

PENGARUH PEMBERIAN *MESENCHYMAL STEM CELLS WHARTON'S JELLY*
TERHADAP EKSPRESI GEN GLUT-4 PADA TIKUS ALZHEIMER



Skripsi

Diajukan ke Fakultas Kedokteran Universitas Andalas sebagai Pemenuhan Salah Satu
Syarat untuk Mendapatkan Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

BERLIANISA

NIM : 1810311014

Pembimbing

Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S(K)

dr. Hirowati Ali, PhD

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ANDALAS

PADANG

2021

PENGARUH PEMBERIAN *MESENCHYMAL STEM CELLS WHARTON'S JELLY*
TERHADAP EKSPRESI GEN GLUT-4 PADA TIKUS ALZHEIMER



Skripsi

Diajukan ke Fakultas Kedokteran Universitas Andalas sebagai Pemenuhan Salah Satu
Syarat untuk Mendapatkan Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

BERLIANISA
NIM : 1810311014

Pembimbing :

1. Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S(K)
2. dr. Hirowati Ali, PhD

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2021

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

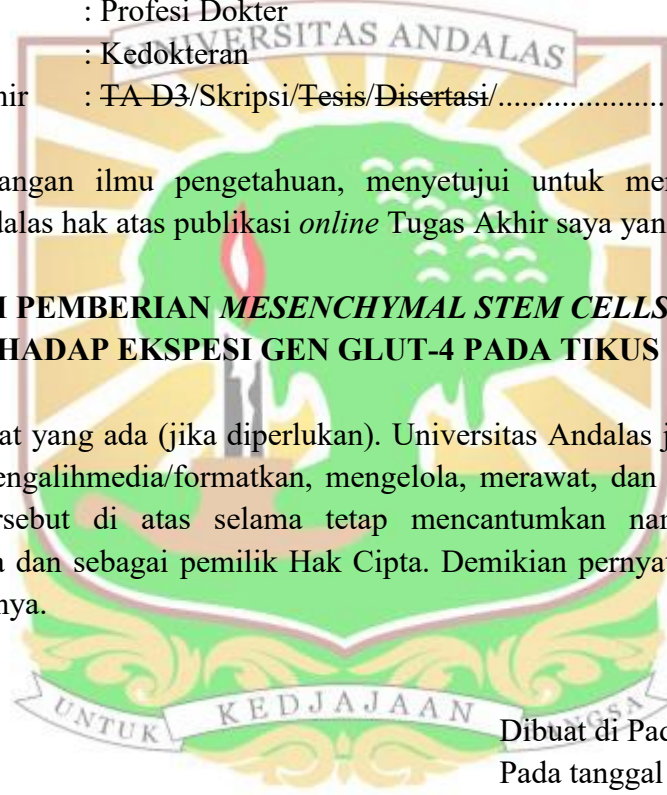
Saya mahasiswa/dosen/tenaga kependidikan* Universitas Andalas yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama lengkap : Berlianisa
No. BP/NIM/NIDN : 1810311014
Program Studi : Profesi Dokter
Fakultas : Kedokteran
Jenis Tugas Akhir : TA D3/Skripsi/Tesis/Disertasi/.....**

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Andalas hak atas publikasi *online* Tugas Akhir saya yang berjudul:

PENGARUH PEMBERIAN *MESENCHYMAL STEM CELLS WHARTON'S JELLY* TERHADAP EKSPRESI GEN GLUT-4 PADA TIKUS ALZHEIMER

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Universitas Andalas juga berhak untuk menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola, merawat, dan mempublikasikan karya saya tersebut di atas selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.



Dibuat di Padang,
Pada tanggal 25 Januari 2022
Yang menyatakan,

(Berlianisa)

* pilih sesuai kondisi

** termasuk laporan penelitian, laporan pengabdian masyarakat, laporan magang, dll

PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini merupakan hasil karya sendiri, dan semua sumber referensi yang dikutip maupun yang dirujuk telah saya nyatakan dengan benar dan bukan merupakan plagiat.

Nama : Berlianisa

NIM : 1810311014

Tanda Tangan



Tanggal : 20 Januari 2022

PERSETUJUAN SKRIPSI

Skripsi ini telah disetujui oleh :

Pembimbing I

Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S(K)
NIP. 196407081991032001

Pembimbing II

dr. Hirowati Ali, PhD
NIP. 197904032006042002

Mengetahui:

Wakil Dekan I,

Fakultas Kedokteran Universitas Andalas



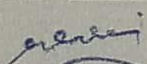
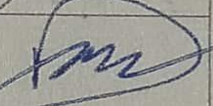
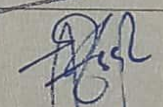

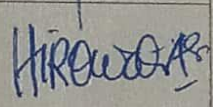
Dr. dr. Efrida, Sp.PK(K), M. Kes
NIP. 197010021999032002

PENGESAHAN OLEH TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi ini telah diuji dan dinilai oleh Tim Penguji Pendidikan Sarjana
Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Padang, 20 Januari 2022

Tim Penguji

Nama	Jabatan	Tanda Tangan
Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)	Ketua Penguji	
Dr. dr. Daan Khambri, Sp.B(K)Onk, M. Kes	Sekretaris	
Dr. Dessy Arisanty, M.Sc	Anggota I	
Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S(K)	Anggota II	
dr. Hirowati Ali, PhD	Anggota III	

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah S.W.T, shalawat dan salam untuk Nabi Muhammad S.A.W, berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton’s Jelly* terhadap Ekspresi Gen Glut-4 pada Tikus Alzheimer” yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Keberhasilan dalam penyusunan skripsi ini telah banyak dibantu oleh berbagai pihak. Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. dr. Afriwardi, Sp.KO, SH, MA selaku Dekan beserta Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
2. Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S(K) dan dr. Hirowati Ali, PhD selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, dan saran kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
3. Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K), Dr. dr. Daan Khambri, Sp.B(K)Onk, M. Kes, dan Dr. Dessy Arisanty, M.Sc selaku penguji skripsi yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan dan evaluasi dalam penyusunan skripsi.
4. dr. Amel Yanis, Sp.KJ selaku pembimbing akademik yang selalu membimbing saya, memberikan saran dan mengarahkan dengan baik.
5. Seluruh dosen pengajar di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis.
6. Kedua orang tua saya Husein Muhammad dan Yuliweti serta saudara saya Habil Kahfi dan Hafiz Zahri serta teman-teman, abang, dan kakak sejawat yang selalu memberikan dukungan kepada penulis disetiap situasi.

Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat terutama untuk kesehatan manusia dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Semoga Allah SWT senantiasa mencurahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah banyak membantu.

Padang, 20 Januari 2022



Penulis

ABSTRACT

THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS WHARTON'S JELLY OF GENE EXPRESSION GLUT-4 IN ALZHEIMER'S RAT

By

Berlianisa

Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly (MSC-WJ) is a stem cell with a very high rate of proliferation that has recently been developed as a source of alternative medicine in Alzheimer's disease. In the brains of patients with Alzheimer's a decrease in gene expression of Glut-4, a glucose transporter in the brain was found due to impaired insulin signaling by Beta Amyloid plaque. This study purpose to observe gene expression of Glut-4 in the brains of Alzheimer's rat with AlCl₃ induction, after being given MSC-WJ.

This research is an experimental study with the post test only control group design which was used 18 experimental RNA animals which were divided into 3 groups (K-, K+, and P). The average value of Glut-4 gene expression was obtained from the comparison of the Glut-4 gene to GAPDH gene using a semiquantitative method with ImageJ. Data analysis using One Way ANOVA test. It is said to be meaningful if the p value < 0.05.

The average ratio gene expression Glut-4 obtained in the K-, K+, P groups were 2.28, 2.82, and 3.13. There was no significant difference in each group with p value = 0.099 (p > 0.05).

The conclusion is no significant difference in Glut-4 gene expression in the brains of Alzheimer's rat given MSC-WJ compared to those not given MSC-WJ.

Keywords: *Beta Amyloid, Glut-4, Aluminum chloride (AlCl₃), Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly (MSC-WJ), Alzheimer's*

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN MESENCHYMAL STEM CELLS WHARTON'S JELLY TERHADAP EKSPRESI GEN GLUT-4 PADA TIKUS ALZHEIMER

Oleh

Berlianisa

Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly (MSC-WJ) merupakan sel punca dengan tingkat proliferasi yang sangat tinggi sehingga akhir-akhir ini dikembangkan menjadi salah satu sumber pengobatan alternatif pada penyakit Alzheimer. Pada otak penderita Alzheimer ditemukan penurunan ekspresi gen Glut-4, suatu transporter glukosa di otak yang terjadi akibat gangguan pensinyalan insulin oleh plak *Beta Amyloid*. Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi gen Glut-4 pada otak tikus yang mengalami Alzheimer dengan induksi $AlCl_3$, setelah diberikan MSC-WJ.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design* yang menggunakan 18 sampel RNA hewan coba yang dibagi menjadi 3 kelompok (K-, K+, dan P). Nilai rata-rata ekspresi gen Glut-4 didapatkan dari perbandingan gen Glut-4 terhadap gen GAPDH menggunakan metode semikuantitatif dengan ImageJ. Analisis data menggunakan uji *One Way ANOVA*. Dikatakan bermakna bila nilai $p < 0,05$.

Rata-rata ratio ekspresi gen Glut-4 yang didapatkan pada kelompok K-, K+, P berturut-turut adalah 2,28, 2,82, dan 3,13. Didapatkan tidak ada perbedaan yang bermakna setiap kelompok hewan coba dengan nilai $p = 0,099$ ($p > 0,05$).

Kesimpulan adalah tidak ditemukan perbedaan ekspresi gen Glut-4 pada otak tikus Alzheimer yang diberikan MSC-WJ dibandingkan yang tidak diberikan MSC-WJ.

Kata Kunci : *Beta Amyloid*, Glut-4, Aluminium klorida ($AlCl_3$), *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ), Alzheimer

DAFTAR ISI

SAMPUL LUAR.....	Error! Bookmark not defined.
SAMPUL DALAM.....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	i
PERSETUJUAN SKRIPSI.....	ii
PENGESAHAN OLEH TIM PENGUJI SKRIPSI.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti.....	6
1.4.2 Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan.....	7
1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan.....	7
1.4.4 Manfaat Bagi Peneliti Lain.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Alzheimer Disease (AD).....	8
2.1.1 Definisi dan klasifikasi <i>Alzheimer Disease</i> (AD).....	8
2.1.2 Epidemiologi <i>Alzheimer Disease</i> (AD).....	8
2.1.3 Etiologi <i>Alzheimer Disease</i> (AD).....	9
2.1.4 Manifestasi klinis <i>Alzheimer Disease</i> (AD).....	9
2.1.5 Patofisiologi <i>Alzheimer Disease</i> (AD).....	10
2.1.6 Perkembangan Terapi <i>Alzheimer Disease</i> (AD).....	12
2.2 Mesenchymal Stem Cells (MSCs).....	13
2.3 Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly (MSC-WJ).....	13
2.4 Glut-4.....	15
2.5 Kerangka Teori.....	18
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	19
3.1 Kerangka Konseptual.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	21
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	21
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21

4.3	Populasi, Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel.....	21
4.3.1	Populasi.....	21
4.3.2	Sampel.....	21
4.3.3	Kriteria Inklusi.....	21
4.3.4	Kriteria Eksklusi.....	21
4.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	21
4.4.1	Klasifikasi Variabel.....	21
4.4.2	Definisi Operasional.....	22
4.5	Bahan Penelitian.....	23
4.6	Instrumen Penelitian.....	24
4.7	Prosedur Penelitian.....	25
4.7.1	Thawing <i>Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly</i> (MSC-WJ).....	25
4.7.2	Sub-Kultur Sel.....	25
4.7.3	Perhitungan sel dengan Haemocytometer.....	26
4.7.4	Pemberian <i>Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly</i> (MSC-WJ).....	26
4.7.5	Isolasi RNA.....	26
4.7.6	Sintesis cDNA.....	27
4.7.7	Amplifikasi Gradient PCR.....	27
4.7.8	PCR.....	27
4.7.9	Elektroforesis dan Visualisasi Produk PCR.....	28
4.7.10	Pengukuran Hasil Elektroforesis.....	28
4.8	Alur Penelitian.....	29
4.8.1	Persiapan Thawing <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	29
4.8.2	Sub-kultur Sel dan Perhitungan Sel.....	30
4.8.3	Isolasi RNA.....	31
4.8.4	Sintesis cDNA.....	32
4.9	Cara Pengolahan dan Analisis Data.....	32
4.10	Etika Penelitian.....	32
BAB 5	HASIL PENELITIAN.....	33
BAB 6	PEMBAHASAN.....	38
6.1	Ekspresi Gen Glut-4 Kelompok Kontrol Positif.....	38
6.2	Ekspresi Gen Glut-4 Kelompok Perlakuan Pemberian MSC-WJ.....	42
6.3	Perbandingan Ekspresi Gen Glut-4 Kelompok Positif dengan Kelompok Perlakuan Pemberian MSC-WJ.....	44
BAB 7	PENUTUP.....	46
7.1	Kesimpulan.....	46
7.2	Saran.....	46
	DAFTAR PUSTAKA.....	47
	LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 : Primer gen Glut-4 dan GAPDH	28
Tabel 4.2 : Komposisi PCR	28
Tabel 5.1 : Uji Kemurnian dan Konsentrasi Larutan DNA pada Sampel Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	33
Tabel 5.2 : Ratio Ekspresi gen Glut-4	35



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Hipotesis dari Patofisiologi <i>Alzheimer Disease</i>	10
Gambar 2.2 : Struktur Tali Pusat	14
Gambar 2.3 : Hubungan Glut-4 dengan <i>Alzheimer Disease</i>	16
Gambar 5.1 : Visualisasi Hasil Amplifikasi Fragmen DNA Glut-4 Menggunakan Gel Agarose	34
Gambar 5.2 : Visualisasi Hasil Amplifikasi Fragmen DNA GAPDH Menggunakan Gel Agarose	35
Gambar 5.3 : Grafik Rata-Rata Ratio Ekspresi gen Glut-4 pada setiap Kelompok Sampel	36
Gambar 6.1 : <i>Neurofibrillary tangles dan Neuritic plaque</i>	39
Gambar 6.2 : Hubungan Timbal Balik antara <i>Insulin Resistance</i> , Plak A β , dan Hiperfosforilasi Tau	40
Gambar 6.3 : Isoform Transport Glukosa Utama di Otak	41
Gambar 7.1 : Spektrofotometer Nanodrop	57
Gambar 7.2 : Running sintesis cDNA dengan <i>Thermal Cycler</i> PCR	57
Gambar 7.3 : Elektroforesis	58
Gambar 7.4 : Gel doc	58



DAFTAR SINGKATAN

A β	: <i>Beta-Amyloid</i>
AChE	: Asetil kolinesterase
AlCl ₃	: Aluminium Klorida
AD	: <i>Alzheimer Disease</i>
ADI	: <i>Alzheimer Disease International</i>
AMPK	: <i>AMP-activated Protein Kinase</i>
APOE-4	: Apolipoprotein E-4
APP	: <i>Amyloid Precursor Protein</i>
BBB	: <i>Blood Brain Barrier</i>
DM	: Diabetes Melitus
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetra acetic acids</i>
GLUT	: Glukosa Transporter
HC	: <i>Human Chorionic</i>
HG- α MEM	: <i>High glucose-alpha modified eangle medium</i>
IL-1 β	: Interleukin 1 beta
IRS	: Insulin Reseptor Substrat
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MSC-EV	: <i>Mesenchymal Stem Cells Ekstraseluler Vesikel</i>
MSC-WJ	: <i>Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly</i>
NFTs	: <i>Neurofibrillary tangles</i>
NO	: Nitrat Oksida
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3K	: Phosphatidyl-Inositol-3-kinase
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
Riskesdas	: Riset Kesehatan Dasar
SGLT1	: Sodium-Glucose Cotransporter-1
TNF- α	: Tumor necrosis factor alpha



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Dokumentasi Penelitian	51
Lampiran 2 : Surat Keterangan Lolos Kaji Etik	53
Lampiran 3 : Surat Izin Melakukan Penelitian	54



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut *World Health Organization* (WHO), demensia adalah sindrom neurodegeneratif yang timbul karena adanya kelainan yang bersifat kronis dan progresif disertai dengan gangguan fungsi luhur multipel seperti memori, kalkulasi, kapasitas belajar, bahasa, dan mengambil keputusan.¹ Gangguan tersebut terjadi karena kerusakan dan kematian dari sel-sel saraf di bagian otak. Berberapa bentuk penyakit neurodegeneratif yang menyebabkan demensia adalah penyakit Alzheimer, demensia vascular, demensia frontotemporal, demensia dengan badan Lewy, dan demensia campuran.² Penyakit Alzheimer merupakan demensia yang paling umum ditemukan dengan prevalensi sekitar 60-80%. Karakteristik yang paling mencolok pada penyakit Alzheimer adalah gangguan memori, disorientasi dan perilaku emosional.³

Kejadian demensia di seluruh dunia menimpa sekitar 50 juta orang dengan penambahan 10 juta kasus baru setiap tahunnya. Pada tahun 2030 jumlah penderita demensia diperkirakan mencapai 82 juta dan 152 juta pada tahun 2050.³ Di Amerika, demensia Alzheimer merupakan penyebab kematian kelima orang yang berusia lebih dari 65 tahun dan sudah menimpa sekitar 5,4 juta orang. Hampir dua pertiga orang Amerika yang terkena AD adalah wanita dan sepertiganya adalah laki-laki. Penyakit ini menjadi masalah global dengan jumlah kasus yang terus meningkat.⁴

Berdasarkan data riset kesehatan dasar (Riskesdas) tahun 2013 melaporkan bahwa kasus gangguan mental emosional yang ditandai dengan gejala depresi serta kecemasan pada usia produktif tercatat sebanyak 14 juta jiwa atau 6% penduduk Indonesia dan meningkat menjadi 7% penduduk di tahun 2018.⁵ Pada tahun 2015 Indonesia masuk dalam sepuluh negara dengan demensia tertinggi di dunia dan Asia Tenggara. Menurut *Alzheimer's Disease International* (ADI) pada tahun 2016 penderita demensia Alzheimer di Indonesia diperkirakan sekitar 1.2 juta orang, dan akan meningkat menjadi 2 juta orang pada tahun 2030 serta 4 juta orang pada tahun

2050.⁶ Biaya untuk perawatan orang demensia di Indoneisa cukup tinggi yaitu mencapai 28,6 milyar per tahun.⁶

Demensia Alzheimer adalah salah satu bentuk demensia yang paling banyak dilaporkan.⁷ Demensia Alzheimer dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok yang menderita pada usia 65 tahun kebawah (onset cepat) dan kelompok yang menderita pada usia 65 tahun keatas (onset lambat).⁸ Faktor genetik juga berperan penting pada perkembangan AD seperti adanya mutasi gen apolipoprotein E menjadi faktor resiko genetik utama dari demensia Alzheimer onset lambat (tipe sporadis).⁹ Sedangkan, demensia Alzheimer onset cepat (tipe familial) berhubungan dengan mutasi dari 3 gen yaitu amyloid precursor protein (APP), presenilin-1 (PSEN1), dan presenilin-2 (PSEN2).⁹ Mutasi ini terjadi karena produksi yang berlebih atau adanya peningkatan agregasi dari *Beta-Amyloid* ($A\beta$).¹⁰

Demensia Alzheimer secara histopatologis ditandai dengan terbentuknya plak amiloid atau *neuritic plaque* ekstraseluler yang mengandung *Beta-Amyloid* ($A\beta$), dan *intracellular neurofibrillary tangles* (NFTs) yang terbentuk dari hiperfosforilasi protein tau.¹¹ *Beta-Amyloid* merupakan salah satu jenis protein dalam tubuh yang dihasilkan dari APP dan merupakan komponen soluble dari plasma dan cairan serebrospinal. Deposit *Beta-Amyloid* yang tidak larut akan membentuk plak amiloid. *Intracellular neurofibrillary tangles* (NFTs) merupakan buntalan filamen protein dalam sitoplasma sel saraf yang mengelilingi sel saraf.¹² Agregasi plak amiloid dan kusut neurofibrillary intraseluler juga akan mendorong aktivasi dari mikroglia, reaktif astrosit, dan respons inflamasi.¹²

Mikroglia dan astrosit adalah dua komponen sel utama sistem saraf pusat yang berperan penting dalam kerusakan sel neuron. Keduanya berperan dalam memelihara homeostasis neurologis melalui pembentukan sawar darah otak.¹³ Mikroglia yang diaktifkan akan mencetuskan sitokin proinflamasi, seperti faktor nekrosis tumor (TNF)- α , interleukin (IL)- 1β , dan oksida nitrat (NO), yang dapat memperburuk kerusakan saraf.¹⁴ Kerusakan sel neuron pada AD berawal dari daerah *hippocampus* sehingga menimbulkan manifestasi klinis penurunan fungsi kognitif berupa gangguan memori. Penelitian yang dilakukan pada hewan coba juga

menunjukkan hal yang sama, sehingga daerah *hippocampus* dapat menjadi parameter terjadinya kerusakan sel saraf akibat penginduksian Alzheimer.

Penelitian yang sudah banyak dilakukan pada hewan coba dapat menggambarkan hewan coba seperti model Alzheimer, penelitian tersebut menginduksi hewan coba menggunakan zat kimia Aluminium Klorida ($AlCl_3$). Aluminium (Al) merupakan zat neurotoksik yang berperan penting dalam perkembangan plak amiloid. Mekanisme $AlCl_3$ diketahui dapat meningkatkan ekspresi gen *Amyloid Precursor Protein* (APP) yang secara signifikan dapat meningkatkan pembentukan $A\beta$ dan gangguan memori pada model tikus sehingga tikus/hewan coba tersebut dapat menggambarkan model seperti Alzheimer.¹⁵

Perkembangan terapi untuk AD cukup berkembang pesat seperti terapi psikososial dan farmakoterapi, tetapi angka mortalitas dan biaya yang dikeluarkan pemerintah masih tinggi. Di Indonesia perkembangan terapi untuk Alzheimer sangat terbatas karena mekanisme penyakit ini yang beragam dan diperberat oleh salah satunya ketidakmampuan sel saraf otak beregenerasi sendiri maka pendekatan terapi hanya bertujuan untuk memperlambat kerusakan otak dan memperbaiki kualitas hidup tanpa memperbaiki kerusakan fungsional yang ditimbulkan oleh penyakit Alzheimer. Terapi berbasis sel memiliki potensi yang besar untuk meregenerasi jaringan saraf yang rusak pada penyakit Alzheimer.¹⁴

Pada beberapa penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer, terapi sel punca/stroma mesenkim (MSC) adalah sel multipoten dengan potensi aplikasi yang menjanjikan dalam pengobatan regenerative, imunomodulasi, dan anti-inflamasi.¹⁶ Sumber sel punca dapat berasal dari darah tepi, tali pusat, plasenta, jaringan adiposa, sumsum tulang belakang, dan lain sebagainya. Salah satu sumber sel punca yang mudah didapatkan adalah sel punca yang berasal dari tali pusat karena tindakan pengambilan yang tidak invasif, merupakan organ fetus yang pada akhirnya dibuang dan tali pusat juga mudah ditemukan, karena angka kelahiran terus meningkat setiap tahunnya. Tali pusat memiliki beberapa struktur umum yaitu selaput membran tali pusat, lapisan *wharton's jelly*, vena umbilikalis, dan arteri umbilikalis. Lapisan

wharton's jelly terbukti menjadi lapisan terbaik dari bagian tali pusat untuk diisolasi menjadi *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ).¹⁶

Mesenchymal Stem Cells Wharton Jelly (MSC-WJ) merupakan sel yang berasal dari jaringan tali pusat bayi dari pasien sehat yang menjalani persalinan baik dalam persalinan normal maupun sesar. *Mesenchymal Stem Cells Wharton Jelly* banyak memiliki manfaat klinis seperti memiliki lebih sedikit kontaminan sel *non-stem cell*, dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan kultur yang minimal untuk menghindari perubahan fenotip, isolasinya mudah dan cepat untuk di standarisasikan. Selain itu, MSC-WJ juga memiliki tingkat proliferasi yang sangat tinggi dan efek imunomodulator terkuat, sehingga menjadikannya salah satu sumber alternatif pengobatan di masa depan yaitu penyakit Alzheimer.¹⁶

Menurut Lee dkk terapi dengan MSC-WJ dianggap sebagai pilihan pengobatan terbaik untuk DA karena telah menunjukkan berbagai efek seperti efek perbaikan terhadap fungsi kognitif, modulasi peradangan saraf, peningkatan neurogenesis endogen, dan juga peningkatan kinerja perilaku AD.¹⁷ Namun ada juga yang menyatakan hasil penelitiannya tidak menunjukkan peningkatan fungsi kognitif serta tidak memiliki manfaat secara klinis pada penyakit Alzheimer seperti menggunakan *Human Chorionic* (HC)-MSC.¹⁸ Penelitian terbaru mengenai MSC-WJ diketahui MSC-WJ dapat memproteksi sel saraf tikus Alzheimer dari stress oksidatif, mengurangi penumpukan *Beta-Amyloid* (A β) dan hiperfosforilasi protein tau serta meningkatkan memori pada tikus.¹⁹

Sel neuron di otak mendapatkan suplai energi dari glukosa. Jika kadar glukosa di otak menurun maka sel saraf otak akan kekurangan energi sehingga lama kelamaan mengalami kerusakan. Glukosa dibawa oleh transporter glukosa ke dalam kapiler dan sel-sel otak. Untuk pengambilan glukosa ke dalam sel otak, transporter glukosa diekspresikan ke dalam neuron, astrosit, sel oligodendroglial, dan sel mikroglial.²⁰ Transporter glukosa di otak terdiri dari Glut1-6 dan Glut-8, dan kotransporter Na⁺ - D -glukosa SGLT1.²¹

Menurut Marko dkk berdasarkan penelitiannya Glut-1 banyak ditemukan di sel endotel mikrovaskuler dan astrosit, Glut-3 adalah transporter glukosa neuronal

kanonik, dan Glut-4 diekspresikan di beberapa daerah otak tetapi pada umumnya ditemukan di dalam korteks dan hipokampus otak.²¹ Glukosa transporter 4 (Glut-4) adalah suatu protein spesifik yang dikenal sebagai transporter glukosa utama dan responsif terhadap insulin di dalam jaringan otot rangka, otak, jantung dan adiposa. Penelitian yang dilakukan oleh McNay dkk melaporkan bahwa pengurangan aktivasi transporter glukosa responsif insulin Glut-4 dapat menyebabkan terjadinya penurunan kognitif pada penderita diabetes melitus tipe 2 dan penyakit Alzheimer.²² Perubahan ekspresi transporter glukosa di otak, dan kekurangan energi terkait transporter neuron yang dapat berkontribusi pada patogenesis AD.²⁰

Penyerapan glukosa yang dimediasi Glut-4 di hipokampus dilaporkan memiliki peran yang sangat penting untuk pembentukan memori.²³ Translokasi Glut-4 ke membran plasma untuk meningkatkan penyerapan glukosa seluler diatur oleh beberapa molekul sinyal pasca-reseptor yang penting untuk mempertahankan memori jangka panjang seperti insulin (PI3K / Akt), *AMP-activated protein kinase* (AMPK), protein kinase C-zeta, protein asetilasi histon, protein kinase A, dan Ca^{2+} /calmodulin kinase II.^{21,22} Penelitian lain juga melaporkan bahwa kadar Glut-4 mengalami penurunan pada AD yang mengakibatkan berkurangnya translokasi transporter glukosa ke dalam membran.²⁴ Hal ini dapat menyebabkan keadaan hipometabolisme glukosa di otak sehingga dapat mendahului timbulnya defisit kognitif berupa penurunan memori.²⁴

Pada AD telah dilaporkan adanya gangguan pensinyalan insulin hipokampus bersama dengan hipometabolisme otak dan akumulasi *Beta-Amyloid* ($A\beta$). Penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa gangguan pensinyalan insulin berupa *Insulin Resistance* (IR) membentuk mekanisme *loop feed-forward* dengan pembentukan oligomer $A\beta$ dan hiperfosforilasi protein tau di area temporo-parietal otak.²⁵ Hal ini menyebabkan gangguan kognitif yang cepat, penurunan metabolisme glukosa lokal, dan gangguan translokasi transporter glukosa yang diatur insulin Glut-4, tetapi tidak berpengaruh pada Glut-1 atau Glut-3.²² Sejauh ini penelitian yang membahas tentang pemberian MSC-WJ terhadap ekspresi gen Glut-4 ini masih sangat sedikit sehingga membutuhkan informasi yang lebih jelas dan lebih banyak lagi. Oleh sebab itu,

peneliti tertarik melakukan penelitian terkait “Pengaruh Pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton’s Jelly* terhadap Ekspresi Gen Glut-4 pada Tikus Alzheimer”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah penulis paparkan diatas, maka didapat beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana ekspresi gen Glut-4 pada tikus yang diinduksi Alzheimer menggunakan $AlCl_3$?
2. Bagaimana pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton’s Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus yang diinduksi Alzheimer ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton’s Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Mengetahui ekspresi gen Glut-4 pada kelompok hewan coba yang diinduksi $AlCl_3$
2. Mengetahui ekspresi gen Glut-4 pada kelompok hewan coba Alzheimer yang sudah diberikan *Mesenchymal Stem Cells Wharton’s Jelly*
3. Membandingkan ekspresi gen Glut-4 pada kelompok hewan coba yang diinduksi $AlCl_3$ dengan kelompok hewan coba Alzheimer yang sudah diberikan *Mesenchymal Stem Cells Wharton’s Jelly*

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Bagi peneliti, penelitian ini sebagai wujud penerapan disiplin ilmu yang telah dipelajari sehingga dapat mengembangkan wawasan keilmuan peneliti. Selain itu,

penelitian ini juga dapat menjadi sarana bagi peneliti untuk melatih pola berpikir kritis terhadap pemahaman akan ilmu pengetahuan.

1.4.2 Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan

Bagi ilmu pengetahuan, hasil penelitian ini peneliti harapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer.

1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

Bagi Institusi Pendidikan, hasil penelitian ini dapat menambah pembendaharaan referensi atau sumber pembelajaran untuk pendidikan.

1.4.4 Manfaat Bagi Peneliti Lain

Bagi peneliti lain, dapat menggunakan hasil penelitian ini sebagai bahan penambah gagasan untuk penelitian sejenis yang berkaitan dengan pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer atau penelitian lanjutan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Alzheimer Disease (AD)*

2.1.1 **Definisi dan klasifikasi *Alzheimer Disease (AD)***

Penyakit Alzheimer (AD) adalah penyebab paling umum dari gejala demensia. Pada AD terjadi kematian sel-sel saraf di otak sehingga menyebabkan sinyal-sinyal saraf di otak sulit untuk di transmisikan secara baik.²⁶ Ciri AD secara patologis ditandai oleh adanya plak amiloid dan *neurofibrillary tangles* (NFTs) dalam jumlah dan distribusi yang cukup.¹¹ Penyakit Alzheimer dapat diklasifikasikan sebagai onset cepat (AD familial) yaitu individu yang berusia kurang dari 65 tahun dan onset lambat (AD sporadis) yaitu individu yang berusia lebih dari 65 tahun.⁸ Alzheimer tipe familial sering berkaitan dengan adanya mutasi pada amyloid precursor protein (APP) atau gen presenilin (PSEN1 dan PSEN2), sedangkan AD sporadis berhubungan dengan mutasi pada disfungsi IR apolipoprotein E (APOE)-4.⁹ Selain itu, jenis kelamin perempuan adalah salah satu faktor risiko utama untuk terjadinya penyakit Alzheimer (AD) onset lambat.²⁷

2.1.2 **Epidemiologi *Alzheimer Disease (AD)***

Kasus demensia di seluruh dunia menimpa sekitar 50 juta orang dengan 10 juta kasus baru setiap tahunnya dan sebagian besar kasus ini terkait dengan AD.^{3,28} Pada tahun 2030 jumlah penderita demensia diperkirakan mencapai 82 juta dan 152 juta pada tahun 2050.³ Data sensus telah memperkirakan bahwa pada tahun 2050 akan ada sekitar 13,8 juta orang menderita AD.²⁸ Di Amerika, demensia Alzheimer merupakan penyebab kematian kelima orang yang berusia lebih dari 65 tahun dan sudah tercatat sekitar 5,4 juta orang mengalami kematian akibat AD.⁴ Sebuah studi epidemiologis telah melaporkan bahwa dua per tiga orang yang terkena AD adalah wanita dan sepertiganya adalah laki-laki.²⁷

Penyakit ini menjadi masalah global dengan jumlah kasus yang terus meningkat. Berdasarkan data riset kesehatan dasar (Riskesdas) tahun 2013 melaporkan bahwa kasus gangguan mental emosional yang ditandai dengan gejala

depresi serta kecemasan pada usia produktif tercatat sebanyak 14 juta jiwa atau 6% penduduk Indonesia dan meningkat menjadi 7% penduduk di tahun 2018.⁵ Pada tahun 2015 Indonesia masuk dalam sepuluh negara dengan demensia tertinggi di dunia dan Asia Tenggara. Menurut *Alzheimer's Disease International* (ADI) pada tahun 2016 penderita demensia di Indonesia diperkirakan sekitar 1.2 juta orang, dan akan meningkat menjadi 2 juta orang pada tahun 2030 serta 4 juta orang pada tahun 2050.⁶ Di Indonesia biaya yang dihabiskan untuk perawatan orang demensia mencapai 28,6 milyar per tahun.⁶

2.1.3 Etiologi *Alzheimer Disease* (AD)

Etiologi penyakit Alzheimer masih belum jelas, tetapi kemungkinan merupakan hasil dari faktor genetik, usia, dan lingkungan. Faktor genetik tersebut seperti adanya mutasi gen presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), protein prekursor beta amiloid (APP), dan gen apolipoprotein E (APOE)-4.²⁹ Meskipun usia tua merupakan faktor risiko utama untuk AD, tetapi masih banyak faktor risiko lain yang dapat mempengaruhi perkembangan AD.²⁸ Diantaranya seperti hipertensi, hiperkolesterolemia, stroke, merokok, penggunaan alkohol berlebihan, dan pola makan yang buruk, depresi serta faktor psikososial lainnya.^{7,30}

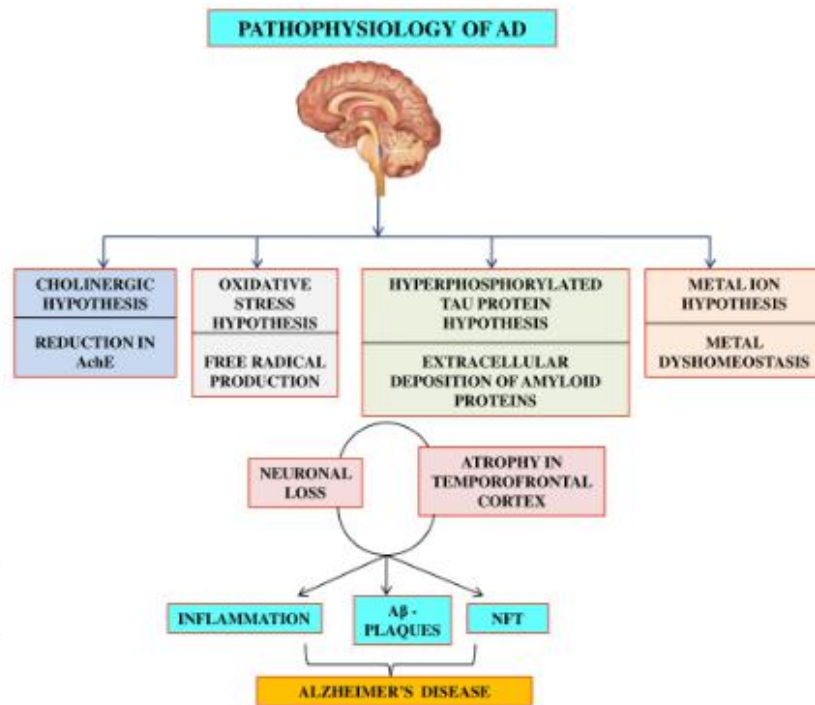
Selain hal di atas, diabetes mellitus juga terlibat sebagai faktor risiko untuk penyakit Alzheimer.⁹ Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa terdapat hubungan antara gangguan neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer dan gangguan sinyal insulin di SSP pada diabetes mellitus tipe 2.³¹ Penyakit Alzheimer berkaitan dengan gangguan fungsi mitokondria, homeostasis kalsium, keseimbangan hormon, peningkatan stres oksidatif dan inflamasi pada saraf. Selanjutnya pada DM tipe 2 ditandai dengan adanya resistensi insulin seluler dan peradangan kronis yang mempercepat penuaan.³¹

2.1.4 Manifestasi klinis *Alzheimer Disease* (AD)

Interpretasi klinis penyakit Alzheimer biasanya adalah demensia. Demensia adalah sindrom neurodegeneratif yang timbul karena adanya kelainan yang bersifat kronis dan progresif disertai dengan gangguan fungsi luhur multipel seperti daya

ingat, daya orientasi, kalkulasi, kapasitas belajar, bahasa, dan mengambil keputusan.^{1,26} Gejala demensia tersebut dapat sangat memengaruhi kegiatan sehari-hari seperti mandi, berpakaian, makan, merawat kebersihan diri, perilaku sosial, buang air besar, dan buang air kecil. Gejala yang ada pada AD akan muncul secara bertahap. Awalnya penyakit Alzheimer dapat bermanifestasi seperti gangguan fungsi kognitif dan perubahan *mood* serta perilaku yang onsetnya tidak tampak. Kemudian gejala tersebut berkembang menjadi disorientasi, hilang ingatan, dan afasia yang menjadi penanda dari disfungsi otak korteks berat. Sekitar kurang lebih 5 sampai 10 tahun mendatang, penderita AD bisa mengalami disabilitas, bisu, dan imobilitas.³²

2.1.5 Patofisiologi *Alzheimer Disease* (AD)



Gambar 2.1 : Hipotesis dari Patofisiologi AD.³³

Patofisiologi AD dikaitkan dengan berbagai faktor, termasuk deposisi ekstraseluler plak amiloid, akumulasi neurofibrillary intraseluler, disregulasi metabolisme glukosa, stress oksidatif, dan radang inflamasi.²⁶ Secara morfologis, demensia Alzheimer ditandai oleh atrofi otak dan ventrikel otak besar serta gliosis

yang progresif.³² Secara histopatologis terdapat 2 gambaran yang khas pada AD yaitu endapan ekstraseluler yang disebut plak amiloid atau *neuritic plaque* ekstraseluler yang mengandung *Beta-Amyloid* ($A\beta$), dan *intracellular neurofibrillary tangles* (NFTs) yang terbentuk dari hiperfosforilasi protein tau.¹¹ *Beta-Amyloid* merupakan salah satu jenis protein dalam tubuh yang dihasilkan dari APP dan merupakan komponen soluble dari plasma dan cairan serebrospinal.¹⁰

Kaskade amiloid terdapat tahapan abnormal dari agregasi oligomer $A\beta$ terlarut menjadi plak yang tidak larut. Oligomer $A\beta$ yang terbentuk pada kaskade amiloid bersifat neurotoksik sehingga dapat menyebabkan disfungsi sinap dan kerusakan sel saraf yang berimplikasi terhadap penurunan kognitif berupa gangguan memori. Akumulasi *beta-Amyloid* terjadi karena ketidakseimbangan dalam homeostatis $A\beta$ -peptida. $A\beta$ -peptida merupakan komponen protein utama dari plak $A\beta$ yang berasal dari aksi enzim sekretase (gamma dan beta-sekretase). Enzim sekretase (gamma dan beta-sekretase) adalah enzim yang dapat mengkatalisis APP menjadi struktur *beta-Amyloid*. Akumulasi *beta-Amyloid* akan membentuk plak amiloid jika mengendap akan menyebabkan proses imun lokal seperti aktivasi dari mikroglial, peningkatan sitokin, dan respon inflamasi dari banyak protein yang dapat mendegradasi sel saraf secara kronis.³³

Intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) merupakan benang neurofibril yang kusut di dalam neuron, dibentuk oleh buntalan filament yang mengalami polimerasi berpasangan, bentuk hyperphosphorylasi dari protein terkait mikrotubulus. Hal ini dapat mengakibatkan disfungsi protein tau sehingga terjadi kerusakan transport aksonal, kerusakan sinaptik, dan neurodegenerasi. Selain itu, ada bukti bahwa tau toksik dapat meningkatkan produksi $A\beta$ melalui mekanisme *loop* umpan balik. Selain karena adanya plak $A\beta$ dan NFTs ada kemungkinan lain yang menjadi dasar terjadinya AD seperti defisit neurotransmitter asetilkolin karena terjadi hidrolisis yang cepat oleh asetil kolinesterase (AChE).³³

Asetilkolin merupakan neurotransmitter kolinergik yang berperan dalam konduksi impuls listrik dari satu sel saraf ke sel saraf lainnya. Pada AD terjadi penurunan kadar Asetilkolin karena terjadi hidrolisis yang cepat oleh

asetilkolinesterase (AChE). Asetilkolinesterase menghasilkan fungsi non-kolinergik seperti deposisi dan pembentukan A β dan neurofibrillary tangles di otak pada pasien dengan penyakit Alzheimer. Selain itu, disfungsi mitokondria dan stres oksidatif dapat berperan dalam patogenesis penyakit Alzheimer. Sel secara rutin menghasilkan radikal bebas dan kelompok oksigen reaktif (ROS) yang merupakan bagian dari proses metabolisme. Oksigen reaktif yang dihasilkan dari kerusakan protein mitokondria, DNA, dan lipid dalam komponen membran yang menghasilkan disfungsi mitokondria. Tekanan stres oksidatif pada mitokondria dapat menyebabkan hiperfosforilasi tau, melalui penurunan aktivitas superoksida dismutase yang terkait dengan A β dan aktivasi sintase kinase.³³

Perubahan kondisi vaskular seperti penurunan aliran darah otak juga menjadi salah satu alasan terjadinya AD. Hipotesis ini menunjukkan bahwa proses neurodegeneratif dimulai oleh otak yang mengalami hipoperfusi kronis yang disebabkan oleh penuaan, stres oksidatif, dan kondisi vaskular seperti hipertensi, aterosklerosis, dan hiperkolesterolemia. Kerusakan sawar darah-otak juga mengakibatkan akumulasi neurotoksik protein serum di otak, peradangan, dan disfungsi vaskular serta sinaptik berperan juga dalam defek pada metabolisme serta pembersihan dari plak A β dan Tau sehingga akhirnya dapat mengakibatkan kerusakan sel saraf.³³

2.1.6 Perkembangan Terapi *Alzheimer Disease* (AD)

Terapi Alzheimer di Indonesia diberikan berdasarkan derajat penyakitnya secara medikamentosa. Obat golongan inhibitor kolinesterase seperti donepezil, rivastigmin, dan galantamin telah menunjukkan manfaat pada demensia AD ringan, sedang, dan berat. Obat golongan ini berfungsi menunda penurunan fungsi kognisi pada pasien Alzheimer. Sedangkan memantine dan donepezil lebih direkomendasikan pada demensia AD sedang dan berat.³⁴ Memantine bersifat neuroprotektif dengan mencegah hilangnya neuron dan memulihkan fungsi neuron yang rusak.

Obat-obatan pada penyakit Alzheimer diikuti oleh pemberian obat simtomatik serta latihan stimulasi saraf sesuai gejala-gejala yang menyertai penyakit

Alzheimer. Namun saat ini strategi pengobatan sebagian besar tidak efektif sehingga menyebabkan penurunan kognitif yang ireversibel dan progresif pada pasien AD.³⁵ Oleh karena itu, pengobatan presisi berbasis sel punca (*stem cells*) menjadi fokus penelitian dan salah satu peluang pengobatan yang menjanjikan pada beberapa penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer.

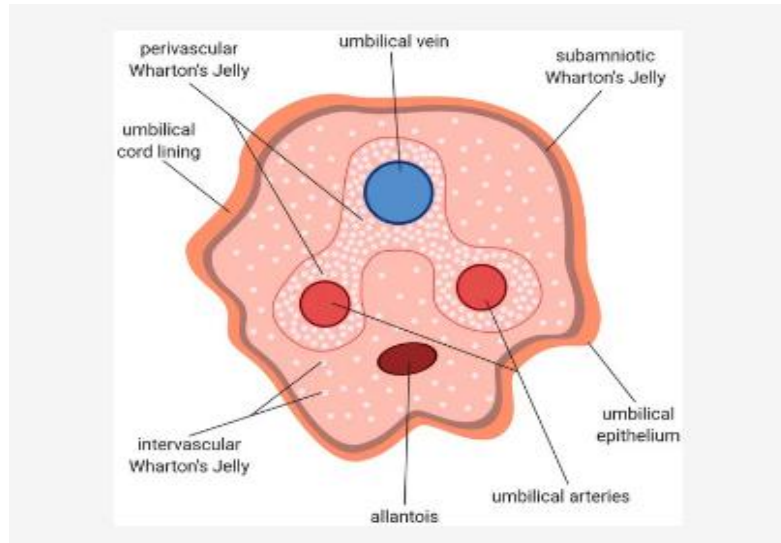
2.2 *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*

Terapi dengan menggunakan sel punca (*stem cells*) telah menjadi pandangan baru dalam pengobatan berbagai penyakit. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pengobatan menggunakan *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) efektif pada beberapa penyakit neurodegeneratif.³⁶ Bahkan uji klinis pun telah dilakukan di berbagai negara. Sel punca mesenkim adalah sel stroma multipoten yang mudah ditemukan karena dapat diisolasi dari berbagai organ dan jaringan, seperti sumsums tulang, tali pusat, jaringan adiposa, darah tepi, dan cairan ketuban. Penelitian menunjukkan bahwa MSC sangat proliferasif dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel seperti neuron dan sel atrosit.³⁷ Berdasarkan penelitian Vasic dkk melaporkan bahwa transplantasi MSC mengurangi deposit A β dan tau-fosforilasi, meningkatkan neurogenesis dan memberikan dukungan dengan faktor yang disekresikan dan meningkatkan defisit pembelajaran dan memori. Dalam hal ini, MSC mampu menghambat proses kerusakan neurologis pada hewan model tikus dengan penyakit neurodegeneratif.³⁷

2.3 *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly (MSC-WJ)*

Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly (MSC-WJ) merupakan sel yang berasal dari jaringan tali pusat bayi dari pasien sehat yang menjalani persalinan baik persalinan normal maupun sesar. Tali pusat memiliki beberapa struktur umum yaitu selaput membran tali pusat, lapisan *wharton's jelly*, vena umbilikalis, dan arteri umbilikalis. Lapisan *wharton's jelly* terbukti menjadi lapisan terbaik dari bagian tali pusat untuk diisolasi menjadi *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ). Transplantasi MSC-WJ tidak bersifat

teratogenik dan karsinogenik serta isolasinya pun mudah dilakukan.



Gambar 2.2 : Struktur Tali Pusat.³⁸

Tali pusat bayi dari ibu yang melahirkan sebelum dibawa ke laboratorium dimasukkan ke dalam botol steril dan diberikan antibiotik agar tidak terkontaminasi. Tali pusat dicuci beberapa kali dengan *phosphate-buffered saline* (PBS) yang mengandung penisilin/streptomisin untuk menghilangkan darah tali pusat dan kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil ukuran sekitar 2 cm. Bagian tersebut dimasukkan pada wadah berisi *high glucose-alpha modified eagle medium* (HG- α MEM) untuk dikultur. Pergantian medium selanjutnya dilakukan dua kali seminggu. Apabila sel sudah mencapai konfluensi 90% di pergantian medium kedua, sel dikumpulkan dengan 0,25 % *trypsin-ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) dan dibilas dua kali dengan PBS.³⁹

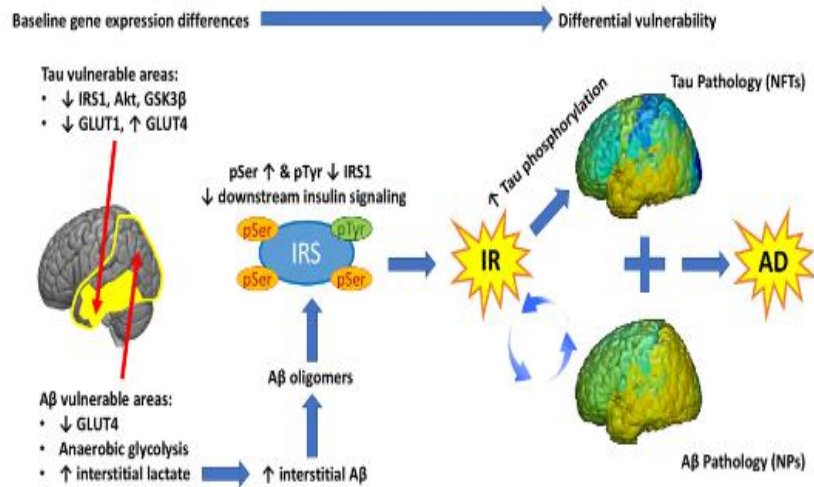
Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly banyak sekali memiliki manfaat seperti tingkat proliferasi yang sangat tinggi dan efek imunomodulator terkuat, sehingga membuatnya ideal untuk digunakan dalam terapi sel dan sebagai salah satu sumber alternatif pengobatan di masa depan yaitu penyakit Alzheimer.¹⁶ Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa MSC-WJ adalah penghambat terkuat proliferasi sel T dengan efek imunogenik yang lebih

sedikit dibandingkan jenis MSC lainnya.⁴⁰ Namun kekurangan dari MSC-WJ adalah potensi dalam osteogenesis masih rendah.

2.4 Glut-4

Kebutuhan energi neuron di otak bersumber dari suplai glukosa. Jika kadar glukosa di otak menurun maka sel saraf otak akan kekurangan energi sehingga lama kelamaan mengalami kerusakan. Glukosa dibawa oleh transporter glukosa ke dalam kapiler dan sel-sel otak. Transporter glukosa harus melewati *blood-brain barrier* (BBB) agar dapat mengekspresikan D- glukosa ke dalam neuron, astrosit, sel oligodendroglial, dan sel mikroglial.²⁰ Transporter glukosa di otak terdiri dari Glut1-6 dan Glut-8, dan kotransporter Na^+ -D-glukosa SGLT1.

Menurut Marko dkk berdasarkan penelitiannya Glut-1 banyak ditemukan di sel endotel mikrovaskuler dan astrosit, Glut-3 adalah transporter glukosa neuronal kanonik, dan Glut-4 diekspresikan di beberapa daerah otak tetapi pada umumnya ditemukan di dalam korteks dan hipokampus otak.²¹ Glut-4 di hipokampus berperan sebagai saluran untuk menyuplai glukosa di neuron dan mencegah neuroglipopenia. Glukosa transporter-4 (Glut-4) adalah suatu protein spesifik yang dikenal sebagai transporter glukosa utama dan responsif terhadap insulin di dalam jaringan otot rangka, otak, jantung, dan adiposa. Penelitian yang dilakukan oleh McNay dkk melaporkan bahwa pengurangan aktivasi transporter glukosa responsif insulin Glut-4 dapat menyebabkan terjadinya penurunan kognitif pada penderita diabetes melitus tipe 2 dan penyakit Alzheimer.²² Penelitian lain juga mendukung pernyataan tersebut bahwa resistensi resisten insulin tidak hanya terjadi di perifer, tetapi juga di otak yang dikaitkan dengan penyakit Alzheimer.⁴¹



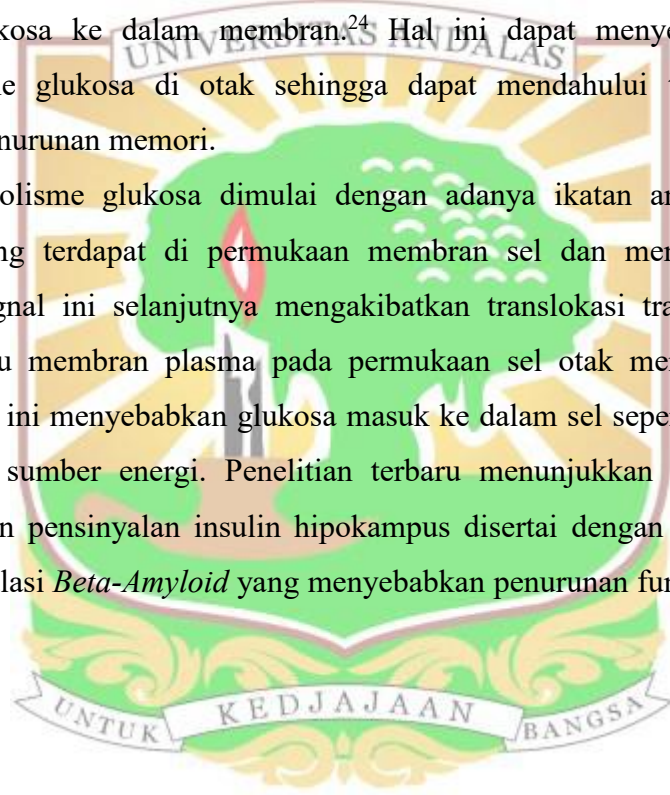
Gambar 2.3 : Hubungan Glut-4 dengan *Alzheimer Disease*.²⁵

Area di temporo-parietal otak memerlukan metabolisme glukosa berupa glikolisis. Glukosa yang masuk ke dalam sel-sel otak dibawa oleh transporter glukosa yang salah satunya adalah Glut-4. Namun, saat Glut-4 mengalami penurunan maka glikolisis terjadi secara anaerob sehingga menghasilkan laktat. Peningkatan laktat di interstisial berhubungan dengan peningkatan Aβ interstisial, kemudian akan membentuk ikatan oligomer Aβ. Oligomer Aβ dapat mengakibatkan fosforilasi IRS-1 yang menghasilkan fosforilasi residu berupa protein Ser.

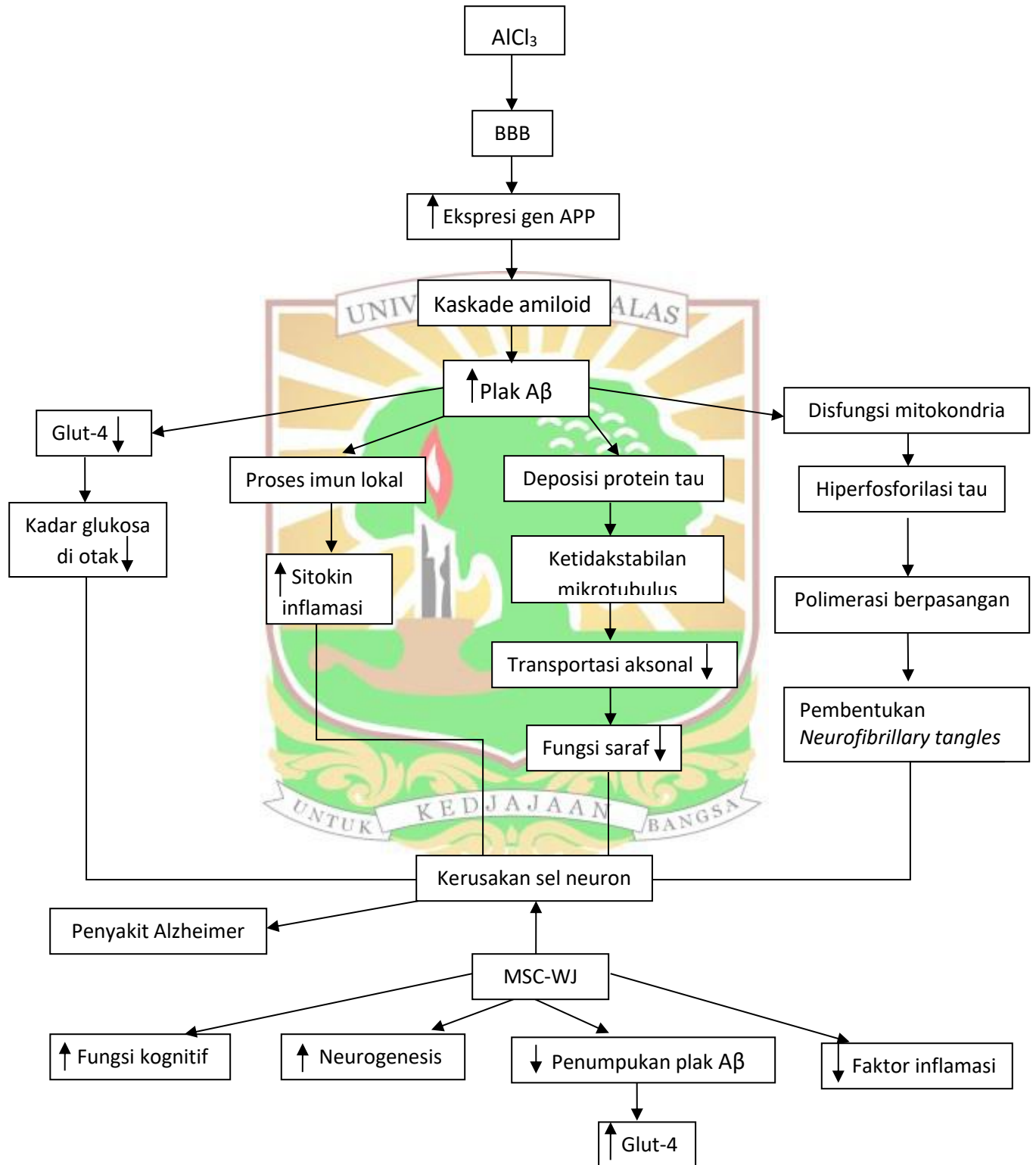
Dengan adanya fosforilasi pada reseptor insulin di otak maka akan menghambat pensinyalan insulin ke otak dan terjadilah resistensi insulin di otak. Sebuah *loop feed-forward* antara IR (*Insulin Resistance*) dan patologi Aβ akan menghasilkan deposisi plak Aβ yang progresif pada neuron atau dikenal juga dengan *neuretic plaq*. Resistensi insulin kronis juga dapat mengakibatkan hiperfosforilasi protein tau hal ini dibuktikan dengan terbentuknya hiperfosforilasi protein tau di daerah otak dan efek ekspresi protein pensinyalan insulin yang rendah seperti ekspresi IRS-1, Akt, dll. Apabila terjadi hiperfosforilasi dari protein tau maka akan berkembang terbentuknya *neurofibrillary tangles*. Dapat disimpulkan bahwa ketiga kondisi patologis (IR, Aβ, Tau) saling berhubungan menghasilkan penyakit Alzheimer.²⁵

Penyerapan glukosa yang dimediasi Glut-4 hipokampus dilaporkan memiliki peran yang sangat penting untuk pembentukan memori.²³ Translokasi Glut-4 ke membran plasma untuk meningkatkan penyerapan glukosa seluler diatur oleh beberapa molekul sinyal pasca-reseptor yang penting untuk mempertahankan memori jangka panjang seperti insulin (PI3K / Akt), *AMP-activated protein kinase* (AMPK), protein kinase C-zeta, protein asetilasi histon, protein kinase A, dan Ca^{2+} /calmodulin kinase II.^{21,22} Penelitian lain juga melaporkan bahwa kadar Glut-4 mengalami penurunan pada AD yang mengakibatkan berkurangnya translokasi transporter glukosa ke dalam membran.²⁴ Hal ini dapat menyebabkan keadaan hipometabolisme glukosa di otak sehingga dapat mendahului timbulnya defisit kognitif atau penurunan memori.

Metabolisme glukosa dimulai dengan adanya ikatan antara insulin dan reseptornya yang terdapat di permukaan membran sel dan menghasilkan signal intraseluler. Signal ini selanjutnya mengakibatkan translokasi transporter glukosa (Glut-4) menuju membran plasma pada permukaan sel otak membentuk saluran. Adanya saluran ini menyebabkan glukosa masuk ke dalam sel seperti neuron dan sel atrosit sebagai sumber energi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa pada AD terjadi gangguan pensinyalan insulin hipokampus disertai dengan hipometabolisme otak dan akumulasi *Beta-Amyloid* yang menyebabkan penurunan fungsi kognitif yang cepat.



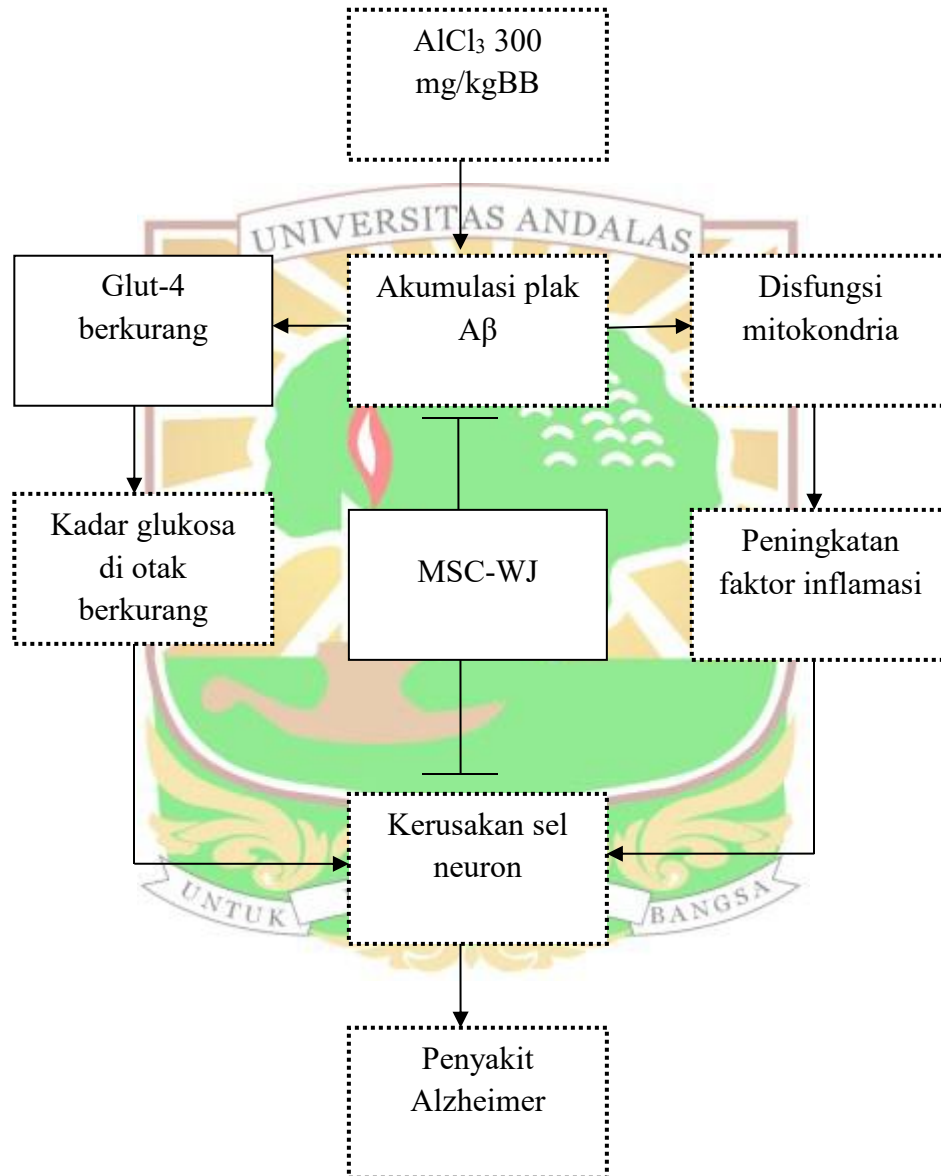
2.5 Kerangka Teori

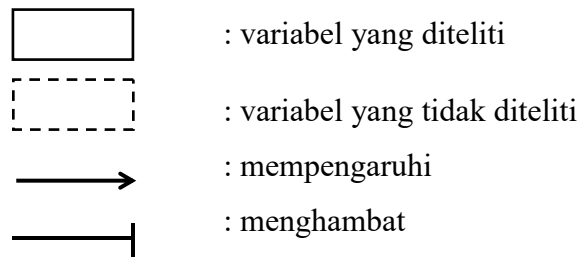


BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual





3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton`s Jelly* dapat meningkatkan ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang dilaksanakan pada bulan September 2021 sampai Januari 2022.

4.3 Populasi dan Sampel,

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan adalah seluruh sampel yang disimpan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dan digunakan untuk penelitian skripsi.

4.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah bahan biologis tersimpan berupa RNA dari jaringan otak hewan coba Alzheimer yang diterapi dengan *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* dengan dosis 1×10^6 /tikus dalam 300 μl ^{3,42}.

4.3.3 Kriteria Inklusi

1. RNA dalam konsentrasi 100 μl / 20 μl
2. RNA dengan purifikasi A260/280 < 2

4.3.4 Kriteria Eksklusi

1. RNA yang terkontaminasi

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas : hewan coba Alzheimer yang diberi *Mesenchymal Stem*

Cells Wharthon's Jelly

2. Variabel Terikat : ekspresi gen Glut-4

4.4.2 Definisi Operasional

4.4.2.1 Alzheimer-like animal model

Definisi : Hewan coba yang diinduksi menjadi Alzheimer melalui pemberian Aluminium Klorida ($AlCl_3$) 300 mg/kgBB. Aluminium adalah zat neurotoksik yang bisa meningkatkan ekspresi gen APP sehingga mengakibatkan akumulasi plak $A\beta$ pada otak hewan coba dan pada akhirnya menimbulkan kerusakan saraf.^{15,43}

Alat ukur : Histopatologi

Cara ukur : *congo red staining*

Hasil ukur : persentase

Skala ukur : ratio

4.4.2.2 Mesenchymal Stem Cells Wharthon's Jelly

Definisi : Sel multipoten yang berasal dari lapisan wharton pada tali pusat neonatus yang memiliki tingkat proliferasi yang sangat tinggi dan efek imunomodulator terkuat. Dosis yang digunakan : 1×10^6 / tikus dalam 300 μl^3 yang telah melewati tahap *pasage 3*.⁴²

Alat ukur : mikroskop

Cara ukur : *haemocytometer*

Hasil ukur : densitas (jumlah sel/ml)

Skala ukur : ratio

4.4.2.3 Ekspresi gen Glut-4

Definisi : Suatu protein spesifik yang dikenal sebagai transporter glukosa utama dan responsif terhadap insulin di dalam jaringan otot rangka, otak, jantung dan adiposa. Pengurangan kadar Glut-4 dapat menyebabkan terjadinya gangguan memori pada penyakit Alzheimer.²² Ekspresi gen Glut-4 dari tikus yang diinduksi Alzheimer dinilai melalui cDNA.

Alat ukur : *Thermal Cyclers PCR*

Cara ukur : PCR konvensional

Hasil ukur : nilai ekspresi

Skala ukur : ratio

4.5 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

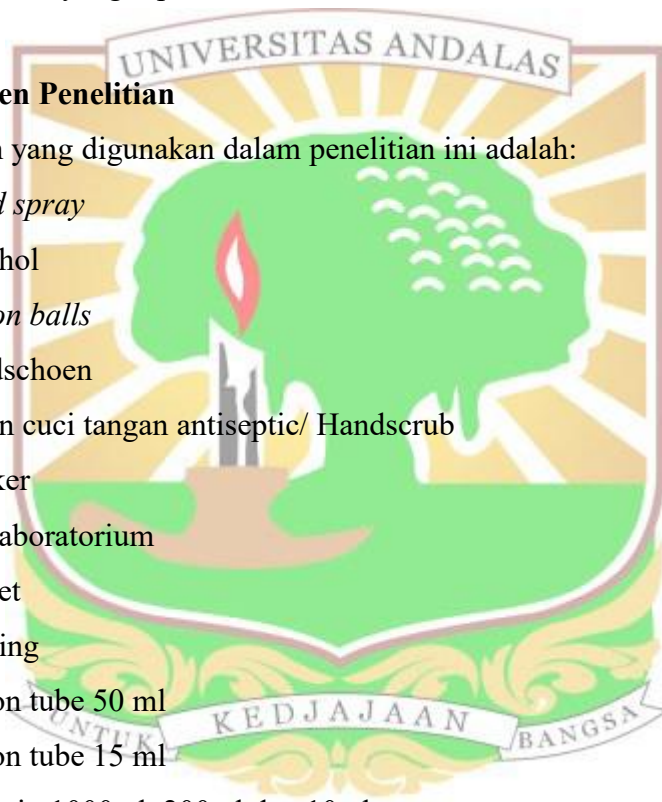
1. alpha Modified Eagle Medium (α -MEM) high glucose
2. Penisilin/streptomisin
3. Amphotericyn B
4. Fetal Bovine Serum (FBS)
5. Trypsin-EDTA 0,25%,
6. Trypan blue
7. Phospat Buffered Saline(PBS)
8. Aquades steril
9. Natrium Bikarbonat (NaHCO_3)
10. Parafilm
11. Sampel RNA tikus
12. Sampel RNA tamplate
13. Trizol

14. Isopropanol
15. Kloroform
16. Nanodrop
17. RNase free water
18. Es batu
19. Antibody marker MSC-WJ
20. Primer gen GAPDH dan gen Glut-4
21. Stem cell yang diperoleh dari IMERI FK UI

4.6 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. *Hand spray*
2. Alkohol
3. *Cotton balls*
4. Handschoen
5. Sabun cuci tangan antiseptic/ Handscrub
6. Masker
7. Jas laboratorium
8. Pinset
9. Gunting
10. Falcon tube 50 ml
11. Falcon tube 15 ml
12. Pipet tip 1000 ul, 200 ul dan 10 ul
13. Syringe filtered 0, 22 um
14. Jarum suntik 5 ml
15. Centrifuge tube 1,5 ml dan 0,5 ml
16. Microcentrifuge tube 0,5 ml dan 1 ml
17. Tissue culture flask 25 cm²
18. Six well plate , 24 well-plate
19. *Microtube*



20. *Vortex*
21. Inkubator CO₂ (Thermo Fisher Scientific)
22. Sentrifus (Thermo Fisher Scientific)
23. Timbangan analitik
24. Waterbath
25. Laminar Air Flow (LAF)
26. Mikroskop inverted
27. Nanodrop
28. PCR Konvensional

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Thawing *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ)

Medium komplet yang terdiri dari alpha Modified Eagle Medium (α -MEM) high glucose, penisilin/streptomisin dan Fetal Bovine Serum (FBS) disiapkan dan dimasukkan ke dalam falcon tube 15 ml dengan perbandingan 1: 9. Kemudian, sel dari liquid tank diambil dan dimasukkan ke dalam waterbath selama 10 detik. Selanjutnya, sel yang ada di dalam cryotube tersebut dipindahkan ke dalam falcon tube 15 ml yang telah berisi medium komplet. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah sentrifugasi selesai, supernatan dibuang dan pelet yang tersisa ditambahkan medium komplet sebanyak 4 ml (tergantung ukuran flask yang akan digunakan). Kemudian, dihomogenkan dan dipindahkan ke dalam flask 25 cm² dan cek di bawah mikroskop inverted. Sel diinkubasi di dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C dan tekanan udara 5% selama 3 hari.⁴⁴

4.7.2 Sub-Kultur Sel

Media kultur yang ada di dalam flask dibuang dan bilas dengan PBS. Lalu PBS dibuang dan ditambahkan 1 ml larutan trypsin-EDTA 0.25% ke dalam flask, aduk perlahan. Inkubasi selama 10-15 menit pada inkubator CO₂ dengan suhu 37°C dan tekanan udara 5%. Kemudian, sel-sel diamati bawah mikroskop inverted sampai lapisan sel terlepas dari dasar flask. Sel yang sulit dilepaskan dapat diinkubasi

kembali pada inkubator CO₂ suhu 37°C selama 5 menit. Tahap selanjutnya adalah menambahkan 4 ml medium komplit dan aspirasi sel dengan pipet transfer dan lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Pergantian medium dilakukan 3- 4 hari sekali hingga sel siap untuk digunakan dalam penelitian ini yaitu pasasi ke 3.⁴⁴

4.7.3 Perhitungan sel dengan Haemocytometer

Suspensi sel dipindahkan ke tabung Eppendorf dengan menggunakan pipet mikro sebanyak 10 µl dan ditambahkan 10 µl larutan trypan blue. Ambil 10 µl sel yang telah diwarnai *trypan blue* dan masukkan ke dalam chamber *haemocytometer* yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70% lalu tutup dengan *cover slip*. Suspensi sel dibiarkan memenuhi daerah perhitungan sel dengan mekanisme kapilaritas, kemudian sel dihitung menggunakan mikroskop dengan perbesaran objektif 10x. Chamber *haemocytometer* memiliki 4 buah kotak besar untuk menghitung jumlah sel. Jarak antara cover slip dengan chamber yaitu 0,1 mm. Hitung jumlah sel pada tiap kotak besar dan rata-ratakan. Kemudian kalikan dengan 10⁴ untuk mendapatkan jumlah sel tiap mililiter pada sampel di chamber *haemocytometer*.⁴⁴ Sel dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Jumlah sel/ml} = (\text{jumlah sel di semua kotak besar}/4) \times 10^4$$

4.7.4 Pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ)

Semua kelompok hewan coba dilakukan anestesi menggunakan ketamin 50 mg/kg dan *xylazin* 15 mg/kg BB secara inhalasi. Kemudian tikus diinjeksikan dengan MSC-WJ sebanyak 1 x 10⁶ sel/ tikus dalam 300 ul medium komplit secara intraperitoneal. Satu bulan setelah injeksi, jaringan otak tikus dipanen dan dimasukkan kedalam botol *film* yang telah disiapkan.⁴⁴

4.7.5 Isolasi RNA

Total RNA dari jaringan semua kelompok eksperimen diisolasi menggunakan reagen trizol. Jaringan dihomogenisasi menggunakan homogenizer dengan 1 mL reagen trizol per 50- 100 mg jaringan ke sampel. Kemudian, ditambahkan 200 ul kloroform, tube dibolak balik dan inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar.

Selanjutnya, sentrifus pada kecepatan 12.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Lapisan atas (*aqueous phase*) dipindahkan ke microtube yang baru dan steril. Tambahkan 2x isopropanol dan inkubasi kembali selama 10 menit pada suhu kamar. Sentrifus kembali selama 10 menit dengan kecepatan 12.000×g pada suhu 4°C. Kemudian, supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan etanol 70% sebanyak 350 ul. Selanjutnya, tube dibolak balik dan vortex secara perlahan. Sentrifus kembali dengan kecepatan 7.500 g pada suhu 4°C selama 5 menit. Buang supernatant kemudian *vacuum centrifuge* selama 10 menit. Setelah vakum selesai, suspensikan pellet dalam *RNAse Free Water* 25-40 ul (tergantung banyak pelet). Kemudian, RNA dikuantifikasi dan disamakan pada konsentrasi 1000ng menggunakan nanodrop.⁴⁴

4.7.6 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan kit sintesis. Komposisi sintesis cDNA total adalah 5x TransAmp 4 µl , 1 µl RTase, RNA template (100x) 10 µl, 5 *Nuclease-Free Water* dengan volume reaksi 20 µl. Sintesis cDNA total dilakukan pada suhu 52°C selama 50 menit dengan protokol kerja sesuai dengan manual kit.⁴⁴

4.7.7 Amplifikasi Gradient PCR

Semua proses PCR dilakukan dalam rentang amplifikasi selama 40 siklus amplifikasi yang terdiri dari langkah predenaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 56°C selama 15 detik, kemudian *extension* pada suhu 72 °C selama 5 menit.⁴⁴

4.7.8 PCR

Setelah sintesis cDNA selesai, selanjutnya yaitu PCR menggunakan primer gen yang akan digunakan sesuai dengan desain dan optimasi suhu yang telah dilakukan.

Tabel 4.1 Primer gen Glut-4 dan GAPDH

Gen	Forward primer	Reverse primer
Glut-4	CAGCTCTCAGGCATCAAT	TCTACTAAGAGCACCGAG
GAPDH	CATCATCCCTGCCTCTACTG	CCAAATTCGTTGTCATACCAGG

Tabel 4.2 Komposisi PCR

Komposisi	Jumlah Reaksi
MyTaq	12,5
<i>Nucleus - free water</i> (NFW)	9,5
Forward	1
Reverse	1
cDNA	1

4.7.9 Elektroforesis dan Visualisasi Produk PCR

Produk PCR divisualisasikan dengan teknik elektroforesis gel agarose 1.5%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada tegangan konstan 100 volt atau sampai pewarna bromtimol blue mencapai bagian bawah gel. Setelah elektroforesis selesai, gel diambil untuk dilakukan pemotretan menggunakan UV.⁴⁴

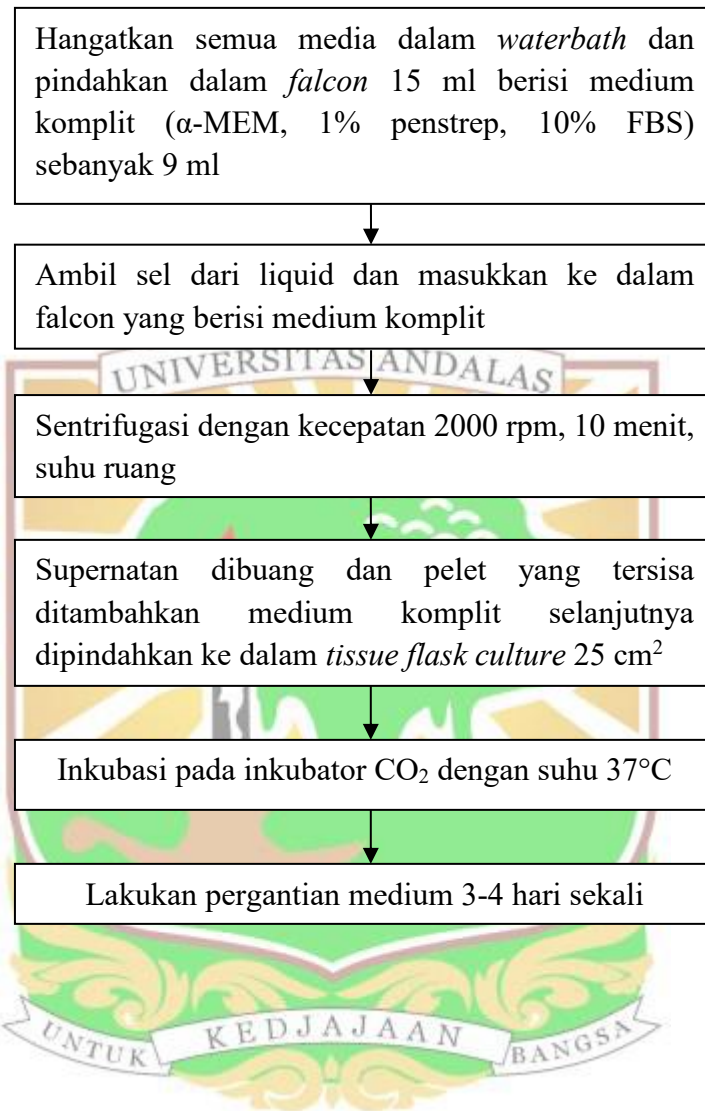
4.7.10 Pengukuran Hasil Elektroforesis

Pengukuran hasil elektroforesis dalam penelitian ini menggunakan metode semikuantitatif dengan ImageJ.

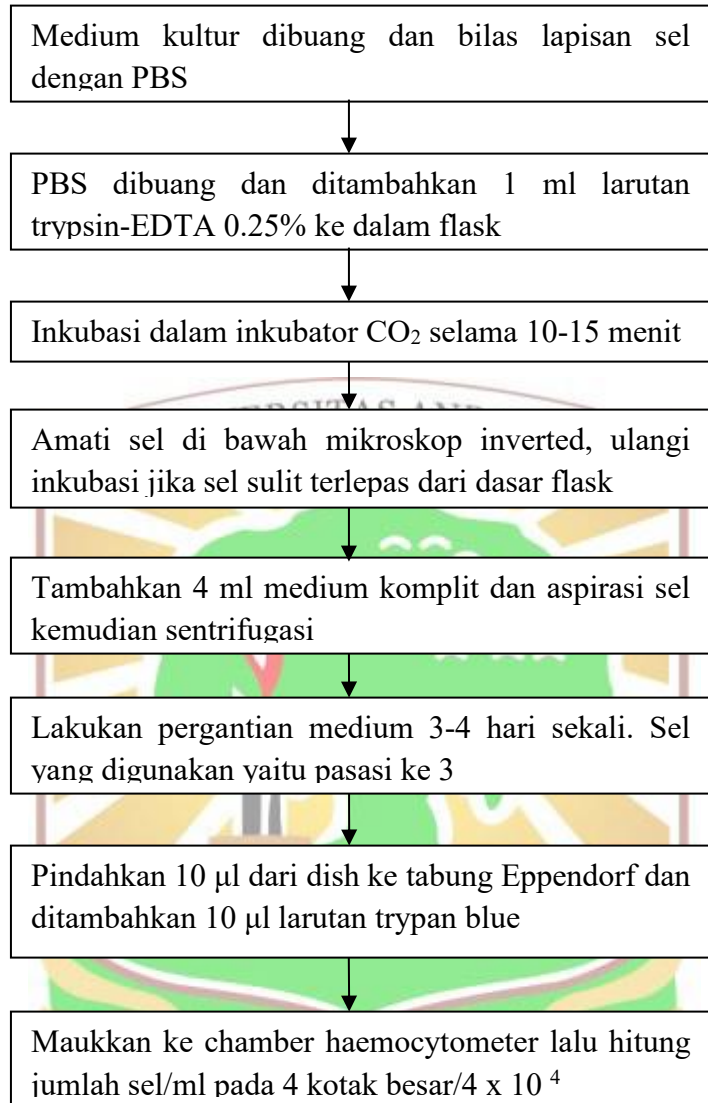


4.8 Alur Penelitian

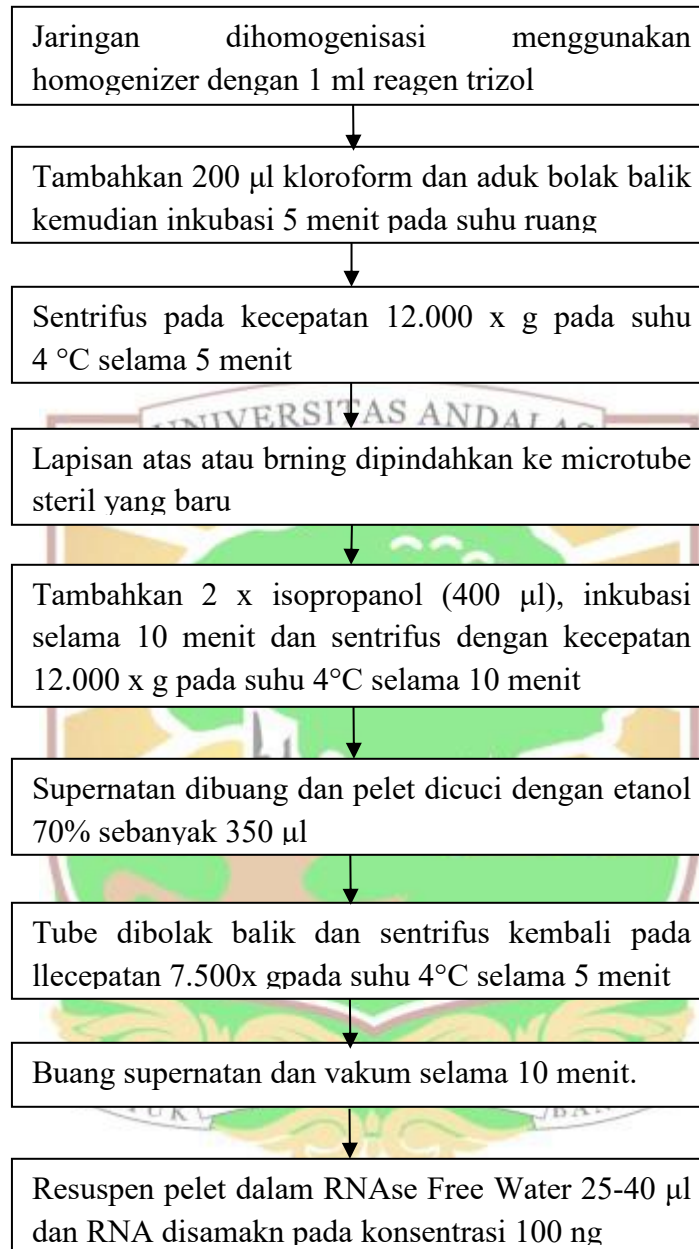
4.8.1 Persiapan Thawing *Mesenchymal Stem Cells*



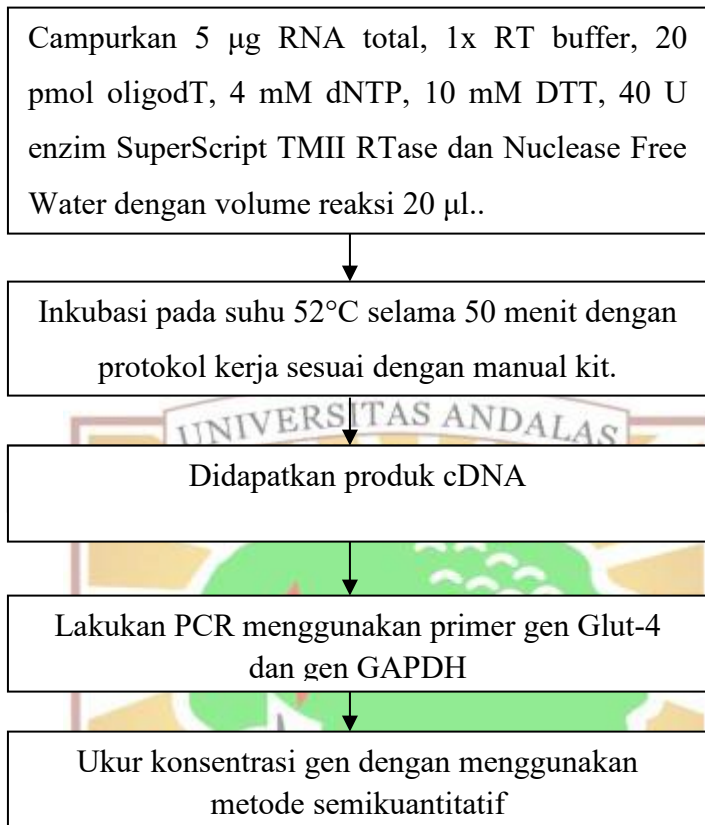
4.8.2 Sub-kultur Sel dan Perhitungan Sel



4.8.3 Isolasi RNA



4.8.4 Sintesis cDNA



4.9 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Kelompok dianalisis menggunakan *One Way ANOVA*, dan *Post Hoc Bonferroni*. Jika nilai $p < 0,05$, maka nilai tersebut dianggap signifikan. Jika data tersebut tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji alternatif *Kruskal Wallis*.

4.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan sesuai dengan izin etik yang sudah dikeluarkan dengan No : 501/UN.16.2/KEP-FK/2021.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

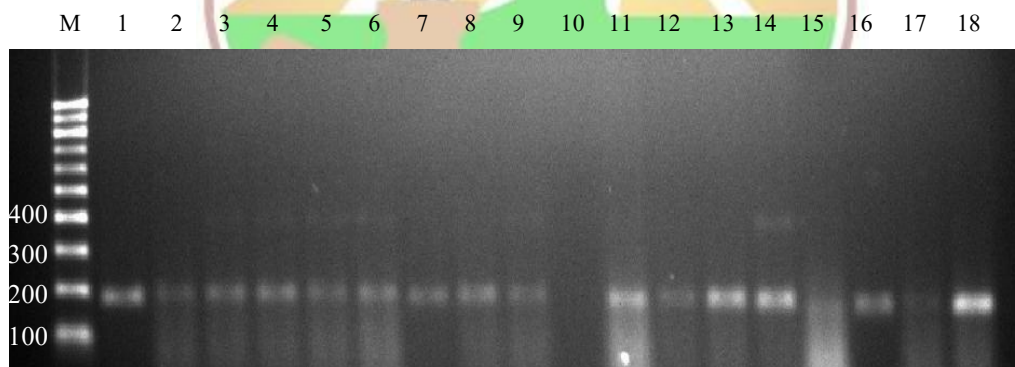
Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* terhadap gen Glut-4 pada tikus Alzheimer. Penelitian ini menggunakan sampel biologis berupa RNA dari jaringan otak hewan coba sebanyak 18 sampel dengan rincian : 6 sampel sebagai kontrol negatif, 6 sampel sebagai kontrol positif yang diberikan $AlCl_3$, dan 6 sampel sebagai perlakuan dengan pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly*. Setelah isolasi RNA kemudian dilakukan sintesis cDNA. Pada hari ke-2 dilanjutkan mengukur tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer sehingga diperoleh data yang disajikan pada Tabel 5.1. Rasio 260/280 nm memiliki sensitifitas yang tinggi untuk menilai kontaminasi DNA oleh protein. Semakin tinggi kandungan asam nukleat dalam sampel, maka semakin rendah rasio nilai absorbansi pada 260/280nm begitu pula sebaliknya. Molekul DNA dikatakan murni jika nilai rasio A_{260}/A_{280} adalah sebesar 1.7 – 2.0.⁴⁵

Tabel 5.1 : Uji Kemurnian dan Konsentrasi Larutan DNA pada Sampel Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

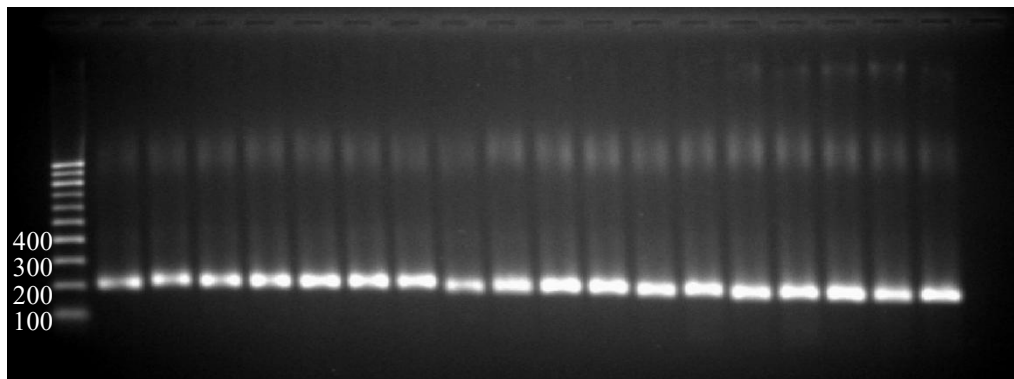
Sampel	Rataan Kemurnian (A 260/280)	Rataan Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
K-1	1,8	2207,3
K-2	2	957,75
K-3	1,9	1828,75
K-4	1,9	1585,15
K-5	2	1742,85
K-6	2	1642,35
K+1	1,7	2061,8
K+2	2	2438,45

K+3	1,9	1287,25
K+4	1,9	2172
K+5	2	822,8
K+6	2	1821,25
P1	2	1015,3
P2	2	1100
P3	1,8	136,05
P4	1,8	1678,7
P5	2	378,75
P6	2	912,25

Hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm beragam namun secara keseluruhan DNA yang digunakan itu murni karena nilai rasio A 260/280 rata-rata dalam rentang 1.7 – 2.0. Selanjutnya dilakukan proses amplifikasi fragmen DNA primer yang akan diteliti yaitu gen Glut-4 dan gen GAPDH sebagai *housekeeping*.



Gambar 5.1 : Visualisasi hasil amplifikasi fragmen DNA gen Glut-4 pada gel agarose 1.5%, (M) Marker 100 bp (basepare), sampel kontrol negatif (1-6), kontrol positif(7-12), dan perlakuan (12-18).



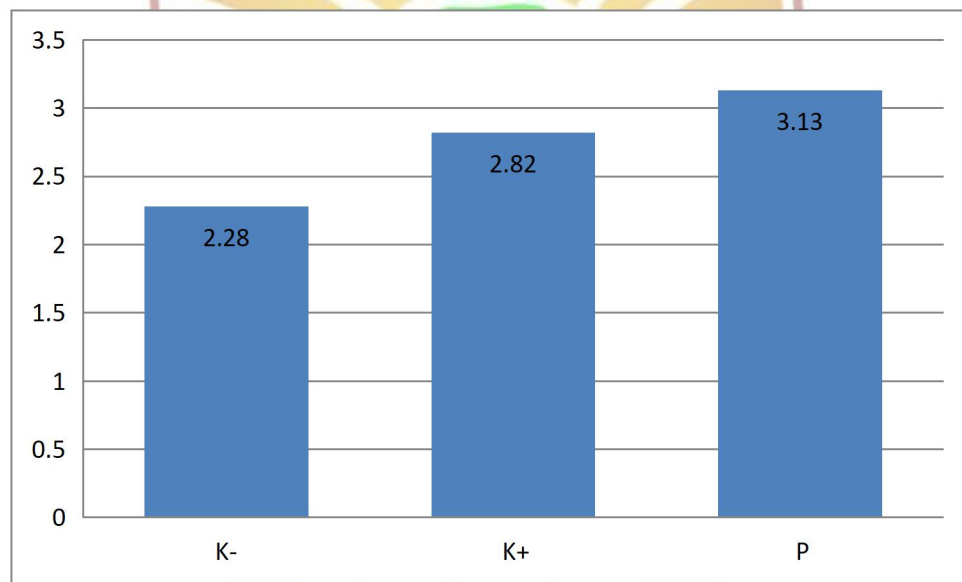
Gambar 5.2 : Visualisasi hasil amplifikasi fragmen DNA gen GAPDH pada gel agarose 1.5%, (M) Marker 100 bp (basepare), sampel kontrol negatif (1-6), kontrol positif(7-12), dan perlakuan (12-18).

Dari Gambar 5.1 dan 5.2 memperlihatkan bahwa hasil amplifikasi gen Glut-4 dan GAPDH dalam gel agarose terbaca pada angka 200 bp. Selanjutnya nilai disetiap pita dibaca menggunakan ImageJ dan dilakukan perbandingan untuk mengetahui ekspresi gen Glut-4 pada setiap sampel.

Tabel 5.2 Ratio Ekspresi gen Glut-4

Kelompok	No Sampel	Ratio
Kontrol Negatif	1	2,68
	2	2,70
	3	2,63
	4	1,54
	5	1,89
	6	2,25
Rata-rata		2,28
Kontrol Positif	1	2,66
	2	3,31
	3	2,96
	4	2,63
	5	2,03

	6	3,34
Rata-rata		2,82
Perlakuan	1	2,42
	2	3,00
	3	2,87
	4	2,30
	5	4,66
	6	3,56
Rata-rata		3,13

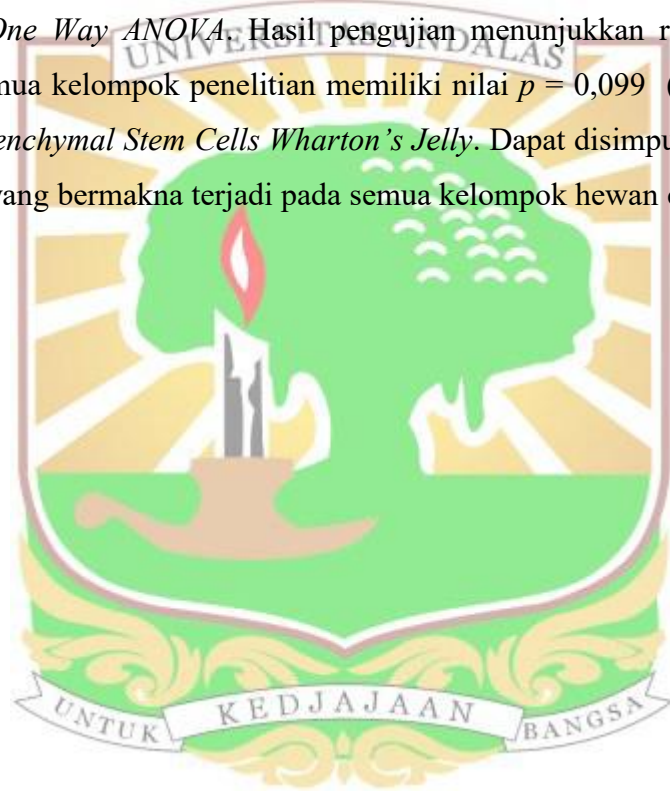


Gambar 5.3 Grafik Rata-Rata Ratio Ekspresi gen Glut-4 pada setiap Kelompok Sampel.

Data yang didapat kemudian diuji dengan interval kepercayaan 95% dan taraf signifikansi 0,05 ($p = 0,05$). Hasil analisis ini diuraikan dalam uji normalitas data dan uji komparabilitas. Hasil pengukuran ekspresi gen Glut-4 pada masing-masing kelompok selanjutnya dianalisis secara statistik. Pengujian yang dilakukan adalah uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk Test* dan didapatkan hasilnya pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan berturut-turut adalah 0.205, 0,531, 0,367. Nilai $p > 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa data terdistribusi normal

sehingga uji *One Way ANOVA* dapat dilakukan. Selanjutnya analisis data dilakukan dengan menggunakan uji *One Way ANOVA*.

Uji *One Way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui bermakna atau tidaknya perbedaan ratio ekspresi gen Glut-4 pada setiap kelompok secara statistik. Nilai perbedaan yang dapat diuji dengan nilai $p < 0,05$. Sebelum melakukan uji *One Way ANOVA*, terlebih dahulu dilakukan pengujian *Homogeneity of Variances* untuk mengetahui kesamaan varian data. Hasil uji didapatkan nilai $p = 0,349$ ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa varian data antar kelompok sama. Selanjutnya dilakukan uji *One Way ANOVA*. Hasil pengujian menunjukkan ratio ekspresi gen Glut-4 pada semua kelompok penelitian memiliki nilai $p = 0,099$ ($p > 0,05$) setelah pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly*. Dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna terjadi pada semua kelompok hewan coba.



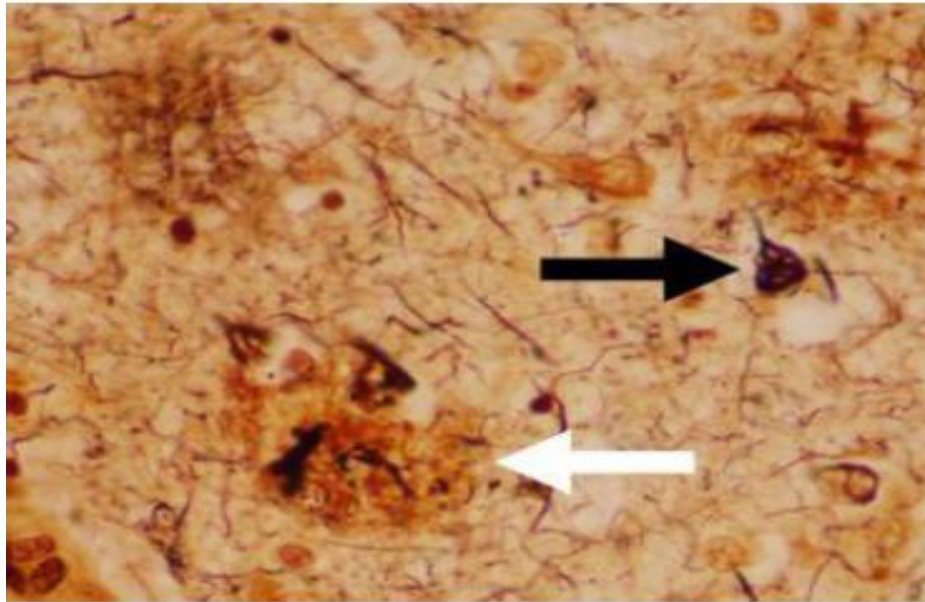
BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Ekspresi gen Glut-4 Kelompok Kontrol Positif

Kelompok positif pada penelitian ini adalah RNA tikus yang diinduksi menjadi Alzheimer menggunakan senyawa kimia $AlCl_3$ dengan dosis 300 mg/kgBB yang diberikan secara oral selama 5 hari untuk menginduksi terbentuknya plak amiloid yang dibuktikan oleh penelitian sebelumnya.¹⁵ Aluminium (Al) adalah zat neurotoksik yang berperan penting dalam perkembangan plak *beta-amyloid* ($A\beta$). Aluminium ini mampu melewati *blood brain barrier* (BBB) melalui afinitas tinggi dari reseptor spesifik transferin.⁴⁶ Pemberian $AlCl_3$ dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif dan akumulasi oksigen reaktif (ROS) di dalam sel otak. Hal ini akan mendorong pemrosesan dari gen APP amiloidogenik yang dipecah menjadi $A\beta$ oleh enzim β -secretase dan γ -secretase.¹⁵

Mutasi ganda pada gen APP akan meningkatkan pemecahan APP sehingga $A\beta$ yang dihasilkan juga meningkat. Kegagalan *clearance mechanisms* dari $A\beta$ di otak mengakibatkannya tidak larut dan menumpuk. Penumpukan dari $A\beta$ akan membentuk agregasi oligomer $A\beta$. Agregasi oligomer $A\beta$ pada kaskade amiloid bersifat neurotoksik sehingga dapat menyebabkan disfungsi sinap dan kerusakan sel saraf yang berimplikasi terhadap penurunan fungsi kognitif berupa gangguan memori.⁴⁷ Selanjutnya agregasi oligomer $A\beta$ akan membentuk plak $A\beta$ yang dapat menyebabkan disfungsi mitokondria dan memicu Tau patologis melalui penurunan aktivitas *superoksida dismutase* yang terkait dengan $A\beta$ dan aktivasi *sintase kinase* yang akhirnya membentuk kusut neurofibrillary.³³ Terbentuknya plak $A\beta$ atau *neuritic plaque* dan *neurofibrillary tangles* (NFTs) pada hipokampus otak dapat dibuktikan secara histopatologi dengan pewarnaan *congo red* yaitu adanya tumpukan protein yang berwarna coklat.⁹

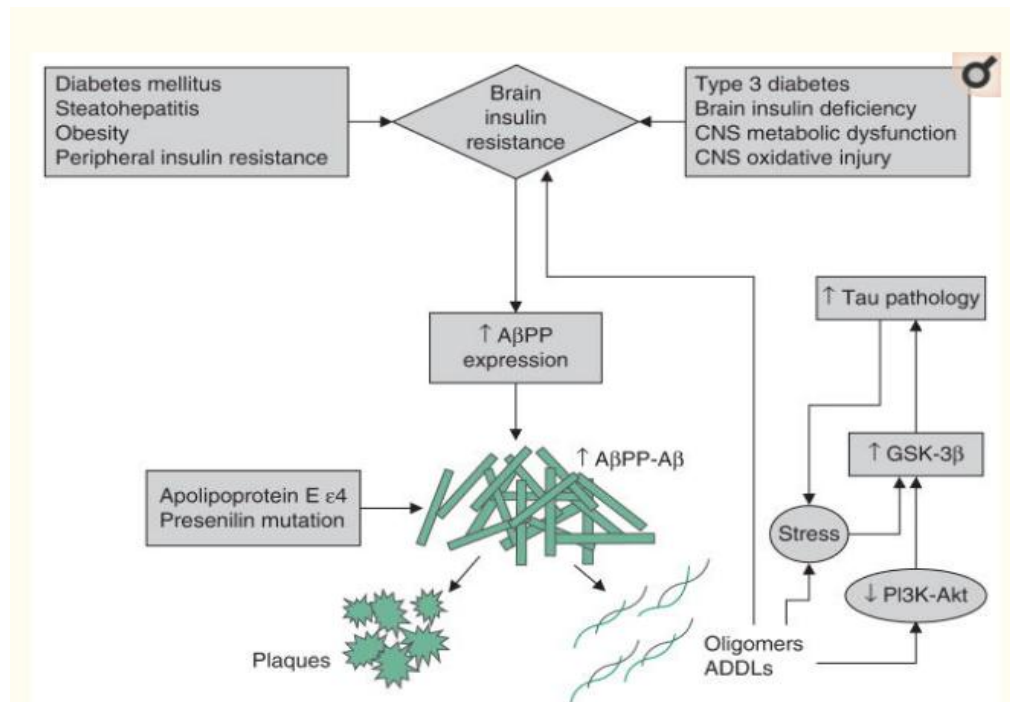


Gambar 6.1 : *Neurofibrillary tangles* (tanda panah hitam) dan *Neuritic plaque* (tanda panah putih).⁹

Oligomer A β dapat menyebabkan gangguan sinyal insulin di hipokampus dan translokasi Glut-4 berkurang sehingga suplai glukosa sebagai sumber energi bagi otak juga berkurang.^{22,25} Metabolisme glukosa dimulai dengan adanya ikatan antara insulin dan reseptornya yang terdapat di permukaan membran sel dan menghasilkan signal intraseluler. Pengikatan insulin mengaktifasi aktivitas subunit tirosin-kinase dengan merangsang fosforilasi reseptornya seperti substrat reseptor insulin (IRS-1 dan IRS-2) di sel saraf dan sel glial.⁴⁸ Signal ini selanjutnya mengakibatkan translokasi Glut-4 menuju membran plasma pada permukaan sel otak membentuk saluran. Adanya saluran ini menyebabkan glukosa masuk ke dalam sel saraf dan sel glial. Translokasi Glut-4 ke membran plasma untuk meningkatkan penyerapan glukosa seluler diatur oleh beberapa molekul signal pasca-reseptor yang penting untuk mempertahankan memori jangka panjang seperti insulin (PI3K / Akt), *AMP-activated protein kinase* (AMPK), protein kinase C-zeta, protein asetilasi histon, protein kinase A, dan Ca²⁺ /calmodulin kinase II.^{21,22} Sebaliknya, degradasi dari IRS-1/2 oleh c-Jun N-terminal kinase (JNK1) dan protein kinase lainnya

yang menghambat fosforilasi tirosin yang dirangsang oleh insulin dapat menyebabkan terjadinya resistensi insulin.⁴⁸

Pada penelitian De La Monte dkk terdapat suatu mekanisme umpan balik positif atau *loop feed-forward* yang menghubungkan antara *insulin resistance*, patologi A β yang menghasilkan plak A β dan hiperfosforilasi protein tau.⁴⁹



Gambar 6.2 : Hubungan Timbal Balik antara *Insulin Resistance*, Plak A β , dan Hiperfosforilasi Tau.⁴⁹

Resistensi insulin berkontribusi terhadap degenerasi saraf yang memicu peradangan saraf dan peningkatan ekspresi protein precursor A β (A β PP). Peningkatan ekspresi protein precursor A β (A β PP) mengawali terbentuknya plak A β yang tidak larut dan hiperfosforilasi protein tau. Akibat penurunan pensinyalan melalui phosphoinositol-3-kinase (PI3K), Akt atau aktivasi yang berlebihan oleh glikogen sintase kinase 3 β (GSK-3 β) mengakibatkan terbentuk struktur fibril yang berpasangan (filamen heliks dan lurus) yang akhirnya membentuk kusut neurofibrillary. Kusut ini dapat mengganggu jaringan sitoskeletal dan transportasi aksonal yang menyebabkan pemutusan sinaptik dan neurodegenerasi progresif.⁴⁹

Glukosa transporter-4 (Glut-4) adalah suatu protein spesifik yang dikenal sebagai transporter glukosa utama dan responsif terhadap insulin di dalam jaringan otot rangka, otot jantung, adiposa, dan otak.⁵⁰ Ekspresi Glut-4 dalam membran plasma sangat bergantung pada insulin.⁴⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Blazquez dkk melaporkan bahwa Glut-4 terletak di area selektif otak, termasuk bulbus olfaktorius, dentate gyrus hipokampus, hipotalamus, dan korteks dengan jumlah yang rendah dibandingkan dengan isoform lainnya.⁴⁸ Tingkat ekspresi glukosa transporter di otak berbeda-beda, seperti yang dijelaskan pada gambar 6.3.

Isoform transpor glukosa	Lokasi	Jenis sel	Kelimpahan	Kontrol
GLUT-1	di mana-mana	Glia dan endotel	Sangat melimpah	Hipoglikemia, insulin
GLUT-2	Hipotalamus	Neuron, glia, dan tanocytes	Terbatas	
GLUT-3	Cerebellum, striatum, korteks, dan hipokampus	Neuron, glia, dan endotel	Sangat melimpah	
GLUT-4	Bulbus olfaktorius, hipokampus (dentate gyrus), dan hipotalamus serebelum	Neuron dan glia	Area selektif	Glukosa, insulin dan latihan olahraga
GLUT-8	Hipotalamus, serebelum, batang otak, hipokampus, dentate gyrus, amigdala, dan korteks olfaktorius primer	Neuron: badan dan dendrit apikal proksimal	Terbatas	Glukosa

Gambar 6.3 : Isoform Transport Glukosa Utama di Otak.⁴⁸

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahap, dimulai dengan isolasi RNA hewan coba Alzheimer yang diperoleh dari jaringan disekitar hipokampus otak, kemudian melakukan sintesis cDNA, amplifikasi PCR, elektroforesis, dan menghitung ekspresi gen Glut-4 menggunakan ImageJ. Sampel yang digunakan pada penelitian ini belum diketahui telah mengalami resistensi insulin atau tidak. Pada penelitian yang dilakukan oleh Das dkk melaporkan pada AD ketika terjadi resistensi insulin maka kadar Glut-4 mengalami penurunan yang mengakibatkan berkurangnya translokasi glukosa ke dalam membran sel otak. Kurangnya mutasi pada gen yang sesuai dengan fungsi

glukosa transpoter juga berpengaruh terhadap ekspresinya.²⁴ Resistensi insulin di otak terjadi dalam jangka waktu yang lama dan tidak hanya karena patologi A β tetapi juga dipengaruhi oleh banyak faktor seperti adanya kerusakan pankreas dalam memproduksi insulin secara berlebihan, penyakit resistensi insulin di jaringan perifer, diabetes mellitus, paparan toksik atau faktor lingkungan.⁴⁹ Penelitian lain telah menemukan bahwa meskipun diabetes menghasilkan perubahan dalam kinerja kognitif atau meningkatkan risiko demensia tetapi tidak ada hubungan antara DM dan AD.⁵¹ Pada penelitian ini hewan coba berhasil diinduksi menjadi Alzheimer menggunakan AlCl₃, namun kondisi ini belum memperlihatkan pengaruh terhadap ekspresi dari gen Glut-4 karena berdasarkan analisis statistik didapatkan rata-rata ekspresi gen Glut-4 pada kelompok kontrol positif (2,82) lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif (2,28).

6.2 Ekspresi Gen Glut-4 Kelompok Perlakuan Pemberian MSC-WJ

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer. *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* berpotensi mengurangi deposit A β dan hiperfosforilasi protein tau, meningkatkan neurogenesis dan memberikan dukungan dengan faktor yang disekresikan.³⁷ *Mesenchymal Stem Cells* mengeluarkan berbagai faktor parakrin yang disebut sebagai *secretome* yang berperan hingga 80% dari efek terapeutiknya.⁵² *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* diketahui mampu mengeluarkan vesikel ekstraseluler (MSC-EVs) yang dapat melewati sawar darah otak sehingga sangat cocok diaplikasikan untuk membantu proliferasi sel-sel saraf yang sudah rusak pada jaringan otak. Vesikel ini dikeluarkan oleh MSC-WJ dengan ukuran, morfologi yang berbeda dan molekul bioaktif yang terdapat didalamnya seperti messenger RNA (mRNA), microRNAs (miRNAs), sitokin, kemokin, faktor imunomodulator yang mengatur fenotip dan fungsi tertentu dari interaksi yang dihasilkan.⁵³

Studi yang dilakukan oleh Aline dkk menunjukkan bahwa *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* mendorong regenerasi saraf melalui peningkatan regulasi langsung oleh gen *Heparin Binding Epidermal Growth Factor* (HBEGF), *C-X-C chemokine Ligand-5* (CXCL5), CXCL2, *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor-9* (FGF9), *midkine* (MDK) dan pelepasan *neurotrophic-3* (NTF-3) sebagai faktor neurotropik pada sel target.^{54,55} Diketahui juga MSC-WJ mampu mengaktifkan beberapa faktor transkripsi neurogenesis seperti *SRY-box containing gene-11* (SOX11) dan *Paired-Like Homeodomain Transcription Factor-1* (PITX1) serta faktor transkripsi angiogenesis yaitu *The forkhead transcription factor* (FOXF1). Reseptor yang terlibat dalam neurogenesis juga meningkat akibat MSC-WJ ini seperti *NCadherin-2* (CDH2), *Neuropilin-2* (NRP2), dan *Fms-related tyrosine kinase-1* (FLT1).⁵⁵

Pada penyakit Alzheimer akumulasi *beta-Amyloid* akan membentuk plak amiloid yang dapat menyebabkan proses imun lokal seperti aktivasi dari mikroglial, peningkatan sitokin pro-inflamasi (TNF- α , IL1 β , IL-2) dan respon inflamasi dari banyak protein yang dapat mendegradasi sel saraf secara kronis.^{33,54} Selama terbentuknya plak A β maka stres oksidatif akan terus meningkat, namun MSC-WJ resisten terhadap stres oksidatif karena memiliki enzim anti-oksidan yang tinggi sehingga walaupun inflamasi meningkat MSC-WJ masih dapat bekerja dengan baik.¹⁹ *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* dapat menginduksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-4, IL-10, IL-35 dan TGF- β untuk mengontrol pro-inflamasi sehingga dapat mengurangi peradangan saraf yang cedera. Keseimbangan antara pro dan anti-inflamasi sangat penting untuk regenerasi saraf perifer.⁵⁴

Transplantasi MSC-WJ dapat mengaktifkan mikroglia (mikroglia mirip M2) sebagai neuroprotektif atau neurodestruktif untuk melindungi neuron dengan meningkatkan pembersihan A β sehingga dapat mengurangi penumpukan *Beta-Amyloid* di jaringan otak.⁵⁶ Salah satu karakteristik penting dari MSC adalah kemampuan untuk menuju ke jaringan yang mengalami

kerusakan. Penelitian yang dilakukan oleh Lian dkk melaporkan bahwa MSC-WJ juga memiliki peningkatan sensitivitas insulin dan pemulihan fungsi sel pankreas yang rusak karena memproduksi insulin secara berlebihan.⁵⁷ Pada penelitian ini didapatkan rata-rata ekspresi gen Glut-4 pada RNA tikus Alzheimer yang diberikan perlakuan MSC-WJ (3,13) lebih tinggi dari pada RNA tikus yang diinduksi menjadi Alzheimer menggunakan $AlCl_3$ (2,82).

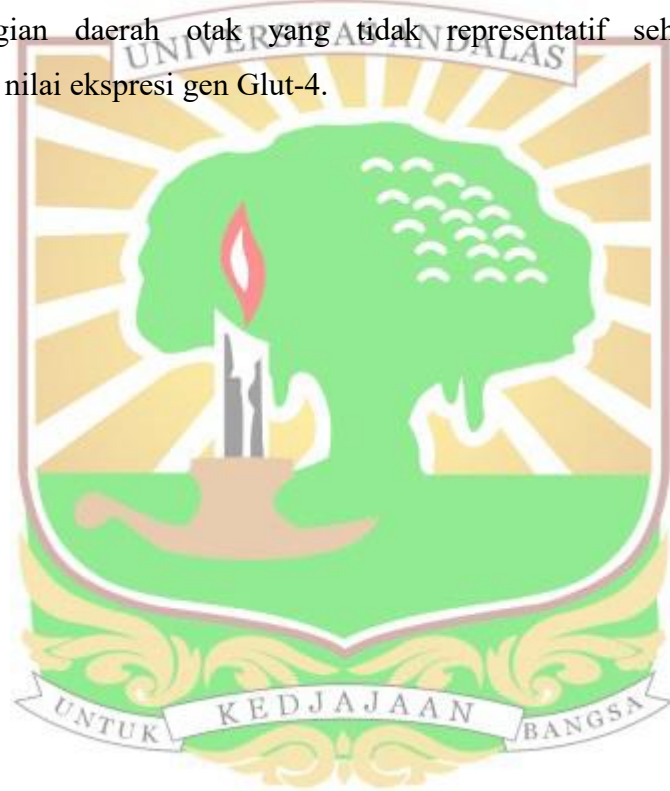
6.3 Perbandingan Ekspresi Gen Glut-4 Kelompok Positif dengan Kelompok Perlakuan Pemberian MSC-WJ

Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly diketahui mampu mengeluarkan vesikel ekstraseluler (MSC-EVs) yang dapat melewati sawar darah otak dengan jumlah sel yang optimal sehingga dapat memberikan efek biologis seperti regeneratif, proliferasi, anti-apoptosis, dan anti-inflamasi. Vesikel ekstraseluler adalah partikel terikat membran fosfolipid yang disekresikan dari sel yang mengandung biomolekul, faktor pertumbuhan, sitokin, lipid, DNA, dan RNA. Vesikel ekstraseluler berinteraksi dengan sel penerima melalui mekanisme yang mirip dengan yang terlibat dalam entri virus termasuk mengikat reseptor permukaan untuk memicu kaskade sinyal dan fusi dengan sel untuk mengirimkan bahan langsung ke membran sitoplasma dan sitosol.⁵²

Pada penelitian ini rata-rata ekspresi gen Glut-4 pada RNA tikus Alzheimer yang diberikan perlakuan MSC-WJ mengalami peningkatan dibandingkan pada RNA tikus yang diinduksi menjadi Alzheimer menggunakan $AlCl_3$. Hal ini belum dapat dipastikan bahwa MSC-WJ dapat mempengaruhi ekspresi gen Glut-4 karena berdasarkan analisis statistik setiap kelompok sampel didapatkan nilai $p > 0,05$ yang artinya setiap kelompok sampel tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna sehingga hipotesis dari penelitian ini ditolak karena tidak terbukti ditemukannya pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer.

6.4. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah peneliti masih melakukan pengukuran ekspresi gen Glut-4 menggunakan PCR konvensional dengan metode semikuantitatif dan secara manual menggunakan ImageJ untuk mencari nilai ekspresi gen Glut-4 dari hasil elektroforesis sehingga kemungkinan bias masih tinggi. Pada penelitian ini belum ada pemeriksaan resistensi insulin pada kelompok hewan coba Alzheimer, sehingga dapat memengaruhi hasil analisis statistik pengaruh MSC-WJ terhadap ekspresi gen Glut-4, dan pengambilan sampel dibagian daerah otak yang tidak representatif sehingga dapat memengaruhi nilai ekspresi gen Glut-4.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

- 7.1.1. Ekspresi gen Glut-4 pada RNA tikus yang telah diinduksi menggunakan $AlCl_3$ memiliki hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan RNA tikus yang tidak diinduksi menggunakan $AlCl_3$.
- 7.1.2 Ekspresi gen Glut-4 pada RNA tikus yang diberi perlakuan *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* memiliki hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan RNA tikus yang diinduksi $AlCl_3$ tanpa pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly*.
- 7.1.3 Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen Glut-4 antara kelompok tikus yang hanya diberikan $AlCl_3$ dengan kelompok tikus yang diberikan $AlCl_3$ dan *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly*.

7.2 Saran

- 7.2.1. Bagi peneliti selanjutnya agar dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* terhadap ekspresi gen Glut-4 pada tikus Alzheimer dengan menggunakan Real Time PCR
- 7.2.2. Bagi peneliti selanjutnya agar dilakukan penelitian lebih lanjut terkait efek *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* dapat mengurangi penumpukan plak $A\beta$, imunomodulator dan peranan lainnya.
- 7.2.3 Bagi peneliti selanjutnya agar dapat dilanjutkan penelitian dengan menggunakan gen yang lebih spesifik untuk Alzheimer.
- 7.2.4 Bagi peneliti selanjutnya agar dilakukan pengambilan sampel dari jaringan hipokampus yang lebih representatif untuk membuktikan hubungan Glut-4 dengan plak $A\beta$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wahyuni A, Nisa K. Pengaruh Aktivitas dan Latihan Fisik terhadap Fungsi Kognitif pada Penderita Demensia. *Majority*. 2016;5(4):12-16.
2. Raz L, Knoefel J, Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(1):172-186.
3. Kakutani S, Watanabe H, Murayama N. Green tea intake and risks for dementia, Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and cognitive impairment: A systematic review. *Nutrients*. 2019;11(5).
4. Serrano-Pozo A, Growdon JH. Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable? *J Alzheimer's Dis*. 2019;67(3):795-819.
5. Bare Y. Analisis senyawa fitosterol *Cymbopogon citratus* dan *Curcuma longa*. 2021;7.
6. Siska EM. Darmabakti Cendekia : Caregiver Training on Care for People With. 2020;2:1-3.
7. Rosenberg A, Mangialasche F, Ngandu T, Solomon A, Kivipelto M. Multidomain Interventions to Prevent Cognitive Impairment, Alzheimer's Disease, and Dementia: From FINGER to World-Wide FINGERS. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2020;7(1):29-36.
8. Ary K, Pattni M, Udayana U. Beta-Amyloid As Pathogenesis of Alzheimer Disease. *e-Jurnal Med Udayana*. 2013;2(8):1306-1317.
9. Nisa KM, Lisiswanti R. Faktor Risiko Demensia Alzheimer. *Majority*. 2016;5(4):86.
<http://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/view/890>
10. Pattni K. Beta-Amyloid sebagai Patogenesis pada Penyakit Alzheimer. Published online 2014:12.
11. Wilson H, Pagano G, Politis M. Dementia spectrum disorders: lessons learnt from decades with PET research. *J Neural Transm*. 2019;126(3):233-251.
12. Tiwari S, Venkata A, Kaushik A, Adriana Y NM. Alzheimer's Disease Diagnostics And Therapeutics Market. [Enfermedad de Alzheimer: patogenia, diagnóstico y terapéutica]. *Int J Nanomedicine*. 2019;Jul 2019(14):5541-5554.
13. Ada N, Wilson WT, Zhang MW, Ho CS, Husain SF. IL-1 β , IL-6 , TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer ' s disease : Systematic Review and Meta-Analysis. 2018;(August 2017):1-12.
14. Duncan T, Valenzuela M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1-9.
15. Mustafa HN. Neuro-amelioration of cinnamaldehyde in aluminum-induced Alzheimer's disease rat model. *J Histotechnol*. 2020;43(1):11-20.
16. Sun C, Wang L, Wang H, et al. Single-cell RNA-seq highlights heterogeneity in human primary Wharton ' s jelly mesenchymal stem / stromal cells cultured in vitro. Published online 2020:1-16.
17. Lee J, Kwon SJ, Kim JH, et al. Cerebrospinal fluid from Alzheimer ' s disease patients as an optimal formulation for therapeutic application of mesenchymal stem cells in Alzheimer ' s disease. *Sci Rep*. 2019;(January 2018):1-9.

18. Lee M, Ban JJ, Yang S, Im W, Kim M. The exosome of adipose-derived stem cells reduces β -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2018;1691:87-93.
19. Bodart-santos V, Carvalho LRP De, Godoy MA De, et al. Extracellular vesicles derived from human Wharton ' s jelly mesenchymal stem cells protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. 2019;5:1-13.
20. Koepsell H. Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2020;472(9):1299-1343.
21. Marko DM, Foran G, Vlavcheski F, et al. Interleukin-6 Treatment Results in GLUT4 Translocation and AMPK Phosphorylation in Neuronal SH-SY5Y Cells. *Cells.* 2020;9(5).
22. McNay EC, Pearson-Leary J. GLUT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. *Exp Neurol.* 2020;323:113076.
23. Pearson-Leary J, McNay EC. Novel roles for the insulin-regulated glucose transporter-4 in hippocampally dependent memory. *J Neurosci.* 2016;36(47):11851-11864.
24. Das TK, Chakrabarti SK, Zulkipli IN, Abdul Hamid MRW. Curcumin Ameliorates the Impaired Insulin Signaling Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease in Rats. *J Alzheimer's Dis Reports.* 2019;3(1):59-70.
25. Mullins RJ, Diehl TC, Chia CW, Kapogiannis D. Insulin Resistance as a Link between Amyloid-Beta and Tau Pathologies in Alzheimer ' s Disease. 2017;9(May):1-16.
26. Isaacson RS, Ganzer CA, Hristov H, et al. The clinical practice of risk reduction for Alzheimer's disease: A precision medicine approach. *Alzheimer's Dement.* 2018;14(12):1663-1673.
27. Xuefeng Chen, et al 2011. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *Physiol Behav.* 2011;176(10):139-148.
28. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(2):317-330.
29. Aisen PS, Cummings J, Jack CR, et al. On the path to 2025: Understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's Res Ther.* 2017;9(1):1-10.
30. Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's disease prevention: From risk factors to early intervention. *Alzheimer's Res Ther.* 2017;9(1):1-9.
31. Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Frittitta L. Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: Role of insulin signalling and therapeutic implications. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
32. Budiman HM, Berawi KN, Bustomi EC, et al. Mekanisme Rokok dalam Meningkatkan Risiko Penyakit Alzheimer Smoking Mechanism in Increasing Risk of Alzheimer ' s Disease. *J Kedokt.* 2018;7(3):234-240.
33. Thakur AK, Kamboj P, Gosmawi K, Ahuja K. Pathophysiology and management of alzheimer's disease. 2018;(an overview. *J Anal Pharm*

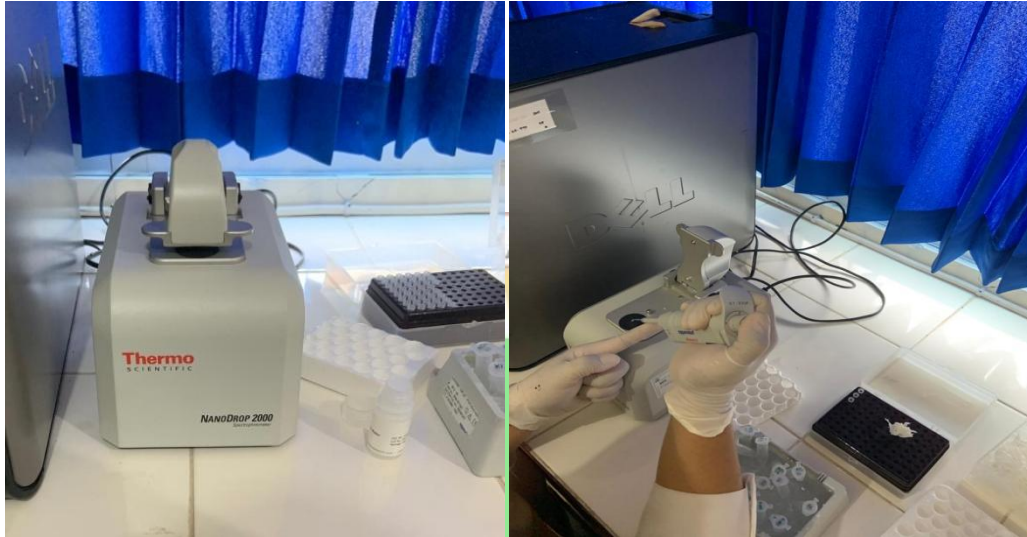
- Res.):7(2):226–235.
34. Cummings J, Feldman HH, Scheltens P. The “rights” of precision drug development for Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Res Ther.* 2019;11(1):1-14.
 35. Jin H, Guan S, Wang R, et al. The Distribution of Urinary Alzheimer-Associated Neuronal Thread Protein and Its Association with Common Chronic Diseases in the General Population. *J Alzheimers Dis.* 2018;65(2):433-442.
 36. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Minjarez B, Gutiérrez-Mercado YK, Márquez-Aguirre AL, Canales-Aguirre AA. Potential Effects of MSC-Derived Exosomes in Neuroplasticity in Alzheimer’s Disease. *Front Cell Neurosci.* 2018;12(September):1-16.
 37. Vasic V, Barth K, Schmidt MHH. Neurodegeneration and neuroregeneration— Alzheimer’s disease and stem cell therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).
 38. Stefanska K. Human Wharton’s Jelly—Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. Published online 2020:9.
 39. Dabrowska S, Sypecka J, Jablonska A, et al. Neuroprotective Potential and Paracrine Activity of Stromal Vs . Culture-Expanded hMSC Derived from Wharton Jelly under Co-Cultured with Hippocampal Organotypic Slices. Published online 2017.
 40. Kangari P, Talaei-Khozani T, Razeghian-Jahromi I, Razmkhah M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1-21.
 41. Putra MR. Hubungan Antara Tingkat Keparahan Neuropati Diabetik Dengan Gangguan Fungsi Kognitif Pada Penderita Diabetes Melitus. Published online 2019:1-95.
 42. Kim H, Na DL, Lee NK, Kim AR. Intrathecal Injection in A Rat Model : A Potential Route to Deliver Human Wharton ’ s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into the Brain. :1-12.
 43. Aboelwafa HR, El-Kott AF, Abd-Ella EM, Yousef HN. The possible neuroprotective effect of silymarin against aluminum chloride-prompted alzheimer’s-like disease in rats. *Brain Sci.* 2020;10(9):1-21.
 44. Dwi Yarni S. *Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cell Wharton Jelly Terhadap Ekspresi Gen Calm1 Dan Casp9 Pada Tikus Alzheimer.*; 2021.
 45. Indriati M. Deteksi kandungan babi pada produk olahan daging menggunakan metode multipleks pcr di kabupaten pandeglang. *J Biol dan Pembelajarannya.* 2021;16(1):1-10.
 46. Wang L. Entry and Deposit of Aluminum in the Brain. :39-51.
 47. Yu H, Yuan B, Chu Q, Wang C, Bi H. Protective roles of isoastilbin against Alzheimer’s disease via Nrf2-mediated antioxidation and anti-apoptosis. *Int J Mol Med.* 2019;43(3):1406-1416.
 48. Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer’s disease. *Front Endocrinol*

- (Lausanne). 2014;5(OCT):1-21.
49. De La Monte SM. Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in alzheimers disease. *Drugs*. 2012;72(1):49-66.
 50. Saleh RA, Eissa TF, Abdallah DM, Saad MA. Peganum harmala enhanced GLP - 1 and restored insulin signaling to alleviate - Alzheimer - like pathology model. *Sci Rep*. Published online 2021:1-14.
 51. MacKnight C, Rockwood K, Awalt E, McDowell I. Diabetes mellitus and the Risk of Dementia , Alzheimer ' s Disease and Vascular Cognitive Aging. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002;1:77-83.
 52. Costa LA, Eiro N, Fraile M, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(2):447-467.
 53. Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells*. 2019;8(12).
 54. Wang AYL, Loh CY, Shen HH, et al. Human wharton's jelly mesenchymal stem cell-mediated sciatic nerve recovery is associated with the upregulation of regulatory t cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1-14.
 55. Liang J, Wu S, Zhao H, et al. Neuroscience Letters Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton ' s jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 2013;532:59-63.
 56. Yang H, Xie ZH, Wei LF, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an A β PP/PS1 transgenic mouse model. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(4).
 57. Gao LR, Zhang NK, L. W, Y. Z, H.H. T. Overexpression of apelin in Wharton' jelly mesenchymal stem cell reverses insulin resistance and promotes pancreatic β cell proliferation in type 2 diabetic rats 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *Stem Cell Res Ther*. (1):1-14.

LAMPIRAN

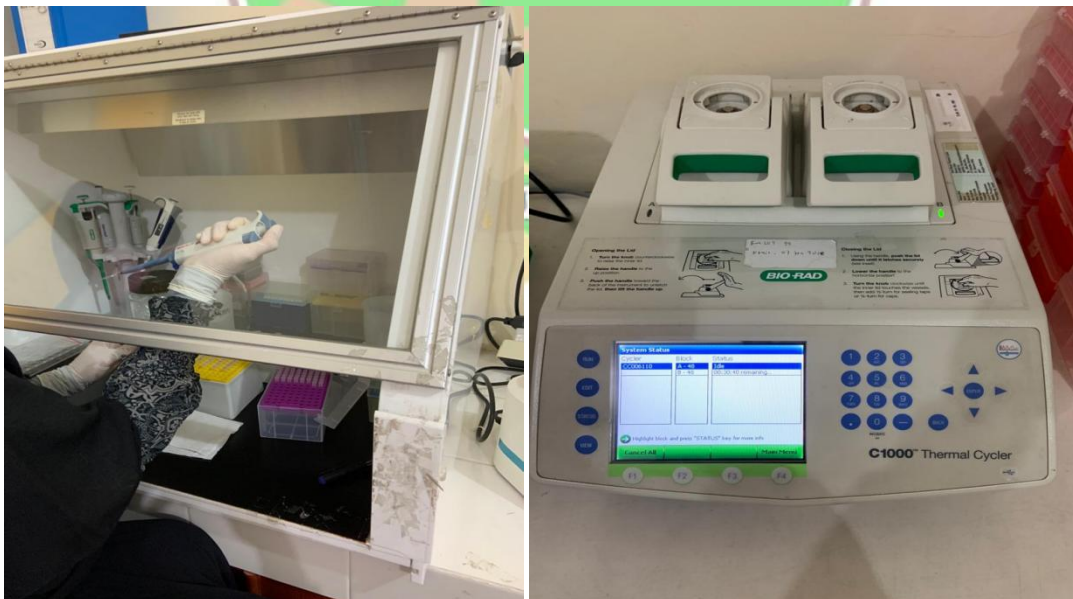
Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian

Pengukuran konsentrasi RNA



Gambar 7.1 Spektrofotometer Nanodrop

Sintesis cDNA



Gambar 7.2 Running sintesis cDNA dengan *Thermal Cycler* PCR

Running PCR



Elektroforesis



Gambar 7.3 Elektroforesis



Gambar 7.4 Gel Doc

Lampiran 2. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ANDALAS
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN

Alamat : Kampus Universitas Andalas, Limau Manis Padang Kode Pos 25163
Telepon : 0751-31746, Faksimile : 0751-32838, Dekan : 0751-39844
Laman : <http://fk.unand.ac.id> e-mail : dekanat@fk.unand.ac.id

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL

No : 524 /UN.16.2/KEP-FK/2021

Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, dalam upaya melindungi Hak Azasi dan Kesejahteraan Subjek Penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul :

The Research Ethics Committee of Medical Faculty Andalas University, in order to protect human rights and welfare of medical health research subject, has carefully reviewed the research protocol entitled :

**Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly terhadap
Ekspresi Gen Glut-4 pada Tikus Alzheimer**

Nama Peneliti Utama : Berlianisa
Principal Researcher

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Institution

Protokol Penelitian tersebut dapat disetujui pelaksanaannya.
and approved the research protocol.

Padang, 16 Desember 2021

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Medical Faculty Andalas University

Ketua
Chairman

Dr. dr. Afriwardi, SH. Sp.KO, MA
NIP 196704211997021001



Dr. dr. Yuliarni Syafrita, SpS (K)
NIP 196407081991032001

Keterangan/notes:

Keterangan lolos kaji etik ini berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.

This ethical approval is effective for one year from the due date.

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD) harus segera dilaporkan ke Komisi Etik Penelitian.

If there are Serious Adverse Events (SAE) should be immediately reported to the Research Ethics Committee.

Lampiran 3. Surat Izin Melakukan Penelitian

 KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ANDALAS
FAKULTAS KEDOKTERAN
Kampus Universitas Andalas Limau Manis Padang, Sumatera Barat 25163
Telepon : +62 751-31746, Faksimile : +62 0751-32838, Dekan : +61 751-39844
Laman ; <http://fk.unand.ac.id> e-mail : dekanat@fk.unand.ac.id

Nomor : B-573-/UN16.02.WD.1/PP/2021 17 Desember 2021
Lamp :-
Hal : Izin Pelaksanaan Penelitian

Yth. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
di Padang

Dengan hormat ,

Sehubungan dengan akan dilaksanakannya penelitian untuk pembuatan Tugas Akhir Mahasiswa Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dengan Judul "Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly terhadap Ekspresi Gen Glut-4 pada Tikus Alzheimer" oleh :

Nama : Berlianisa
No.BP : 1810311014
Alamat : Jl.Batuang taba no.16, Lubuk Begalung
No.HP/E-mail : 081268231136 / berlianisa28@gmail.com
Pembimbing : 1. Dr. dr. Yuliani Syafrita, Sp.S(K)
2. dr. Hirowati Ali, Ph.D

Maka dimohon kesediaan Saudara untuk dapat mengizinkan dan memfasilitasi mahasiswa tersebut dalam pelaksanaan penelitian di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dengan memperhatikan protokol kesehatan terkait pencegahan Covid -19.

Demikianlah disampaikan, atas bantuan dan kerjasama yang baik diucapkan terima kasih.


Wakil Dekan I,
Dr. dr. Efrida, Sp.PK(K), M.Kes
NIP. 19701002 199903 2 002

Tembusan :
1. Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

BERLIANISA

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

6%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

jurnalmka.fk.unand.ac.id

Internet Source

6%

2

Submitted to Universitas Andalas

Student Paper

3%

3

scholar.unand.ac.id

Internet Source

2%

4

ojs.unud.ac.id

Internet Source

1%

5

juke.kedokteran.unila.ac.id

Internet Source

1%

6

eprints.umm.ac.id

Internet Source

1%

7

es.scribd.com

Internet Source

1%

8

123dok.com

Internet Source

1%

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%