXO1 diaktifkan dan meningkatkan ekspresi gen yang berperan dalam glukoneogenesis, seperti PECK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) dan G6Pase (*glucose-6-phosphatase*). Dengan demikian, FOXO1 membantu meningkatkan produksi glukosa di hati, yang merupakan mekanisme adaptif untuk menyediakan energi selama periode kelaparan atau antara waktu makan⁴⁴⁻⁴⁶.

Namun, dalam DMT2, terjadi resistensi insulin, yang menyebabkan gangguan dalam jalur PI3K/Akt. Akibatnya, FOXO1 tidak difosforilasi dengan benar dan tetap aktif di nukleus. Ini menyebabkan peningkatan ekspresi gen glukoneogenik secara berlebihan, yang berkontribusi pada hiperglikemia yang merupakan ciri khas DMT2⁴⁴⁻⁴⁶.

Jalur PI3K/AKT merupakan jalur kanonik yang mengatur aktivitas transkripsi FOXO. Setelah aktivasi tirosin kinase GFR, PI3K menjadi aktif dan menghasilkan PIP3 di membran plasma. PIP3 memfasilitasi fosforilasi AKT oleh PDSH. Selanjutnya, memfosforilasi FOXO nuklir, memfasilitasi ekspor FOXO nuklir dan secara bersamaan menghalangi relokasi ke dalam nukleus. Setelah terakumulasi di dalam nukleus, FOXO dapat mengikat berbagai kofaktor transkripsi dan mengatur transkripsi gen yang terlibat dalam proliferasi sel, pertumbuhan, kelangsungan hidup, siklus sel, apoptosis dan metabolisme, dan lain-lain. Aktivitas jalur ini kemudian diatur secara negatif oleh loop umpan balik PTEN⁴⁴⁻⁴⁶.



Gambar 2. 4.PI3K/AKT/FOXO Signaling Pathway⁴⁷

2.3.3. Hubungan FOXO1 dengan Resistensi Insulin dan Diabetes Melitus Tipe 2

Resistensi insulin merupakan kondisi di mana sel-sel tubuh tidak merespons insulin secara efektif, yang mengakibatkan peningkatan produksi glukosa oleh hati dan penurunan pengambilan glukosa oleh otot dan jaringan lemak. FOXO1, sebagai regulator negatif dari aksi insulin, berperan penting dalam proses ini. Ketika FOXO1 tetap aktif karena resistensi insulin, ada peningkatan ekspresi gen yang berperan dalam produksi glukosa, serta pengurangan ekspresi gen yang berperan dalam

pengambilan dan penggunaan glukosa, memperburuk kondisi hiperglikemia.

FOXO1 juga terlibat dalam diferensiasi dan fungsi sel β pankreas. Studi menunjukkan bahwa penghambatan FOXO1 dapat memperbaiki fungsi sel β , meningkatkan sekresi insulin, dan menurunkan kadar glukosa darah, yang menunjukkan bahwa FOXO1 juga berperan dalam patofisiologi sel β pada DMT2.

2.3.4. Peran FOXO1 dalam Stres Oksidatif dan Inflamasi

FOXO1 juga berperan dalam regulasi stres oksidatif dan inflamasi, yang merupakan aspek penting dalam patogenesis DMT2 dan komplikasinya. FOXO1 mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam respons antioksidan, seperti manganese *superoxide dismutase* (MnSOD) dan *catalase* (CAT), yang melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Namun, pada DMT2, ketidakseimbangan antara aktivitas antioksidan dan prooksidan, sebagian dimediasi oleh FOXO1, dapat menyebabkan stres oksidatif yang berkontribusi pada kerusakan seluler dan komplikasi vaskular.

FOXO1 juga dapat mengatur respon inflamasi dengan mengontrol ekspresi sitokin pro-inflamasi. Dalam keadaan resistensi insulin atau hiperglikemia, aktivasi FOXO1 dapat meningkatkan peradangan sistemik, yang selanjutnya memperburuk resistensi insulin dan kerusakan jaringan.

2.3.5. Potensi Terapi Menargetkan FOXO1

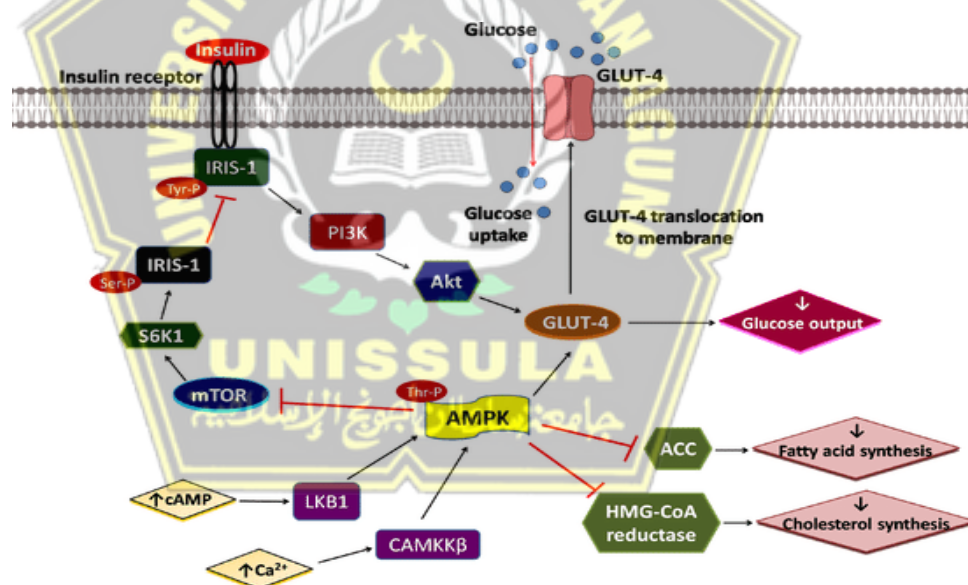
Karena perannya yang multifaset dalam patogenesis DMT2, FOXO1 menjadi target potensial untuk intervensi terapeutik. Pendekatan untuk menghambat aktivitas FOXO1 atau memodulasi jalur sinyal yang terkait dengannya dapat membantu mengurangi produksi glukosa yang berlebihan, meningkatkan sensitivitas insulin, dan mengurangi stres oksidatif serta inflamasi. Beberapa penelitian awal menunjukkan bahwa inhibitor FOXO1 atau molekul kecil yang menargetkan interaksi protein-protein FOXO1 dapat menjadi strategi yang menjanjikan untuk pengelolaan DM tipe 2.

Secara keseluruhan, FOXO1 memiliki peran penting dalam metabolisme glukosa, resistensi insulin, dan respon seluler terhadap stres dan inflamasi dalam DMT2. Memahami mekanisme regulasi dan fungsinya dapat memberikan wawasan yang lebih baik untuk mengembangkan terapi yang lebih efektif untuk penyakit ini.

2.4 *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSC)*

Secretome Mesenchymal Stem Cells merupakan kumpulan berbagai molekul yang disekresikan oleh sel-sel MSC, seperti sitokin, lipida, asam nukleat, dan berbagai macam jenis *growth factor*. *Secretome* MSC telah menarik perhatian besar dalam terapi regeneratif dan penyakit metabolik, termasuk DMT2. Pada DMT2, *secretome* MSC yang dihasilkan di bawah kondisi hipoksia (kekurangan oksigen) memiliki peran yang signifikan.

Secretome hypoxia MSC diketahui dapat meregulasi ekspresi GLUT4 dan FOXO1. Terdapat dua jalur pensinyalan utama yang berperan dalam efek *secretome hypoxia* MSC pada regulasi GLUT4 dan FOXO1, yaitu jalur pensinyalan PI3K/Akt dan AMPK. Aktivasi jalur PI3K/Akt menyebabkan fosforilasi dan inaktivasi FOXO1, sementara AMPK dapat meningkatkan translokasi GLUT4 ke membran sel, sehingga meningkatkan pengambilan glukosa. Oleh karena itu, *secretome hypoxia* MSC berpotensi memperbaiki resistensi insulin dan mengontrol hiperglikemia melalui modulasi jalur pensinyalan ini.



Gambar 2. 5. Peran AMPK dalam Proses Penyerapan Glukosa dan Sensitivitas Insulin

2.4.1. Hipoksia dan *Secretome Mesenchymal Stem Cells*

Hipoksia adalah kondisi di mana jaringan mengalami kekurangan oksigen. Dalam lingkungan hipoksik, MSC mengalami perubahan

signifikan dalam pola sekresi mereka, menghasilkan secretome yang lebih kaya akan molekul-molekul yang mempromosikan perbaikan dan regenerasi jaringan. Hipoksia menstimulasi MSC untuk meningkatkan ekspresi berbagai faktor seperti *hipoksia-inducible factor 1-alpha* (FOXO1 α), yang kemudian memodulasi ekspresi berbagai gen yang terlibat dalam angiogenesis, anti-apoptosis, proliferasi, dan respons imun.

2.4.2. Komponen Secretome Mesenchymal Stem Cells di bawah Hipoksia

Beberapa komponen penting dari secretome MSC yang ditingkatkan di bawah kondisi hipoksia meliputi:

1. Faktor pertumbuhan dan sitokin

Seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), dan *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF-1).

Faktor-faktor ini mendukung regenerasi jaringan dengan meningkatkan angiogenesis dan perbaikan jaringan.

2. Eksosom dan vesikel ekstraseluler

Eksosom yang dikeluarkan oleh MSC mengandung miRNA, protein, dan lipid yang dapat memodulasi fungsi sel target. Dalam kondisi hipoksia, eksosom MSC menunjukkan peningkatan kandungan molekul-molekul yang terkait dengan peningkatan regenerasi jaringan dan respons anti-inflamasi.

3. Protein anti-apoptosis

Seperti Survivin dan Bcl-2, yang berperan dalam mencegah kematian sel dan meningkatkan kelangsungan hidup sel.

2.4.3. Peran Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells dalam Diabetes Melitus Tipe 2

Dalam DMT2, resistensi insulin dan hiperglikemia kronis menyebabkan stres oksidatif, peradangan kronis, dan kerusakan jaringan, terutama di pankreas dan jaringan perifer seperti otot dan hati. *Secretome* MSC yang diinduksi hipoksia menawarkan berbagai manfaat terapeutik dalam konteks ini:

1. Perbaikan Sel β Pankreas

Sel β pankreas, yang bertanggung jawab untuk produksi insulin, mengalami disfungsi dan apoptosis pada DMT2. *Secretome* MSC hipoksia mengandung faktor-faktor seperti IGF-1 dan HGF yang dapat meningkatkan proliferasi dan kelangsungan hidup sel β , memperbaiki fungsi pankreas, dan meningkatkan sekresi insulin.

2. Modulasi Respon Imun dan Anti-Inflamasi

Peradangan kronis adalah komponen utama dalam patofisiologi DMT2. *Secretome* MSC yang dihasilkan dalam kondisi hipoksia mengandung sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β), yang dapat menekan respon inflamasi dan mengurangi kerusakan jaringan.

3. Pengurangan Resistensi Insulin

Dengan mempromosikan perbaikan jaringan dan mengurangi peradangan, *secretome hypoxia* MSC dapat membantu meningkatkan sensitivitas insulin di jaringan perifer. VEGF dan

HGF yang terdapat dalam secretome juga dapat meningkatkan vaskularisasi jaringan, yang pada gilirannya dapat meningkatkan distribusi insulin dan pengambilan glukosa.

4. Efek Anti-Apoptosis dan Anti-Stres Oksidatif

Secretome hypoxia MSC juga mengandung molekul-molekul yang dapat mengurangi stres oksidatif dan apoptosis di jaringan yang terkena, termasuk di sel-sel β pankreas dan hepatosit. Misalnya, peningkatan ekspresi FOXO1 α di bawah kondisi hipoksia mendorong produksi enzim antioksidan dan protein anti-apoptosis yang melindungi sel dari kerusakan lebih lanjut.

5. Peningkatan Angiogenesis dan Regenerasi Jaringan

Angiogenesis adalah proses penting untuk perbaikan jaringan, terutama di jaringan yang rusak akibat hiperglikemia kronis dan peradangan pada DM2. VEGF dan faktor angiogenik lainnya dalam *secretome hypoxia* MSC dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru, memperbaiki perfusi jaringan, dan mendukung proses regenerasi.

2.5 Air Alkali

Air alkali mengandung ion-ion alkali seperti natrium (Na^+), kalium (K^+), magnesium (Mg^{2+}), dan kalsium (Ca^{2+}) yang berperan penting dalam menetralkan radikal bebas di dalam tubuh. Radikal bebas, seperti anion superoksida (O_2^-) dan hidroksil radikal ($\text{OH}\cdot$), adalah molekul reaktif dengan elektron tidak berpasangan yang dapat merusak

protein, DNA, dan membran sel, sehingga memicu stres oksidatif dan inflamasi. Ion-ion alkali bertindak sebagai antioksidan dengan memberikan elektron untuk menetralkan radikal bebas, yang membantu mencegah kerusakan sel. Selain itu, air alkali sering mengandung hidrogen molekuler (H_2) terlarut, yang dikenal sebagai antioksidan kuat. Hidrogen molekuler bereaksi langsung dengan radikal hidroksil ($OH\bullet$) untuk membentuk air, sehingga mengurangi keberadaan radikal bebas tanpa menghasilkan produk sampingan yang merugikan.

Dengan menurunnya stres oksidatif akibat netralisasi radikal bebas, air alkali membantu menghambat aktivasi jalur inflamasi seperti NF- κ B (nuclear factor-kappa B), yang berperan penting dalam memicu peradangan. Proses ini tidak hanya meredakan inflamasi, tetapi juga mendukung regenerasi jaringan dan meningkatkan kesehatan seluler secara keseluruhan. Ion-ion alkali dan hidrogen aktif bekerja sinergis untuk menciptakan lingkungan tubuh yang lebih basa, yang kurang mendukung terjadinya stres oksidatif dan peradangan kronis.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

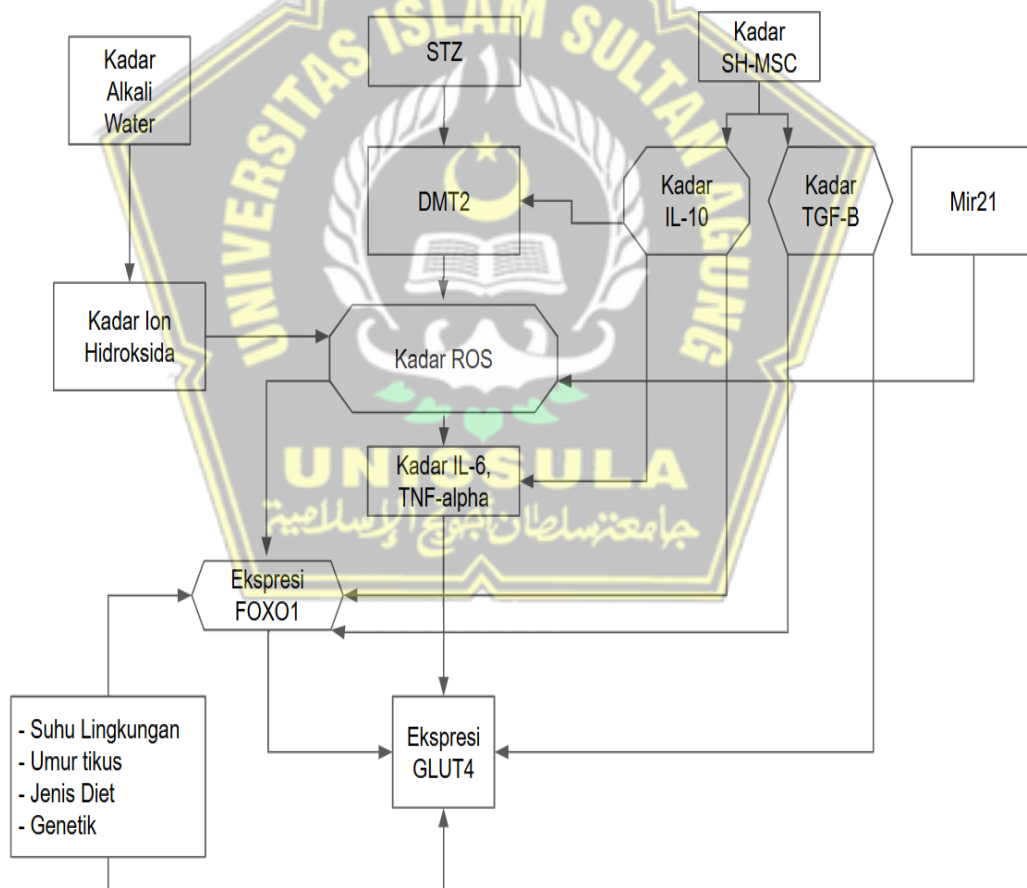
3.1 Kerangka Teori

Resistensi insulin di jaringan perifer, seperti otot rangka dan jaringan adiposa, mengurangi pengambilan glukosa, yang berkontribusi pada hiperglikemia. Resistensi insulin yang berkepanjangan mengakibatkan inflamasi akibat produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan peningkatan produksi sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α yang mengganggu sintesis GLUT4⁴⁸. Rusaknya jalur sintesis GLUT4 yang mengakibatkan gagalnya glukosa masuk ke dalam sel yang menyebabkan hiperglikemia. ROS yang banyak dihasilkan akibat inflamasi berkepanjangan pada DMT2 menyebabkan *over expression* FOXO1. Hal ini menyebabkan gangguan aktivasi GLUT4 yang memperparah kondisi DMT2⁴⁹.

Secretome hypoxia MSC mengandung sitokin, *growth factor* dan miRNA seperti IL-10, TGF- β dan mir21 yang dapat menurunkan inflamasi sehingga dapat menurunkan ROS. *Secretome hypoxia* MSC dapat menghambat ekspresi FOXO1 melalui jalur pensinyalan PI3K/Akt, yang secara tidak langsung meningkatkan ekspresi GLUT4. Dengan demikian, *secretome hypoxia* MSC memiliki potensi untuk memperbaiki resistensi insulin dan mengontrol hiperglikemia melalui modulasi jalur pensinyalan ini. *Secretome hypoxia* MSC juga dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, seperti SOD yang dapat mengurangi produksi

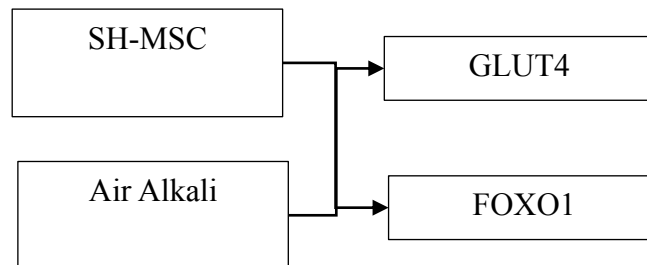
ROS akibat stres oksidatif dan menekan sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α .

Air alkali juga diketahui memiliki potensi dalam pengobatan DMT2 dengan meningkatkan sensitivitas insulin. Air alkali yang banyak mengandung ion hidroksida mampu mengurangi antioksidan dengan melakukan *scavenging* ion radikal bebas. Hal ini akan mengurangi kadar ROS dalam tubuh penderita DMT2 yang akan menghambat ekspresi FOXO1 dan berujung pada peningkatan ekspresi GLUT4.



Gambar 3. 1. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3. 2.Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Terdapat pengaruh kombinasi SH-MSC dan air alkali dalam meningkatkan ekspresi GLUT4 dan menurunkan aktivitas FOXO1 pada Tikus Jantan Galur Wistar Model *Diabetes Melitus* Tipe 2 dengan kontrol.



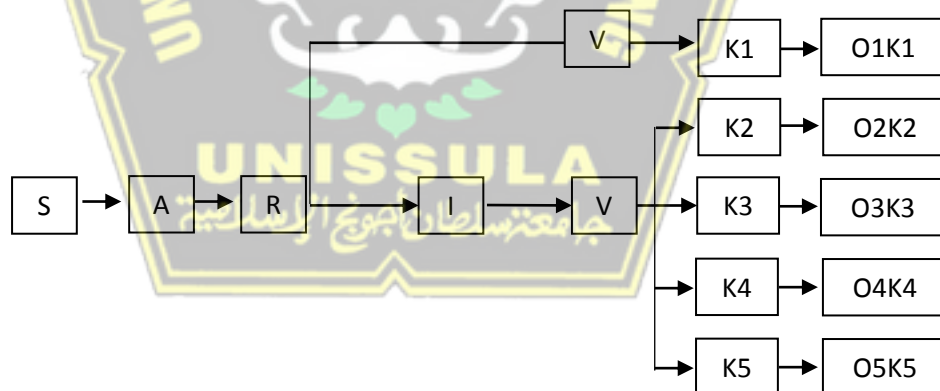
BAB IV

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: 2 kelompok perlakuan dan intervensi, 1 kelompok perlakuan yang tidak mendapatkan intervensi (kontrol negatif), 1 kelompok perlakuan yang mendapat terapi standar (kontrol positif) dan 1 kelompok tikus sehat sebagai *base line* data. Pengukuran data dilakukan sesudah intervensi.

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut:



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

- | | |
|---|----------------|
| S | = Sampel |
| A | = Aklimatisasi |
| R | = Randomisasi |
| I | = Induksi DMT2 |

V	= Validasi gula darah dan HOMA-IR
K1	= Tikus Sehat
K2	= Tikus DMT2 diinjeksi dengan NaCL 0,9% 500 µl
K3	= Tikus DMT2 dengan perlakuan metformin 45 mg/kgBB per oral secara sonde
K4	= Tikus DMT2 mendapatkan intervensi <i>secretome hypoxia</i> MSC dengan dosis 500 µl
K5	= Tikus DMT2 mendapatkan intervensi <i>secretom hypoxia</i> MSC dengan dosis 500 µl yang dikombinasi dengan air alkali air alkali yang diberikan 5 mL secara oral
O1K1	= Observasi ekspresi gen GLUT4 dan FOXO1 K1
O2K2	= Observasi ekspresi gen GLUT4 dan FOXO1 K2
O3K3	= Observasi ekspresi gen GLUT4 dan FOXO1 K3
O4K4	= Observasi ekspresi gen GLUT4 dan FOXO1 K4
O5K5	= Observasi ekspresi gen GLUT4 dan FOXO1 K5

4.2 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah SH-MSC secara injeksi peritoneal yang dikombinasi dengan air alkali yang diberikan secara oral.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi GLUT4 dan FOXO1.

c. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah DMT2.

d. 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. Definisi Operasional Variabel

a. SH-MSC

SH-MSC adalah protein soluble yang mengandung faktor IL-10, VEGF, PDGF dan *secretome* diperoleh dari sekresi MSC *Umbilical Cord* yang dikultur pada kondisi suhu 37° C dan 5% O₂ selama 24 jam. SH-MSC diproduksi di laboratorium SCCR Indonesia dengan dosis sebanyak 500 µl yang diberikan secara intraperitoneal dengan spuit 1 cc dan jarum 27 g pada hari ke 8, 15, dan 22.

- Satuan : uL
- Skala : rasio

b. Air Alkali

Air alkali adalah air yang memiliki pH lebih dari 8 yang didapatkan dari Laboratorium SCCR melalui teknologi nanopartikel. Air alkali diberikan 5 mL secara oral setiap hari dari hari ke 8 – 29 dengan dosis 5 mL/hari.

- Satuan : ml
- Skala : Rasio

c. Ekspresi GLUT4

GLUT4 merupakan protein transporter yang berperan mentranspor glukosa ke dalam sel. GLUT4 dianalisis menggunakan metode qRT-PCR diukur dari jaringan pankreas pada hari ke 30. Primer gen yang digunakan adalah Forward 5'-ACA TAC CTG ACA GGG CAA GG-3' dan Reverse 5'-CGC CCT TAG TTG GTC AGA AG-3'.

- Satuan : Fold change
- Skala : Ratio

d. Ekspresi FOXO1

FOXO1 adalah faktor transkripsi yang berperan penting dalam metabolisme glukosa dan lipid. Analisis kadar FOXO1 dianalisis menggunakan metode qRT-PCR diukur dari jaringan pankreas pada hari ke 30. Primer FOXO1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah Forward 5'-CTC AGG TGG TGG AGA CCG A-3, Reverse 5'-GAG CTG GTT CGA GGA CGA AA-3'

- Satuan : Fold change
- Skala : Ratio

4.3 Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini menggunakan tikus jantan galur Wistar berumur 6 sampai 8 minggu, berat 200 - 250 gram yang didapatkan dari

Laboratorium Stem Cell and Cancer Research Semarang dan dipelihara di fasilitas Animal Model Research Center, Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Indonesia dalam kandang 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 diberi pakan dan minum secara *ad libitum*¹¹.

4.3.2. Sampel Penelitian

a. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tikus jantan galur Wistar umur 6 – 8 minggu dengan
2. Berat tikus 250 gram
3. Sehat, tidak ada kelainan anatomis
4. Bergerak secara aktif

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tidak berhasil diinduksi DMT2, GDP<126 mg/dl, HOMA IR <2.9

c. Kriteria Drop Out

Tikus sakit, mati atau infeksi 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 K1 (tikus sehat), K2 (tikus model DMT2 yang diinjeksi NaCl 0,9%), K3 (tikus model DMT2 dengan pemberian metformin 45 mg/kgBB secara oral), K4 (tikus DMT2 yang mendapatkan intervensi SH-MSK dengan dosis 500 µl), dan K5 (tikus model DMT2 yang mendapatkan SH-MSK dengan dosis 500 µl yang dikombinasikan air alkali 5 mL secara oral dengan dosis 5mL/hari).

4.3.4. Besar Sampel

Besar sampel dilakukan dengan 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.

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$n \geq 5$$

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 6 ekor tikus perkelompok setelah ditambahkan cadangan tikus masing-masing kelompok sejumlah 1 ekor.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan yaitu:

- a. Alat untuk pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus berukuran 37 cm x 40 cm x 18 cm 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 Blot Machine*, elektroforesis, Gel doc, *optilab*, mikroskop, *deckglass*, *staining chamber*, *humidity chamber*, *cover glass*, *BD Accuri C6 Plus flow cytometer*, *Fluorometer Quantus*, qRT-PCR, *Hypoxia chamber*, *dissolved oxygen meter*, *Tangential flow filtration pulse*, *filter chip* 5-300 kDA, *Liquid Nitrogen* sebagai tempat penyimpanan sel dengan temperature -196 C (di laboratorium).

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain asam asetat, Streptozotocin, primer FOXO1, primer GLUT4 *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 (*Phosphate 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 CD29 Alexa 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

- a. *Ethical clearance* penelitian diperoleh dari Komisi Bioetik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
- b. Langkah ini diambil setelah mendapatkan persetujuan proposal penelitian dari pembimbing dan penguji.
- c. Permohonan persetujuan etik ini diperlukan untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip etika dalam penggunaan hewan percobaan.

- d. Persetujuan etik juga menjamin perlakuan terhadap hewan coba akan dilakukan dengan memperhatikan kesejahteraan dan hak-hak hewan
- e. Persetujuan etik berupaya meminimalkan penderitaan yang tidak perlu pada hewan coba.

4.5.2. Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar umur 6 sampai 8 minggu dengan berat 250 gram yang didapatkan dari Laboratorium Stem Cell and Cancer Research Semarang. Tikus dipelihara dalam kandang 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 BR A591K dan air minum secara *ad-libitum*.

4.5.3. Induksi Diabetes Melitus Tipe 2

Induksi DMT2 dilakukan dengan injeksi Nicotinamide dengan dosis 15 mg/kg secara intra peritoneal dan setelah 15 menit dilakukan injeksi STZ dengan dosis 50 mg/kg berat badan yang telah dilarutkan dalam sodium citrate 0,1 ml secara intra peritoneal dengan spuit 1 cc, serta diberi minum larutan sukrosa 30 % sebanyak 50 cc secara *ad libitum* selama 2 hari.⁵⁰ Pengukuran glukosa darah puasa 4-6 jam diambil dari pembuluh darah ekor/vena lateralis 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 $> 126 \text{ mg/dL}^{26}$.

4.5.4. Validasi HOMA-IR

Validasi HOMA-IR dilakukan pada hari ke 7 setelah injeksi STZ. Serum darah diambil dari vena sub orbita tikus 4-6 jam puasa, kadar insulin di evaluasi dengan ELISA. Glukosa darah puasa dihitung menggunakan alat pengukur gula darah. Nilai HOMA-IR pada tikus DMT2 yaitu $> 2.9^{24,25}$. Perhitungan HOMA-IR menggunakan rumus:

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

4.5.5. Prosedur Isolasi Mesenchymal Stem Cells 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% O₂.
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 solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1x10⁷ sel /ml di dalam BD PharmingenTM Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phosphate Buffer Saline* (PBS) *buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5x 10⁶ 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 kedalam 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 buffer* (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
7	hMSC positive cocktail	20 μ l
	PE hMSC negative cocktail	20 μ l

4.5.7. Uji Diferensiasi Mesenchymal Stem Cells

MSC dikultur dengan kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel /well. Sel ditumbuhkan dalam 24 well plate dengan media standar yang mengandung

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

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

4.5.8. Proses Hipoksia dan Tangential Flow Filtration (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 SH-MS.

4.5.9. Validasi Secretome Mesenchymal Stem Cells

Kandungan molekul proinflamasi, anti-inflamasi dan growth factor pada SH-MSCS divalidasi menggunakan qRT-PCR kit. Sampel *secretome* SH-MSCS dianalisis kadar molekul proinflamasinya, seperti TNF- α , IL-6; molekul anti-inflamasi seperti IL-10 dan TGF- β ; dan *growth factor* seperti VEGF, FGF dan PDGF. *Secretome* dengan kandungan molekul anti inflamasi 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 500 uL secara intraperitoneal pada hari ke-8, 15 dan 22, untuk K4 dan K5, serta setiap hari mendapatkan asupan minum berupa air alkali 5 mL secara oral dengan dosis 5 mL/hari untuk K5 hingga hari ke-29. Sebagai perbandingan, tikus kontrol negatif (K2) disuntik dengan NaCl 0,9% pada hari ke 8, 15, dan 22 dan tikus kontrol positif (K3) diberikan metformin dosis 45 mg/kgBB secara oral. Terminasi dan koleksi sampel dilakukan pada hari ke-30.

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 7 setelah induksi STZ untuk analisis kadar insulin.

4.5.12. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan pankreas 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 di dalam RNA later. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam freezer hingga proses analisis data.

4.5.13. Analisis Kuantitatif Ekspresi Gen FOXO1 dan GLUT4 Menggunakan qRT-PCR

1. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

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* (qRT-PCR) *thermal cycler C1000* (Bio-Rad).

2. Penentuan ekspresi gen FOXO1 dan GLUT4

Penentuan ekspresi gen FOXO dan GLUT4 diamplifikasi dengan menggunakan Teknik PCR-RFLP, menggunakan PCR 2x PCR *Master mix solution* (iNtRON®, nomor 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.

Tabel 4.2. Komponen PCR Mix FOXO1

Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward FOXO-1	5'-CTCAGGTGGTGGAGACCGA-3'
	Reverse FOXO-1	5'-GAGCTGGTTCGAGGACGAAA-3'
Reagen	TRIzol	

Tabel 4.3. Komponen PCR Mix GLUT4

Komponen	Jenis	Sekuens
Primer	Forward GLUT-4	5'-ACATACCTGACAGGGCAAGG-3'
	Reverse GLUT-4	5'-CGCCCTTAGTTGGTCAGAAG-3'
Reagen	TRIzol	

3. Perhitungan ekspresi gen FOXO1 dan GLUT4

Perhitungan ekspresi gen FOXO dan GLUT4 dihitung dalam nilai rasio dibandingkan dengan ekspresi *housekeeping* gen GAPDH sehingga satuan perhitungan adalah rasio mRNA level ekspresi gen terhadap ekspresi gen *housekeeping*.

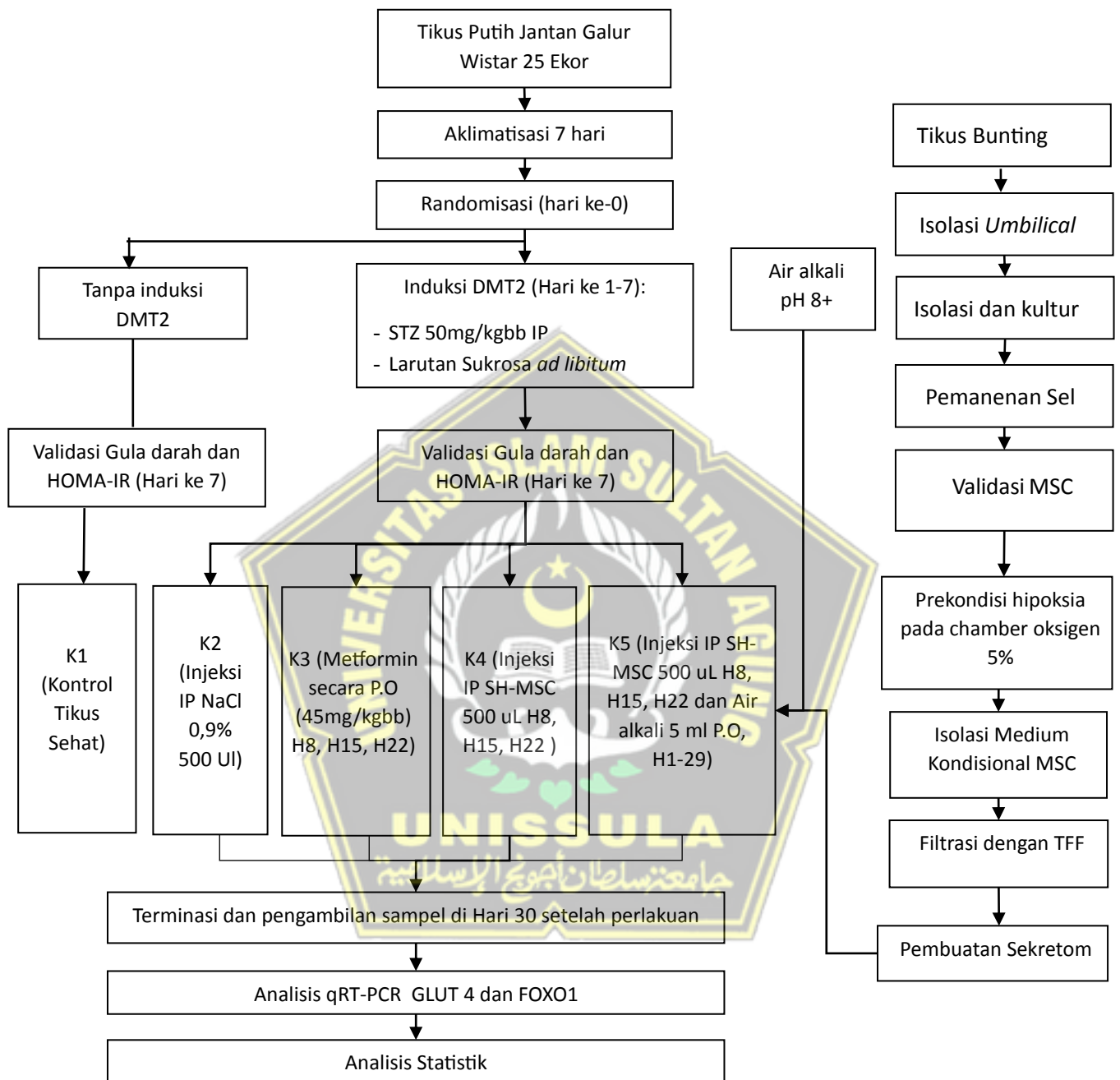
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan SH-MSC dan air alkali dilakukan di Laboratorium SCCR Indonesia. Pemeliharaan, induksi hewan coba, dan perlakuan hewan coba di *Animal Model Research Center* SCCR Indonesia. Penelitian dilakukan pada Desember 2024 – Januari 2025 di Laboratorium SCCR Indonesia.

4.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Karena data berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas *Lavene's Test*. Diketahui data yang didapat dari penelitian ini homogen, maka akan dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD*. Pengolahan analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 *for Windows*.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

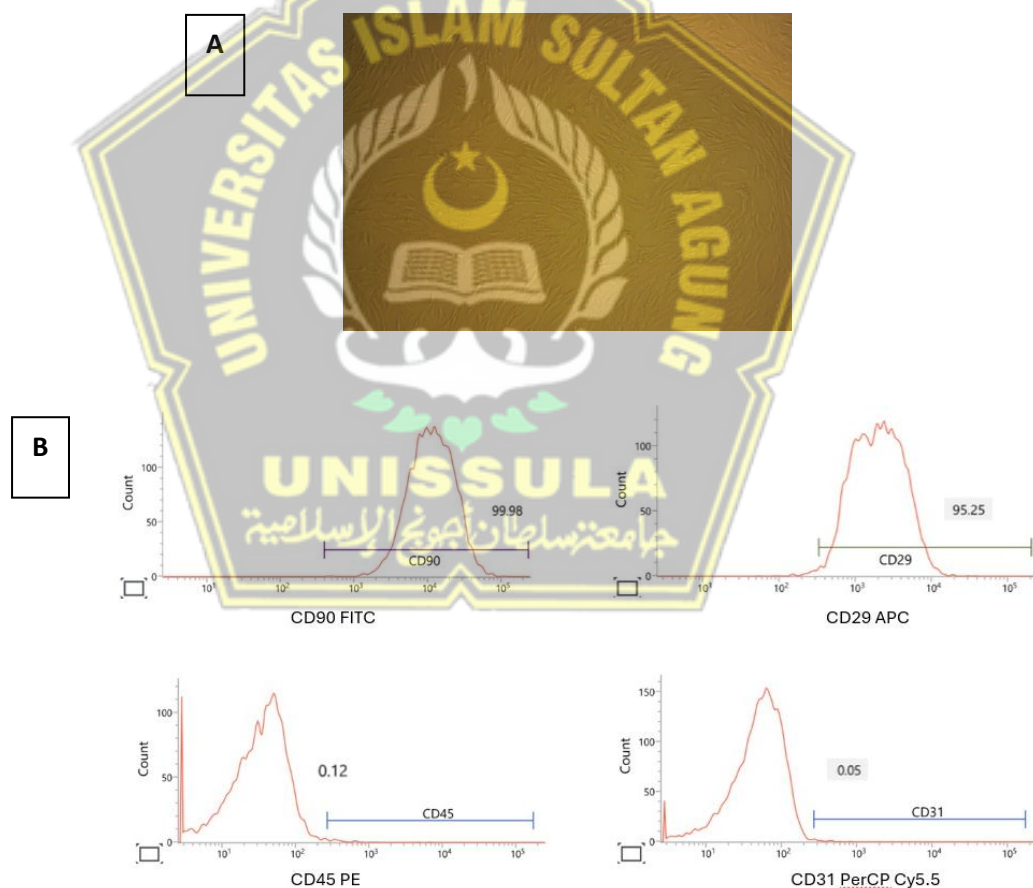
5.1 Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Validasi SH-MSC

Mesenchymal stem cell (MSC) diperoleh dari Laboratorium SCCR Indonesia, Semarang, melalui proses isolasi menggunakan tali pusat tikus sebagai sumber sel pada usia gestasi 21 hari. Proses isolasi dilakukan dengan teknik standar, diikuti dengan kultivasi sel dalam flask kultur yang mengandung media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Pada pasase kelima, morfologi sel diamati menggunakan mikroskop cahaya inversi. Hasil observasi morfologis menunjukkan bahwa sel-sel tersebut memenuhi kriteria morfologi khas MSC, yaitu berbentuk fusiform (spindle-shaped) dan menunjukkan sifat adhesivitas yang tinggi terhadap permukaan flask kultur. Selain itu, sel-sel tersebut menunjukkan pola proliferasi yang homogen dengan distribusi ukuran dan orientasi sel yang konsisten, mengindikasikan stabilitas fenotip dan viabilitas seluler dalam kondisi kultur in vitro (Gambar 5.1A).

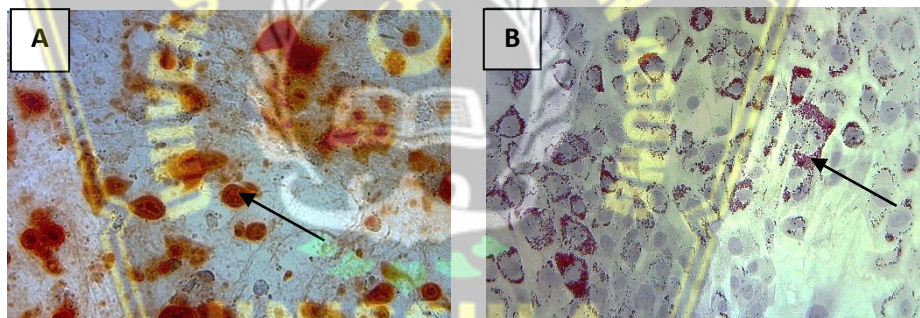
Untuk memvalidasi identitas sel sebagai MSC, dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan teknik flow cytometry. Metode ini digunakan untuk mengukur ekspresi marker permukaan sel yang spesifik, yang merupakan indikator kunci dalam identifikasi MSC. Analisis flow cytometry difokuskan pada deteksi ekspresi marker positif MSC, yaitu

CD90 dan CD29, serta marker negatif MSC, yaitu CD45 dan CD31. Hasil analisis menunjukkan bahwa sel-sel yang dikultur secara dominan mengekspresikan CD90 (99,98%) dan CD29 (99,25%), yang merupakan marker positif MSC. Di sisi lain, ekspresi CD45 (0,14%) dan CD31 (0,05%), yang merupakan marker negatif MSC, ditemukan dalam proporsi yang sangat rendah (Gambar 5.1B). Temuan ini mengonfirmasi bahwa sel-sel yang diisolasi dan dikultur memenuhi kriteria fenotipik MSC berdasarkan profil ekspresi surface marker.



Gambar 5. 1. Karakteristik MSC (A) Morfologi MSC berbentuk fibroblas-like (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31

Setelah validasi identitas MSC melalui *flow cytometry* sesuai kriteria ISCT, kemampuan diferensiasi MSC diuji menggunakan medium spesifik untuk osteogenik dan adipogenik. Berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa sel yang mampu diisolasi berhasil berdiferensiasi menjadi osteosit, ditandai dengan pewarnaan Alizarin Red positif untuk matriks kalsium, dan adiposit, diindikasikan oleh pewarnaan Oil Red O positif untuk lipid intraseluler (Gambar 5.2 A dan B). Hasil ini mengonfirmasi potensi multipoten sel sehingga memenuhi kriteria sebagai sel punca mesenkimal yang mampu berkembang menjadi sel fungsional tertentu di bawah kondisi induksi yang sesuai.



Gambar 5. 2. Kemampuan MSCs berdiferensiasi Kemampuan MSCs berdiferensiasi menjadi osteosit pada pewarna alizarin red dan (B) Adiposit pada pewarnaan oil red o (ditunjukkan dengan panah hitam, perbesaran 400x)

MSC kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam menggunakan *hypoxic chamber*. Setelah inkubasi, medium kultur yang mengandung sekretom MSC dikumpulkan dan diproses menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF). Proses TFF dilakukan dengan membran filtrasi berukuran 10-100 kDa untuk memisahkan komponen sekretom berdasarkan berat molekulnya.

Filtrat yang diperoleh, yang mengandung protein dan faktor bioaktif dengan berat molekul 10-100 kDa, kemudian dikonsentrasikan dan dimurnikan untuk menghasilkan *Secretome-derived Hypoxic Mesenchymal Stem Cell* (SH-MSC). Hasil analisis profil protein SH-MSC ditampilkan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5. 1. Profil Sitokin SH-MSC

Paramater	Hasil	Standar	Metode Analisis
VEGF	1064,74 pg/mL	>500 pg/mL	ELISA
SDF-1	7374,95 pg/mL	>500 pg/mL	ELISA
IL-10	523,23 pg/mL	>500 pg/mL	ELISA

5.1.2. Hasil Validasi Diabetes Tipe 2

Pembentukan model Diabetes Tipe 2 pada tikus divalidasi melalui pengukuran parameter metabolik, yaitu kadar Gula Darah Puasa (GDP) dan indeks *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR) pada hari ke-7. Hasil pengukuran menunjukkan peningkatan signifikan pada kedua parameter tersebut, sebagaimana disajikan pada Tabel 5.1. Temuan ini mengindikasikan keberhasilan induksi resistensi insulin dan hiperglikemia, yang sesuai dengan karakteristik patofisiologi DMT2.

Tabel 5. 2. Hasil Validasi Tikus Diabetes Tipe 2

Parameter	Nilai Standar	Nilai Analisis
Kadar Gula Darah Puasa	105 mg/dL	481,833 mg/dL
HOMA-IR	0,77	20,91

Setelah model DMT2 pada tikus berhasil divalidasi, tikus dibagi ke dalam beberapa kelompok eksperimen. Tikus yang tidak menerima induksi

STZ digunakan sebagai kelompok kontrol sehat (SH). Sementara itu, tikus yang mengalami DMT2 dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok perlakuan. Kelompok K2 terdiri dari tikus DMT2 yang diinjeksi dengan 500 μ L larutan NaCl sebagai kontrol negatif. Kelompok K3 menerima Metformin dengan dosis 45 mg/kgBB secara oral. Kelompok K4 mendapat injeksi IP SH-MSC sebanyak 500 μ L pada hari ke-8, 15 dan 22. Kelompok K5 diinjeksi dengan SH-MSC 500 μ L secara intraperitoneal pada hari ke-8, 15 dan 22, serta diberikan air alkali sebanyak 5 mL dari hari ke 0-29.

Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-30 untuk memastikan waktu yang optimal dalam menangkap perubahan ekspresi gen yang relevan. Jaringan pankreas diisolasi dan segera diproses untuk meminimalkan degradasi komponen seluler. Homogenisasi jaringan dilakukan menggunakan larutan Trizol yang mengandung RNase inhibitor untuk mencegah degradasi RNA oleh enzim ribonuklease. Setelah homogenisasi, RNA diekstraksi melalui fase pemisahan menggunakan kloroform, diikuti oleh presipitasi dengan isopropanol dan pencucian dengan etanol. RNA yang diperoleh kemudian dikuantifikasi dan dievaluasi kemurniannya menggunakan spektrofotometri.

Untuk analisis ekspresi gen, RNA yang telah diekstraksi digunakan sebagai templat dalam reaksi qRT-PCR. Analisis ini difokuskan pada gen FOXO1 dan GLUT4, yang merupakan gen target terkait regulasi metabolisme glukosa dan sensitivitas insulin. Hasil qRT-PCR memberikan

gambaran kuantitatif mengenai tingkat ekspresi gen tersebut, yang dapat dikorelasikan dengan efek terapi yang diberikan.

5.1.3. Ekspresi GLUT4

Penelitian ini mendapatkan hasil bahwa ekspresi gen GLUT4, kelompok K1 juga mencatat nilai baseline sebesar $1,00 \pm 0,00$. Kelompok K2 dan K3 menunjukkan ekspresi terendah yaitu sebesar $9,05 \pm 3,45$ dan $12,37 \pm 6,09$, sementara K4 dan K5 mencatat peningkatan ekspresi yang lebih tinggi, masing-masing sebesar $21,70 \pm 10,57$ dan $27,97 \pm 10,93$.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa data ekspresi gen GLUT4 terdistribusi secara normal, sebagaimana dibuktikan melalui uji Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Selain itu, uji homogenitas menggunakan Levene's Test mengonfirmasi bahwa data memiliki varians yang homogen ($p > 0,05$). Dengan terpenuhinya asumsi normalitas dan homogenitas, analisis statistik parametrik dapat diterapkan untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Data lengkap mengenai ekspresi gen GLUT4 disajikan secara rinci pada Tabel 5.3.

Tabel 5. 3. Hasil Analisis Statistik Data Ekspresi GLUT4

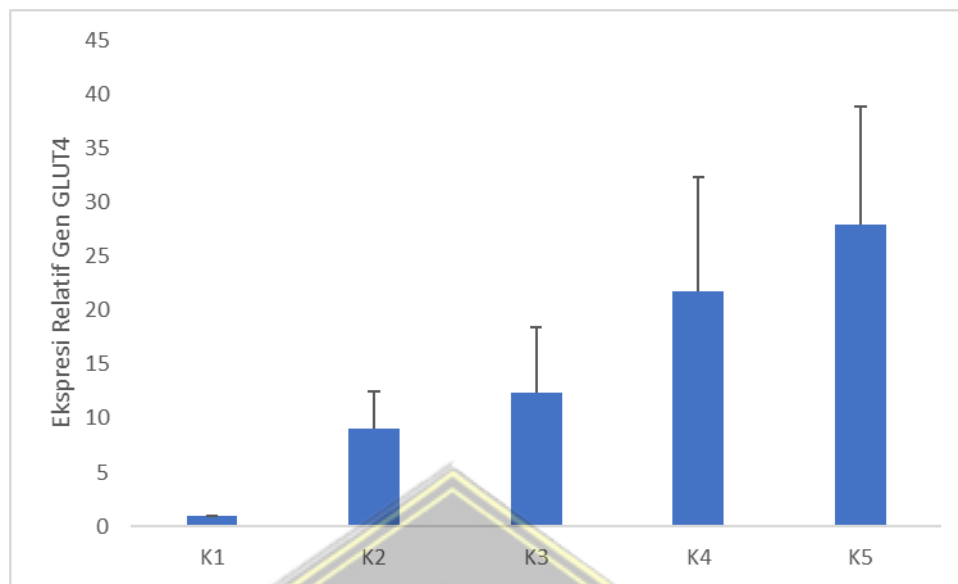
Variabel	Kelompok				P
	K2	K3	K4	K5	
GLUT4	$9,05 \pm 3,45$	$12,37 \pm 6,09$	$21,70 \pm 10,57$	$27,97 \pm 10,93$	
Mean $\pm$ SD					
Shapiro Wilk					$>0,05$
Lavene test					$>0,05$
One Way					$<0,00$
Anova					

Data yang dinyatakan signifikan pada analisis One Way Anova dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui hubungan antar kelompok perlakuan. Hasil analisis LSD ditampilkan pada table 5.4

Tabel 5. 4. Hasil Analisis LSD ekspresi GLUT4

Kelompok	Kelompok	GLUT4
K2	K3	0,50
	K4	0,02
	K5	0,00
K3	K4	0,07
	K5	0,00
K4	K5	0,21

Hasil analisis uji LSD menemukan bahwa ekspresi GLUT4 perlakuan K4 secara signifikan berbeda dibandingkan dengan perlakuan K2 ($P < 0,05$), namun tidak berbeda jika dibandingkan dengan K3 ($P > 0,05$), sedangkan K5 berbeda signifikan dibandingkan dengan K2 dan K3 ($P > 0,05$) namun tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan K4 ($P > 0,05$). Hal ini menandakan kombinasi air alkali dan injeksi SH-MSC memberikan dan GLUT4 yang tidak berbeda dibandingkan dengan injeksi SH-MSC saja. Gambaran ekspresi GLUT4 ditampilkan dalam gambar 5.3.



Gambar 5. 3. Perbandingan Ekspresi Relatif gen GLUT4

5.1.4. Ekspresi FOXO1

Hasil analisis qRT-PCR menemukan bahwa ekspresi gen FOXO1, kelompok K1 mencatat nilai baseline sebesar $1,00 \pm 0,00$. Kelompok K2 menunjukkan peningkatan ekspresi tertinggi dengan nilai $15,36 \pm 2,14$, diikuti oleh K3 sebesar $8,94 \pm 5,61$, K4 sebesar $6,92 \pm 3,27$, dan K5 sebesar $2,82 \pm 1,50$. Kelompok K2 memiliki ekspresi FOXO1 lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, sementara K5 menunjukkan ekspresi yang lebih rendah namun masih di atas baseline (K1). Kelompok K4 dan K5 memiliki ekspresi gen FOXO1 berada di bawah K3.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa data ekspresi gen FOXO1 terdistribusi secara normal, sebagaimana dibuktikan melalui uji Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Selain itu, uji homogenitas menggunakan Levene's Test mengonfirmasi bahwa data memiliki varians yang homogen

($p > 0,05$). Dengan terpenuhinya asumsi normalitas dan homogenitas, analisis statistik parametrik dapat diterapkan untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Data lengkap mengenai ekspresi gen FOXO1 disajikan secara rinci pada Tabel 5.4.

Tabel 5. 5. Hasil Analisis Statistik Data Ekspresi FOXO1

Variabel	Kelompok				P
	K2	K3	K4	K5	
FOXO1	15,36 ± 2,14	8,94±5.61	6,92 ± 3,27	2,82 ± 1,50	
Mean±SD					
Shapiro Wilk					>0,05
Lavene test					>0,05
One Way Anova					<0,00

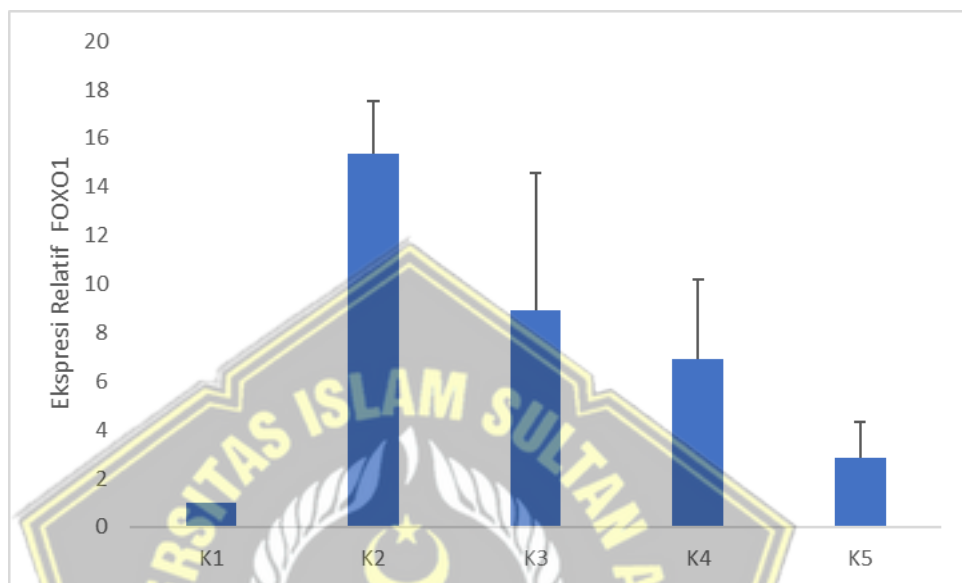
Data yang dinyatakan signifikan pada analisis One Way Anova dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui hubungan antar kelompok perlakuan. Hasil analisis LSD ditampilkan pada table 5.3

Tabel 5. 6. Hasil Analisis LSD ekspresi FOXO1

Kelompok	Kelompok	FOXO1
K2	K3	0,05
	K4	0,00
	K5	0,00
K3	K4	0,33
	K5	0,00
K4	K5	0,06

Hasil analisis uji LSD menemukan bahwa ekspresi FOXO1 perlakuan K4 secara signifikan berbeda dibandingkan dengan perlakuan K2 ($P < 0,05$), namun tidak berbeda jika dibandingkan dengan K3 ($P > 0,05$), sedangkan K5 berbeda signifikan dibandingkan dengan K2 dan K3 ($P > 0,05$) namun tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan K4 ($P > 0,05$). Hal ini menandakan kombinasi air alkali dan injeksi SH-MSC

memberikan ekspresi FOXO1 yang tidak berbeda dibandingkan dengan injeksi SH-MSC saja. Gambaran ekspresi FOXO1 ditampilkan dalam gambar 5.3



Gambar 5. 4. Perbandingan Ekspresi Relatif gen FOXO1

5.2 Pembahasan

Penelitian ini menemukan adanya penurunan ekspresi FOXO1 dan peningkatan GLUT4 pada pemberian SH-MSC serta kombinasi antara SH-MSC dan air alkali pada tikus model DMT2. Pada kelompok kontrol sehat (K1), ekspresi FOXO1 dan GLUT4 berada pada tingkat basal ($1,00 \pm 0,00$), sedangkan pada kelompok tikus DMT2 tanpa terapi (K2), ekspresi FOXO1 meningkat drastis menjadi $15,36 \pm 2,14$. Peningkatan ekspresi FOXO1 ini sejalan dengan karakteristik DMT2, di mana terjadi resistensi insulin yang menyebabkan peningkatan glukoneogenesis di hati dan penurunan penggunaan glukosa oleh jaringan perifer. FOXO1 yang aktif berkontribusi

terhadap peningkatan produksi glukosa oleh hati, memperburuk hiperglikemia. Sementara itu, ekspresi GLUT4 pada kelompok ini meningkat menjadi $9,05 \pm 3,45$, yang kemungkinan merupakan mekanisme kompensasi terhadap resistensi insulin. Meskipun meningkat, ekspresi GLUT4 yang lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan menunjukkan bahwa mekanisme kompensasi ini tidak cukup untuk mengatasi gangguan metabolisme glukosa pada DMT2.

Pada kelompok tikus DMT2 yang menerima terapi SH-MSC (K4), ekspresi FOXO1 menurun menjadi $6,92 \pm 3,27$, menunjukkan adanya perbaikan dalam regulasi metabolisme glukosa. SH-MSC mengandung faktor pertumbuhan dan sitokin yang dapat meningkatkan sensitivitas insulin serta menekan aktivasi jalur FOXO1, sehingga mengurangi produksi glukosa oleh hati. Selain itu, ekspresi GLUT4 meningkat signifikan menjadi $21,70 \pm 10,57$, menunjukkan peningkatan efektivitas transportasi glukosa ke dalam sel. Hal ini mengindikasikan bahwa terapi SH-MSC mampu memperbaiki resistensi insulin dan meningkatkan efisiensi pengambilan glukosa oleh jaringan perifer. Faktor-faktor yang terkandung dalam SH-MSC, seperti TGF- β dan IL-10, dapat berkontribusi dalam meningkatkan ekspresi GLUT4 melalui peningkatan aktivitas jalur sinyal insulin.

Pada kelompok tikus DMT2 yang mendapatkan kombinasi terapi SH-MSC dan air alkali (K5), ekspresi FOXO1 semakin menurun menjadi $2,82 \pm 1,50$, sementara ekspresi GLUT4 meningkat lebih tinggi hingga $27,97 \pm 10,93$. Efek penurunan ekspresi FOXO1 ini menunjukkan bahwa

kombinasi terapi memberikan efek yang lebih kuat dalam menekan produksi glukosa dan meningkatkan sensitivitas insulin dibandingkan terapi tunggal SH-MSC. Air alkali diketahui memiliki efek antioksidan dan dapat meningkatkan keseimbangan pH seluler, yang berperan dalam mengurangi stres oksidatif dan inflamasi kronis pada DMT2. Stres oksidatif adalah faktor utama dalam perkembangan resistensi insulin, dan dengan menurunkan stres oksidatif, air alkali dapat membantu meningkatkan regulasi jalur sinyal insulin serta menekan ekspresi FOXO1.

Secara statistik, ekspresi gen pada kelompok K5 berbeda signifikan dibandingkan K3, menunjukkan bahwa terapi SH-MSC dengan kombinasi dengan air alkali, memiliki efek signifikan dalam memperbaiki regulasi metabolisme glukosa dibandingkan dengan terapi standar. Kemudian, meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan antara pemberian SH-MSC saja dan SH-MSC kombinasi air alkali, terdapat kecenderungan peningkatan ekspresi GLUT4 pada kelompok K5 dibandingkan K4 juga mengindikasikan bahwa kombinasi terapi dapat lebih efektif dalam meningkatkan transportasi glukosa ke dalam sel. Air alkali dapat meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam metabolisme glukosa, serta mengurangi resistensi insulin melalui modulasi jalur sinyal insulin-PI3K/Akt. Jalur ini berperan dalam translokasi GLUT4 ke membran sel untuk meningkatkan pengambilan glukosa. Dengan meningkatnya ekspresi GLUT4, pengambilan glukosa oleh jaringan perifer menjadi lebih efisien, sehingga kadar glukosa darah dapat lebih terkontrol.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi SH-MSC dapat menurunkan ekspresi FOXO1 dan meningkatkan ekspresi GLUT4, yang berkontribusi dalam memperbaiki homeostasis glukosa pada kondisi DMT2. Kombinasi SH-MSC dengan air alkali menunjukkan adanya kecenderungan efek yang lebih optimal, dengan penurunan ekspresi FOXO1 yang cenderung lebih rendah dan peningkatan GLUT4 yang cenderung lebih tinggi. Namun demikian, penelitian masih terbatas pada hewan coba sehingga diperlukan penelitian lanjutan ke manusia dan diharapkan penelitian selanjutnya melanjutkan dengan mengkaji peran SH-MSC yang dikombinasikan dengan obat standar pada DMT2.



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi FOXO1 dan GLUT4 pada tikus jantan galur Wistar model Diabetes Tipe 2 menunjukkan hal-hal berikut:

1. Terdapat peningkatan yang signifikan pada pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi GLUT4 pada tikus model DMT2
2. Terdapat penurunan yang signifikan pada pemberian SH-MSC dan air alkali terhadap ekspresi FOXO1 pada tikus model DMT2

6.2. Saran

1. Penelitian ini masih terbatas pada hewan coba sehingga diperlukan penelitian lanjutan ke manusia
2. Penelitian diharapkan dilanjutkan dengan mengkaji peran SH-MSC yang dikombinasikan dengan obat standar pada DMT2.
3. Studi yang akan datang diharapkan untuk menganalisis ekspresi protein yang mempengaruhi jalur pensinyalan FOXO1 dan GLUT4 agar dapat melihat jalur yang berperan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fazakerley, D. J., Koumanov, F. & Holman, G. D. GLUT4 On the move. *Biochem. J.* **479**, 445–462 (2022).
2. van Gerwen, J., Shun-Shion, A. S. & Fazakerley, D. J. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochemical Society Transactions* vol. 51 1057–1069 at <https://doi.org/10.1042/BST20221066> (2023).
3. Sutandar, V. H., Saleh, M. I. & Maritska, Z. GLUT4 as A Protein Target for Type 2-Diabetes Mellitus Therapy With Natural Compounds. *Sriwij. J. Med.* **6**, 9–16 (2023).
4. Rahmi, R., Machrina, Y. & Yamamoto, Z. Effect of Exercise Intensity in Glut4 Expression on Type 2 Diabetes Mellitus Rat. *Media Ilmu Keolahragaan Indones.* **11**, 53–56 (2021).
5. Alharbi, M. A. & Graves, D. T. FOXO 1 deletion in chondrocytes rescues diabetes-impaired fracture healing by restoring angiogenesis and reducing apoptosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **14**, (2023).
6. Kamal, M. M., Ammar, R. A. & Kassem, D. H. Silencing of forkhead box protein O-1 (FOXO-1) enhances insulin-producing cell generation from adipose mesenchymal stem cells for diabetes therapy. *Life Sci.* **344**, (2024).
7. Teaney, N. A. & Cyr, N. E. FoxO1 as a tissue-specific therapeutic target for type 2 diabetes. *Frontiers in Endocrinology* vol. 14 at <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1286838> (2023).
8. Aryan, A. *et al.* Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Wound Healing in Deep Second-Degree Burns in Male Rats. *Cells Tissues Organs* **206**, 317–329 (2019).
9. Guo, S. *et al.* Adipose-derived stem cell-conditioned medium protects fibroblasts at different senescent degrees from UVB irradiation damages. *Mol. Cell. Biochem.* **463**, 67–78 (2020).
10. Sari, M. I. *et al.* The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis.

Biomedicines **11**, 2325 (2023).

11. Widyaningsih, W. ., Putra, A. ., Priyantini, S. ., Muhar, A. M. ., Sumarawati, T. ., Trisnadi, S. ., Amalina, N. D. ., Alif, I. ., Prasetyo, A. ., & Satria Irawan, R. C. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Trends Sci. , 7278*. **21**, 72–78 (2024).
12. Bajgai, J. *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Gastrointestinal Diseases. *Processes* vol. 10 at <https://doi.org/10.3390/pr10010087> (2022).
13. 2019_jurnal_Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood sugar Levels of Diabetes Mellitus Patients. Effect of Alkaline Water Consumption on Decreasing Blood Sugar Levels of Diabetes Mellitus Patients. (2019).
14. Antonio, J. M., Fadriquel, A., Jeong, Y. J., Kim, C. S. & Kim, S. K. Alkaline reduced water attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and innate immune response triggered by intestinal epithelial dysfunction. *Processes* **9**, (2021).
15. Sun, H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **183**, (2022).
16. Akiyode, O. F. & Adesoye, A. A. Adverse effects associated with newer diabetes therapies: A review article. *Journal of Pharmacy Practice* vol. 30 238–244 at <https://doi.org/10.1177/0897190015594732> (2017).
17. Rias, Y. A., Kurniawan, A. L., Chang, C. W., Gordon, C. J. & Tsai, H. T. 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* **9**, 1–17 (2020).
18. Ramadhan, A., Wicaksono, S. A., Nugroho, T. E. & Utami, S. B. The Effects of Alkaline Ionized Water Administration to the Total Cholesterol Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Accompanied by Dyslipidemia. *Pakistan J. Med. Heal. Sci.* **15**, 1449–1455 (2021).

19. Ribot, J. *et al.* Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* (2017) doi:10.1111/jcmm.12969.
20. Sun, Y. *et al.* Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction. *ACS Nano* **12**, 7613–7628 (2018).
21. Egan, A. M. & Dinneen, S. F. What is diabetes? *Medicine (United Kingdom)* vol. 50 615–618 at <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2022.07.001> (2022).
22. Barszcz, G., Bartusik-Aebischer, D. & Aebischer, D. Insulin. in *The Biochemical Guide to Hormones* 103–107 (2023). doi:10.5040/9798400605284.ch-051.
23. Harreiter, J. & Roden, M. Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023). *Wien. Klin. Wochenschr.* **135**, 7–17 (2023).
24. Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M. & Vickers, M. H. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 at <https://doi.org/10.3390/ijms19113342> (2018).
25. Kabamba, A. T., Bakari, S. A. mur., Longanga, A. O. tshud. & Lukumwena, Z. K. alal. Decrease in HDL-cholesterol indicator of oxidative stress in type 2 diabetes. *Pan Afr. Med. J.* **19**, 140 (2014).
26. Asmat, U., Abad, K. & Ismail, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* vol. 24 547–553 at <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013> (2016).
27. Ighodaro, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 108 656–662 at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058> (2018).
28. Caturano, A. *et al.* Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 45 6651–6666 at <https://doi.org/10.3390/cimb45080420>

(2023).

29. Singh, R., Ashish, A., Shah, A. & Shekhar Pandey, S. Interaction between oxidative stress and diabetes: a mini-review. *J. Diabetes, Metab. Disord. Control* **7**, 58–61 (2020).
30. Luo, W., Ai, L., Wang, B. fa & Zhou, Y. High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling. *Biomed. Pharmacother.* **120**, (2019).
31. Ratnawati, L. Y., Wirjatmadi, B., Adriani, M. & Soenarnatalina. Insulin resistance in obese and non obese pre-pubertal children: Cross sectional study in Indonesia. *Indian J. Public Heal. Res. Dev.* **10**, 1777–1781 (2019).
32. Christina, C. P. *et al.* Bone quality is affected in acromegaly beyond insulin resistance. *Endocr. Abstr.* (2020) doi:10.1530/endoabs.70.ep111.
33. Clodi, M., Resl, M., Abrahamian, H., Föger, B. & Weitgasser, R. Hyperglycemia in critically ill. *Wien. Klin. Wochenschr.* **135**, 272–274 (2023).
34. González, P., Lozano, P., Ros, G. & Solano, F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 at <https://doi.org/10.3390/ijms24119352> (2023).
35. Banday, M. Z., Sameer, A. S. & Nissar, S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J. Med.* **10**, 174–188 (2020).
36. Galicia-Garcia, U. *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms21176275> (2020).
37. Mishra, Y., Chattaraj, A. & Kajal. The pathophysiology of diabetes mellitus. in *Management of Diabetes Mellitus Based on Natural Products* 21–40 (2023).
38. Deng, D. & Yan, N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Science* vol. 25 546–558 at <https://doi.org/10.1002/pro.2858> (2016).

39. Berger, C. & Zdzienbło, D. Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* vol. 472 1249–1272 at <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02383-4> (2020).
40. Wang, X. *et al.* Progress in Research on the Alleviation of Glucose Metabolism Disorders in Type 2 Diabetes Using *Cyclocarya paliurus*. *Nutrients* vol. 14 at <https://doi.org/10.3390/nu14153169> (2022).
41. Le, T. K. C. *et al.* Insulin signaling and its application. *Frontiers in Endocrinology* vol. 14 at <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1226655> (2023).
42. Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi, M. & Frittitta, L. Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: Role of insulin signalling and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 at <https://doi.org/10.3390/ijms19113306> (2018).
43. Singh, D. D. *et al.* Development of Dementia in Type 2 Diabetes Patients: Mechanisms of Insulin Resistance and Antidiabetic Drug Development. *Cells* vol. 11 at <https://doi.org/10.3390/cells11233767> (2022).
44. O'Neill, B. T. *et al.* FOXO transcription factors are critical regulators of diabetes-related muscle atrophy. *Diabetes* **68**, 556–570 (2019).
45. Marchelek-Mysliwiec, M. *et al.* The Role of Forkhead Box O in Pathogenesis and Therapy of Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 at <https://doi.org/10.3390/ijms231911611> (2022).
46. Du, S. & Zheng, H. Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. *Cell and Bioscience* vol. 11 at <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00700-7> (2021).
47. Zhang, M. & Zhang, X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. *Archives of Dermatological Research* vol. 311 83–91 at <https://doi.org/10.1007/s00403-018-1879-8> (2019).
48. Zatterale, F. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Frontiers in Physiology* at <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01607> (2020).

49. Weng, Q. *et al.* Oxidative stress induces mouse follicular granulosa cells apoptosis via JNK/FoxO1 Pathway. *PLoS One* **11**, (2016).
50. Rais, N. *et al.* Model of Streptozotocin-nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: a Comparative Review. *Curr. Diabetes Rev.* **18**, (2021).
50. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Tetap Produktif, Cegah dan Atasi Diabetes Melitus. *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. 2020.
51. Kemenkes RS Sardjito. Air Alkali, Antara Fakta dan Manfaatnya. 2019. [RSUP Dr. Sardjito | Air Alkali, Antara Fakta dan Manfaatnya](#)
52. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes Melitus: a review of current trends. *Oman Med J.* 2012;27(4):269-273.
53. Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes Melitus and oxidative stress – A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2016;24:547-553.
54. Dita SP. Diabetes Melitus dan Antioksidan. *KELUWIH: Jurnal Kesehatan dan Kedokteran.* 2019;1(1):47-51.
55. Bajaj S, Khan A. Antioxidants and diabetes. *Indian J Endocr Metab.* 2012;16:S267-71.
56. Gozalez P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:9352.
57. Kuanang HCP & Wangko S. GLUT4 Jaringan Adiposa Fungsi dan Disfungsi. *Jurnal Biomedik.* 2010;2(3):140-147.
58. Behl Y, Krothapalli P, Desta T, et al. FOXO1 Plays an Important Role in Enhanced Microvascular Cell Apoptosis and Microvascular Cell Loss in Type 1 and type 2 Diabetic Rats. *Diabetes Journals.* 2009;58.
59. Yuan Y, Kong F, Xu H, et al. Cryo-EM structure of human glucose transporter GLUT4. *Nature Communications.* 2022;13:2671.
60. Eleuteri S, Fierabracci A. Insight into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4597.

61. Kim GU, Sung SE, Kang KK, et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and MSC-Derived Extracellular Vesicles for the Treatment of Spinal Cord Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:13672.
62. Ribot J, Caliapeourmal G, Paquet J, et al. Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* 2017;21(2):349-363.
63. 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.
64. Sharma S, Lee KJ, Bajgai J, et al. Anti-Oxidative and Anti-Diabetic Effects of Electrolyzed Weekly Alkaline Reduced Water on Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Processes.* 2022, 10, 2025.
65. Irawan RCS, Putra A, Trisnadi S, Ghaissani SS, Hidayah N. Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells decreased tumor necrosis factor- α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes melitus model rats. *Univ Med.* 2023;42:320-8.
66. Kadir NAAA, Rahmag A, Jaafar HZE. Protective Effects of Tamarillo (*Cyphomandra betacea*) Extract against High Fat Diet Induced Obesity in Sprague-Dawley Rats. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Obesity.* 2015.
67. Nelson, Jenna. The Effects of Sodium Bicarbonate on Type One Diabetes Development in Two Mouse Models. *Culminating Projects in Biology.* 2021;53.
68. Delos Reyes FSLG, Mamaril ACC, Matias TJP, et al. The Search for the Elixir of Life: On the Therapeutic Potential of Alkaline Reduced Water in Metabolic Syndromes. *Processes.* 2021;9-1876.
69. Holthaous M, Santhakumar N, Wahlers T. & Paunel-Görgülü A. The Secretome of Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Drives Polarization and Reprogramming of M2a Macrophages Toward an IL-10-Producing Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23, 4014.

70. Rahmawati N, DK K, & Afifah DN. Antioxidant Total and HOMA-IR of Diabetic Rats Given Crocatum piper and Andrographis paniculata Leaf Extracts. *J. Biomed. Transl. Res.* 2021;7, 56–61.
71. Aleme BM & Amadi BA. Assessment of the Risk of Developing Cardiovascular Disease in Prediabetic and Diabetic Wistar Rats with Insulinaemia, in a Selected Model. *J. Complement. Altern. Med. Res.* 2020;1–11. doi:10.9734/jocamr/2022/v18i130341.
72. Widyaningsih W, Putra A, Priyantini S, Muhar AM, Sumarawati T, Trisnadi S, Amalina ND, Alif I, Prasetyo A, & Satria Irawan RC. Secretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Trends Sci.* 2024;7278. 21, 72–78.
73. Bajgai J, Kim CS, Rahman MH, Jeong ES, Jang HY, Kim KE, *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Gastrointestinal Diseases. *Processes.* 2022; 10. doi:10.3390/pr10010087.
74. 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;16, 4082. doi:10.3390/nul16234082.
75. Teratani T, *et al.* Mesenchymal Stem Cells Secretions Enhanced ATP Generation on Isolated Islets during Transplantation. *Islets.* 2022;14, 69–81.
76. Abdolmohammadi K, *et al.* Effect of hypoxia preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Adv. Pharm. Bull.* 2020;10, 297–306.
77. Lee M, *et al.* Effects of Alkaline-Reduced Water on Exercise-Induced Oxidative Stress and Fatigue in Young Male Healthy Adults. *Processes.* 2022;10.
78. Siswanto E, Purwanto NH & Sutomo. Effectiveness of Alkali Water Consumption to Reduce Blood Sugar Levels in Diabetes Mellitus Type 2. *Journal of Diabetes Mellitus.* 2017;7, 249-264. doi: 10.4236/jdm.2017.74020

79. Agustanti D & Purbianto. Pengaruh Konsumsi Air Alkali Terhadap Kadar Glukosa Darah Pada Pasien Diabetes Mellitus. *Jurnal Ilmiah Keperawatan Sai Betik*. 2020;16(2)-149. doi: 10.26630/jkkep.v16i2.3099
80. Malo MS. A High Level of Intestinal Alkaline Phosphatase Is Protective Against Type 2 Diabetes Mellitus Irrespective of Obesity. *Elsevier B.V.* 2015;2352-3964. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.027
81. Yang F, Wang M, Du J, Fu, Y, Deng J, Wu, J, Xhang Y & Li Y. redicting Life Span of Type 2 Diabetes Patients Through Alkaline Phosphatase and vitamin D: Results from NHANES 1999-2018. *Elsevier B.V.* 2023;0021-9150. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2023.117.318
82. Triyoso & Sari DR. Pengaruh Terapi Nonfarmakologi Air Minum Beralkali pH 8 Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Dara pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe II di Kelurahan Watkandis Bandar Lampung. *Jurnal Kreativitas Pengabdian Kepada Masyarakat (PKM)*. 2022; 2308-2314. doi: 10.33024/jkpm.v5i7.4946
83. 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 Wuality of Life in Individuals with Type 2 Diabetes: A Community Basen Randomized Controlled Trial. *Antioxidants*. 2020;9, 946. doi: 10.3390/antiox9100946
84. Wicaksono SA, Nabyla DH & Utami SB. The Effects of Alkaline Reduced Water Administration to The fasting Blood Glucose Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *PJMHS*. 2020;1260-1266.
85. Vivi HS, Saleh MI & Maritska Z. GLUT4 as A Protein Target for Type 2- Diabetes Mellitus Therapy With Natural Compounds. *Sriwijaya Journal of Medicine*. 2023;9-16. doi: 10.32539/SJm.v6i1.154
86. Sun Y, Shi H, Yin S, Ji C, *et al.* Human Mesenchyal Stem Cell Derived Exosomes Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β -Cell Destruction. *Pubmed*. 2018;12(8):7613-7628. doi: 10.1021/acsnano.7b07643
87. Yugal B, *et al.* FOXO1 Plays An Important Role in Enhaced Microvascular

Cell Apoptosis and Microvascular Cell Loss in Type 1 and Type 2 Diabetic Rats. 2009;58(4):917-25. doi: 10.2337/db08-0537.

88. Rahmi, Machrina Y & Yamamoto Z. Effect of Exercise Intensity in GLUT4 Expression on Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Media Ilmu Keolahragaan Indonesia*. 2021;53-56.

