

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**RESPON SEL PUNCA AUTOLOGUS, ALLOGENIC, DAN
XENOTRANSPLAN PADA PERBAIKAN SEL BETA PANKREAS WISTAR
DIABETES MELLITUS**

Tahun ke-1 dari rencana 3 tahun

Dr. Bambang Purwanto, dr., M.Kes	(NIDN. 0028088001
Prof.Dr.Indri Safitri M.,dr.,M.S	(NIDN. 0014065303
Ira Humairah, dr., M.Si.	(NIDN. 0005028304

Dibiayai oleh
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian
Nomor: 304/SP2H/LT?DRPM/III/2016 Tanggal 10 Maret 2016

UNIVERSITAS AIRLANGGA
OKTOBER 2016

HALAMAN PENGESAHAN



Judul : RESPON SEL PUNCA AUTOLOGUS, ALLOGENIC, DAN XENOTRANSPLAN PADA PERBAIKAN SEL BETA PANKREAS WISTAR DIABETES MELLITUS

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : dr. BAMBANG PURWANTO S.Ked, M.Kes
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0028088001
Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
Program Studi : Pendidikan Dokter
Nomor HP : 08133053544
Alamat surel (e-mail) : bpaifo@gmail.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : INDRI SAFITRI MUKONO
NIDN : 0014065303
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

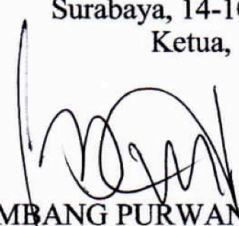
Anggota (2)
Nama Lengkap : IRA HUMAIRAH dr.
NIDN : 0005028304
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
Institusi Mitra (jika ada) : -
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 50.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 150.000.000,00

Mengetahui,
Dekan FK Unair



(Prof. Dr. Soetojo, dr, Sp.U(K))
NIP/NIK 19560104 198312 1001

Surabaya, 14-10- 2016
Ketua,



(dr. BAMBANG PURWANTO S.Ked, M.Kes)
NIP/NIK 198008282006041002

Menyetujui,
Ketua LPI Unair



(Prof. Dr. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 19590805 198701 1001

RINGKASAN

Indonesia menduduki ranking ke 4 (empat) dunia setelah Amerika Serikat, China, dan India dalam prevalensi diabetes (Diabetes Care, 2004). Terapi menggunakan sel punca menjadi alternatif yang sudah banyak dicoba, Armand dan tim pada tahun 2012 melakukan penelitian pada tikus diabetes mellitus, kesimpulan penelitian tersebut adalah transplantasi sel pankreas secara intraperitoneal memberikan respon perbaikan sel beta pankreas lebih baik daripada pemberian sel punca mesenkimal secara intraperitoneal dan insulin secara subkutaneus (Armand, et al., 2012). Sel punca mesenkimal yang berasal dari sumsum tulang belakang memiliki karakteristik multipoten, dan lebih baik dalam memproduksi sel punca lain dengan teknik induksi (induced pluripotent stemcells/ iPS) (Yamanaka, 2012).

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus wistar yang dibuat mengalami diabetes mellitus untuk membandingkan hasil transplantasi sel pankreas yang berasal dari sumsum tulang sel punca autologous, allogenic, dan xenotransplant dari jenis hewan coba lain. Hasil pemberian stemcell tersebut akan dinilai berdasar kadar glukosa darah, c-peptide, dan kadar insulin. Semua nilai tersebut akan dibandingkan antara sebelum dan sesudah, dan antara jenis transplant.

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN SAMPUL	
HALAMAN PENGESAHAN	
RINGKASAN	
PRAKATA	
DAFTAR ISI	
BAB 1 PENDAHULUAN	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
BAB 4 METODE PENELITIAN	16
BAB 5 HASIL YANG DICAPAI	21
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	24
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Prevalensi diabetes untuk semua tingkat usia di seluruh dunia diestimasi dari 2.8 % di tahun 2000 menjadi 4.4 % di tahun 2030. Jumlah penderita diabetes diproyeksikan meningkat dari 171 juta di tahun 2000 menjadi 366 juta di tahun 2030 (Wild, et al., 2004).

Indonesia menduduki peringkat ke 4 (empat) dunia setelah Amerika Serikat, China, dan India dalam prevalensi diabetes (Diabetes Care, 2004). Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik Indonesia Tahun 2003, diperkirakan penduduk Indonesia yang berusia di atas 20 tahun sebanyak 133 juta jiwa. Dengan prevalensi diabetes sebesar 14,7 % pada daerah urban dan 7,2 % pada daerah rural, maka diperkirakan pada tahun 2030 terdapat sejumlah 8,2 juta penyandang diabetes di daerah urban dan 5,5 juta di daerah rural (Aditama, 2011).

Terapi menggunakan sel punca menjadi alternatif yang sudah banyak dicoba, Armand dan tim pada tahun 2012 melakukan penelitian pada tikus diabetes mellitus, kesimpulan penelitian tersebut adalah transplantasi sel pankreas secara intraperitoneal memberikan respon perbaikan sel beta pankreas lebih baik daripada pemberian sel punca mesenkimal secara intraperitoneal dan insulin secara subkutaneus (Armand, et al., 2012). Sel punca mesenkimal yang berasal dari sumsum tulang belakang memiliki karakteristik multipoten, dan lebih baik dalam memproduksi sel punca lain dengan teknik induksi (induced pluripotent stemcells/ iPS) (Yamanaka, 2012).

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus wistar yang dibuat mengalami diabetes mellitus untuk membandingkan hasil transplantasi sel pankreas yang berasal dari sumsum tulang sel punca autologous, allogenic, dan xenotransplant dari jenis hewan coba lain. Hasil pemberian stemcell tersebut akan dinilai berdasar kadar glukosa darah, c-peptide, dan kadar insulin. Semua nilai tersebut akan dibandingkan antara sebelum dan sesudah, dan antara jenis transplant.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana hasil transplantasi sel pankreas yang berasal dari sumsum tulang sel punca autologous, allogenic, dan xenotransplant dari spesies hewan coba lain, pada tikus wistar yang diabetes mellitus?

1.2.Urgensi Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan referensi penggunaan sel punca yang efektif untuk terapi diabetes mellitus, dimana sel punca tersebut sudah dijadikan sel pankreas sehingga harapannya tepat sasaran untuk diberikan pada pasien yang mengalami kerusakan pankreas akibat diabetes mellitus. Perbandingan hasil pemberian sel punca secara autologous, allogenic, maupun xenotransplant diharapkan akan memberikan referensi alternatif terbaik untuk mengembangkan sel punca dari beberapa sumber (pasien, donor satu spesies, maupun donor spesies lain).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Definisi Diabetes

Definisi diabetes menurut WHO, (1999) adalah suatu kelainan metabolik dengan banyak etiologi yang ditandai dengan hiperglikemia kronis disertai gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein sebagai akibat dari defek sekresi dan atau respon stimulasi insulin. Diabetes Mellitus tipe 2 (DMT2) merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan penurunan respon jaringan terhadap stimulasi insulin, atau sering diistilahkan dengan resistensi insulin. Resistensi insulin ditemukan pada jaringan otot, hati dan adiposa. Jaringan tersebut menyumbang ambilan glukosa terbesar tubuh. Gangguan ambilan glukosa otot, hati dan adiposa menyebabkan "sindroma kelaparan semu" dan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia).

Kadar glukosa darah merupakan acuan diagnosis dan terapi diabetes. Prosedur pengukuran kadar glukosa darah dibedakan menjadi pengukuran kadar glukosa darah sewaktu dan pengukuran kadar glukosa darah berurutan waktu (*time series*). Kadar glukosa darah sewaktu, ditentukan dari pemeriksaan sampel yang diambil sewaktu. Contoh pengukuran kadar glukosa darah sewaktu adalah kadar glukosa darah puasa dan kadar glukosa darah acak. Kadar glukosa darah berurutan waktu diukur dari pemeriksaan sampel yang diambil pada beberapa kurun waktu, misalnya: kadar glukosa darah sebelum makan dan kadar glukosa darah 2 jam setelah makan (WHO, 1999).

Makna hasil pengukuran sewaktu berbeda dengan makna hasil pengukuran berurutan waktu. Kadar glukosa yang diukur sewaktu bertujuan untuk mengevaluasi ambilan glukosa pada kondisi basal. Ambilan glukosa basal adalah ambilan glukosa pada saat tubuh tidak mendapatkan beban glukosa, stimulasi insulin dan atau otot melakukan kontraksi. Pemeriksaan ambilan glukosa basal paling ideal dilakukan dari sampel darah yang diambil setelah puasa \pm 8 jam (Yamazaki, 2009). Ambilan glukosa basal difasilitasi oleh Glut1 yang terekspresi hampir di seluruh jaringan tubuh. Fasilitasi Glut1 tidak dipengaruhi oleh stimulasi insulin. Penurunan ekspresi Glut1 ditemukan pada otot penderita diabetes yang mengalami hiperglikemia basal (Ciaraldi, 2005).

Kadar glukosa darah yang diukur berurutan waktu bertujuan untuk mengevaluasi intoleransi glukosa (IGT) pada saat tubuh mendapat masukan beban glukosa (2 jam setelah makan). Pemeriksaan berurutan waktu yang ideal dilakukan melalui prosedur tes

toleransi glukosa (TTG). Metode yang dikembangkan untuk TTG beragam, glukosa ada yang dimasukkan lewat oral, injeksi intravena atau intra peritoneal. Pada manusia, masukan glukosa TTG diberikan melalui oral, sehingga dibutuhkan waktu 2 jam untuk mengevaluasi efek dari masukan glukosa tersebut. Waktu 2 jam adalah waktu rerata yang diasumsikan sebagai waktu absorpsi glukosa ditambah waktu yang dibutuhkan insulin untuk meregulasi ambilan glukosa melalui fasilitasi Glut4. Peningkatan kadar glukosa dari kondisi basal sampai dengan 2 jam setelah pembebanan glukosa menunjukkan tubuh mengalami intoleransi glukosa akibat resistensi insulin (WHO, 1999; Yamazaki, 2009).

Resistensi insulin pada percobaan dapat diamati melalui prosedur “*euglycaemic insulin clamping*” dan “*hyperglycaemic insulin clamping*”. Prinsip dari prosedur ini adalah mengevaluasi efek stimulasi injeksi insulin pada pembebanan glukosa yang dimasukkan ke dalam tubuh. Resistensi ditunjukkan bila penurunan kadar glukosa terjadi pada stimulasi insulin dalam jumlah yang lebih besar. Penentuan resistensi insulin pada praktek klinis ditentukan secara tidak langsung menggunakan bantuan persamaan yang ditemukan melalui penelitian korelasional. Salah satu persamaan yang sering digunakan adalah persamaan HOMA yang membutuhkan pengukuran variabel kadar glukosa puasa dan insulin puasa (WHO, 1999; Yamazaki, 2009)

2.2. Patofisiologi Diabetes

Resistensi insulin pada penderita diabetes tipe 2 disebabkan oleh banyak faktor, yang dapat dibagi menjadi 3 bagian: faktor pra reseptor insulin, reseptor insulin dan faktor post reseptor insulin. Kelainan atau defek pada insulin yang dihasilkan oleh beta pankreas menyebabkan insulin gagal menstimulasi reseptornya pada membran sel. Salah satu gangguan pada reseptor insulin terjadi pada fenomena *caping* dari HLA kelas II yang menghambat stimulasi insulin pada reseptornya di membran sel (WHO, 1999; Yamazaki, 2009).

Gangguan aktifitas protein yang terlibat dalam sinyal transduksi insulin merupakan penyebab utama faktor post reseptor insulin. *Insulin receptor substrat1* (IRS-1) dan Akt sering ditemukan inaktif pada penderita diabetes. IRS-1 dan Akt yang inaktif dapat disebabkan oleh fosforilasi residu serine atau defosforilasi residu tyrosine. Fosforilasi residu serine ditemukan pada aktifitas protein *c-Jun- N- terminal kinase*

(JNK), sedangkan defosforilasi residu tyrosine sering dijumpai pada aktifitas kelompok fosfatase (PP2A dan PTP1B). Model resistensi insulin post reseptor dapat dievaluasi melalui tikus yang diinjeksi streptozotocin (13 mg/100g berat badan yang dilarutkan pada 0,4 ml larutan NaCl 0,9% ditambah 50 mM asam sitrat hingga mencapai pH 4,5) melalui intravena (Odedra, 1982)

Stimulasi insulin pada sel otot, lipid dan hati dibutuhkan untuk kebutuhan ambilan glukosa *post absorptive*, penyediaan dan cadangan energi, sintesis protein dan respon akut terhadap stress retikulum endoplasmik (ER). Resistensi insulin di awal perjalanan DMT2 hanya mengganggu ambilan glukosa dan mengurangi ketersediaan energi intrasel. Keburhan glukosa dan energi intrasel dikompensasi dengan hipertrofi beta pankreas dan sekresi insulin yang tinggi. Progresifitas diabetes ditandai dengan gangguan inisiasi translasi protein akibat kurangnya GTP dan faktor inisiasi translasi (eIF2 dan eIF4) yang tidak aktif. Pada fase ini beta pankreas mulai mengalami dekompensasi sehingga sekresi insulin secara bertahap menurun (Wang, 2002).

Fase akhir dari DMT2 ditandai dengan gangguan translasi protein global yang disebut dengan stres ER. Respon akut terhadap stres ER adalah mengaktifkan jalur translasi darurat yang diinisiasi oleh *activating transcription factor 4* (ATF4). Sayangnya aktifitas ATF4 sangat bergantung pada stimulasi insulin dan di sisi lain sekresi insulin sudah mulai menurun. Bila stimulasi insulin tidak ditambah, maka aktifitas ATF4 dalam menginisiasi sintesis protein darurat tidak akan berhasil. Resistensi insulin akan membunuh sel diabetes satu per satu secara bertahap (Adams, 2007; Seo, 2009).

2.2. Sel Punca

Sel punca merupakan sel yang belum berdiferensiasi dan mempunyai potensi yang sangat tinggi untuk berkembang menjadi banyak jenis sel yang berbeda di dalam tubuh. Sel punca juga berfungsi sebagai sistem perbaikan untuk mengganti sel-sel tubuh yang telah rusak demi kelangsungan hidup organisme. Saat sel punca terbelah, sel yang baru mempunyai potensi untuk tetap menjadi sel punca atau menjadi sel dari jenis lain dengan fungsi yang lebih khusus, misalnya sel otot, sel darah merah atau sel otak (Tada et al., 2001; Cowan et al., 2005).

Sel punca memiliki dua sifat penting yang sangat berbeda dengan sel yang lain:

- Sel punca belum merupakan sel dengan spesialisasi fungsi tetapi dapat memperbaharui diri dengan pembelahan sel bahkan setelah tidak aktif dalam waktu yang panjang.
- Dalam situasi tertentu, sel punca dapat diinduksi untuk menjadi sel dengan fungsi tertentu seperti sel jaringan maupun sel organ yang mempunyai tugas tersendiri. Pada sumsum tulang dan tali pusar (*umbilical cord blood*), sel punca secara teratur membelah dan memperbaiki jaringan yang rusak, meski demikian pada organ lain seperti pankreas atau hati, pembelahan hanya terjadi dalam kondisi tertentu.

Berdasarkan potensi

- Sel induk ber-totipotensi (*toti*=total) adalah sel induk yang memiliki potensi untuk berdiferensiasi menjadi semua jenis sel, yaitu sel ekstraembrionik, sel somatik, dan sel seksual. Jenis sel ini dapat bertumbuh menjadi organisme baru bila diberikan dukungan maternal yang memadai. Sel induk bertotipotensi diperoleh dari sel induk embrio, hasil pembuahan sel telur oleh sel sperma.
- Sel induk ber-pluripotensi (*pluri*=jamak) adalah sel-sel yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh, namun tidak dapat membentuk suatu organisme baru.
- Sel induk ber-multipotensi adalah sel-sel yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dewasa.
- Sel induk ber-unipotensi (*uni*=tunggal) adalah sel induk yang hanya dapat menghasilkan satu jenis sel tertentu, tetapi memiliki kemampuan memperbarui diri yang tidak dimiliki oleh sel yang bukan sel induk.

Berdasarkan asalnya

Sel punca embrio (*embryonic stem cells*)

Sel induk ini diambil dari embrio pada fase blastosit (5-7 hari setelah pembuahan). Massa sel bagian dalam mengelompok dan mengandung sel-sel induk embrionik. Sel-sel diisolasi dari massa sel bagian dalam dan dikultur secara *in vitro*. Sel induk embrional dapat

diarahkan menjadi semua jenis sel yang dijumpai pada organisme dewasa, seperti sel-sel darah, sel-sel otot, sel-sel hati, sel-sel ginjal, dan sel-sel lainnya.

Sel germinal/benih embrionik (*embryonic germ cells*)

Sel germinal/benih (seperti sperma/ovum) embrionik induk/primordial (*primordial germ cells*) dan prekursor sel germinal diploid ada sesaat pada embrio sebelum mereka terasosiasi dengan sel somatik gonad dan kemudian menjadi sel germinal. Sel germinal embrionik manusia/*human embryonic germ cells* (hEGCs) termasuk sel punca yang berasal dari sel germinal primordial dari janin berumur 5-9 minggu. Sel punca jenis ini memiliki sifat pluripotensi.

Sel punca fetal

Sel punca fetal adalah sel primitif yang dapat ditemukan pada organ-organ fetus (janin) seperti sel punca hematopoietik fetal dan progenitor kelenjar pankreas. Sel punca neural fetal yang ditemukan pada otak janin menunjukkan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel neuron dan sel glial (sel-sel pendukung pada sistem saraf pusat). Darah, plasenta, dan tali pusat janin kaya akan sel punca hematopoietik fetal.

Sel punca dewasa (*adult stem cells*)

Sel punca dewasa mempunyai dua karakteristik. Karakteristik pertama adalah sel-sel tersebut dapat berproliferasi untuk periode yang panjang untuk memperbarui diri. Karakteristik kedua, sel-sel tersebut dapat berdiferensiasi untuk menghasilkan sel-sel khusus yang mempunyai karakteristik morfologi dan fungsi yang spesial.

Sel induk hematopoietik

Salah satu macam sel induk dewasa adalah sel induk hematopoietik (*hematopoietic stem cells*), yaitu sel induk pembentuk darah yang mampu membentuk sel darah merah, sel darah putih, dan keping darah yang sehat. Sumber sel induk hematopoietik adalah sumsum tulang, darah tepi, dan darah tali pusat. Pembentukan sel induk hematopoietik terjadi pada tahap awal embriogenesis, yaitu dari mesoderm dan disimpan pada situs-situs spesifik di dalam embrio.

Sel punca mesenkimal

Sel induk mesenkimal/ *mesenchymal stem cells* (MSC) dapat ditemukan pada stroma sumsum tulang belakang, periosteum, lemak, dan kulit. MSC termasuk sel induk multipotensi yang dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel tulang, otot, ligamen, tendon, dan lemak. Namun ada beberapa bukti yang menyatakan bahwa sebagian MSC bersifat pluripotensi sehingga tidak hanya dapat berubah menjadi jaringan mesodermal tetapi juga endodermal.

Transplantasi sel induk dapat berupa:

- *Transplantasi autologus* (menggunakan sel induk pasien sendiri, yang dikumpulkan sebelum pemberian kemoterapi dosis tinggi)
- *Transplantasi alogenis* (menggunakan sel induk dari donor yang cocok, baik dengan hubungan keluarga atau tanpa hubungan keluarga), atau
- *transplantasi singenis* (menggunakan sel induk dari saudara kembar identik).

Jenis-jenis transplantasi sel punca

Menurut sumbernya transplantasi sel induk dapat dibagi menjadi:

Transplantasi sel punca dari sumsum tulang (*bone marrow transplantation*)

Sumsum tulang adalah jaringan spons yang terdapat dalam tulang-tulang besar seperti tulang pinggang, tulang dada, tulang punggung, dan tulang rusuk.

Sumsum tulang merupakan sumber yang kaya akan sel induk hematopoietik. Sejak dilakukan pertama kali kira-kira 30 tahun yang lalu, transplantasi sumsum tulang digunakan sebagai bagian dari pengobatan leukemia, limfoma jenis tertentu, dan anemia aplastik. Karena teknik dan angka keberhasilannya semakin meningkat, maka pemakaian transplantasi sumsum tulang sekarang ini semakin meluas.

Pada transplantasi ini prosedur yang dilakukan cukup sederhana, yaitu biasanya dalam keadaan teranestesi total. Sumsum tulang (sekitar 600 cc) diambil dari tulang panggul donor dengan bantuan sebuah jarum suntik khusus, kemudian sumsum tulang itu

disuntikkan ke dalam vena resipien. Sumsum tulang donor berpindah dan menyatu di dalam tulang resipien dan sel-selnya mulai berproliferasi.

Pada akhirnya, jika semua berjalan lancar, seluruh sumsum tulang resipien akan tergantikan dengan sumsum tulang yang baru. Namun, prosedur transplantasi sumsum tulang memiliki kelemahan karena sel darah putih resipien telah dihancurkan oleh terapi radiasi dan kemoterapi. Sumsum tulang yang baru memerlukan waktu sekitar 2-3 minggu untuk menghasilkan sejumlah sel darah putih yang diperlukan guna melindungi resipien terhadap infeksi. Transplantasi sumsum tulang memerlukan kecocokan HLA 6/6 atau paling tidak 5/6.

Risiko lainnya adalah timbulnya penyakit GvHD, di mana sumsum tulang yang baru menghasilkan sel-sel aktif yang secara imunologi menyerang sel-sel resipien. Selain itu, risiko kontaminasi virus lebih tinggi dan prosedur pencarian donor yang memakan waktu lama.

Transplantasi sel punca darah tepi (*peripheral blood stem cell transplantation*)

Seperti halnya sumsum tulang, peredaran darah tepi merupakan sumber sel induk walaupun jumlah sel induk yang dikandung tidak sebanyak pada sumsum tulang. Untuk mendapatkan jumlah sel induk yang jumlahnya mencukupi untuk suatu transplantasi, biasanya pada donor diberikan *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) untuk menstimulasi sel induk hematopoietik bergerak dari sumsum tulang ke peredaran darah.

Transplantasi ini dilakukan dengan proses yang disebut *aferesis*. Jika resipien membutuhkan sel induk hematopoietik, pada proses ini darah lengkap diambil dari donor dan sebuah mesin akan memisahkan darah menjadi komponen-komponennya, secara selektif memisahkan sel induk dan mengembalikan sisa darah ke donor.

Transplantasi sel induk darah tepi pertama kali berhasil dilakukan pada tahun 1986. Keuntungan transplantasi sel induk darah tepi adalah lebih mudah didapat. Selain itu, pengambilan sel induk darah tepi tidak menyakitkan dan hanya perlu sekitar 100 cc. Keuntungan lain, sel induk darah tepi lebih mudah tumbuh. Namun, sel induk darah tepi lebih rentan, tidak setahan sumsum tulang. Sumsum tulang juga lebih lengkap, selain

mengandung sel induk juga ada jaringan penunjang untuk pertumbuhan sel. Karena itu, transplantasi sel induk darah tepi tetap perlu dicampur dengan sumsum tulang.

Transplantasi sel induk darah tali pusat

Pada tahun 1970-an, para peneliti menemukan bahwa darah plasenta manusia mengandung sel induk yang sama dengan sel induk yang ditemukan dalam sumsum tulang. Karena sel induk dari sumsum tulang telah berhasil mengobati pasien-pasien dengan penyakit- penyakit kelainan darah yang mengancam jiwa seperti leukemia dan gangguan-gangguan sistem kekebalan tubuh, maka para peneliti percaya bahwa mereka juga dapat menggunakan sel induk dari darah tali pusat untuk menyelamatkan jiwa pasien mereka.

Darah tali pusat mengandung sejumlah sel induk yang bermakna dan memiliki keunggulan di atas transplantasi sel induk dari sumsum tulang atau dari darah tepi bagi pasien-pasien tertentu. Transplantasi sel induk dari darah tali pusat telah mengubah bahan sisa dari proses kelahiran menjadi sebuah sumber yang dapat menyelamatkan jiwa.

Transplantasi sel induk darah tali pusat pertama kali dilakukan di Perancis pada penderita anemia Fanconi tahun 1988. Pada tahun 1991, darah tali pusat ditransplantasikan pada penderita Chronic Myelogenous Leukemia. Kedua transplantasi ini berhasil dengan baik. Sampai saat ini telah dilakukan kira-kira 3.000 transplantasi darah tali pusat.

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian pada tahun ke-1 bertujuan untuk mengeksplorasi kualitas dan kuantitas sel punca pada tikus wistar yang diinduksi diabetes menggunakan streptozotocin

1. menginduksi tikus wistar menjadi model diabetes menggunakan streptozotocin
2. mengkarakterisasi tikus wistar setelah diinduksi diabetes sesuai dengan kriteria model diabetes
3. Mengeskplorasi kulaitas dan kuantitas sel punca tikus model diabetes

3.2 Manfaat Penelitian

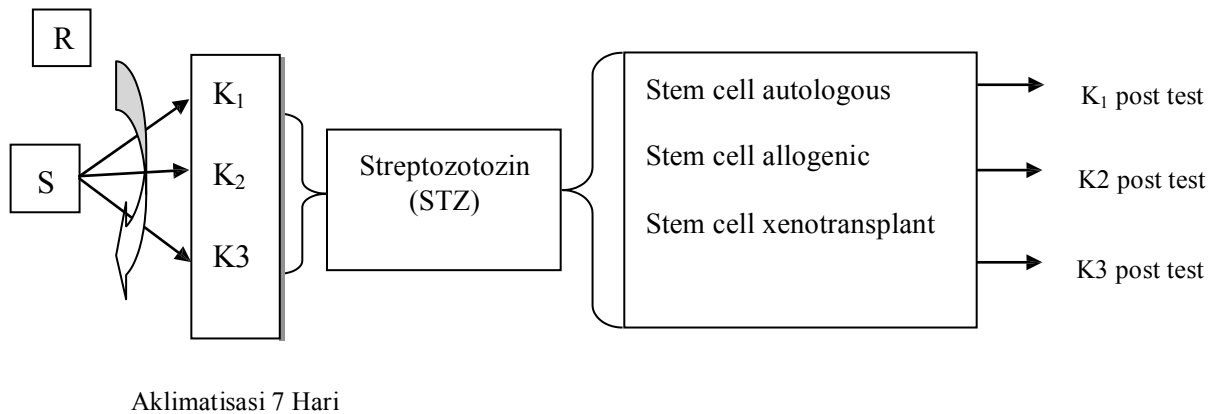
Penelitian ini diharapkan menjadi dasar terapi transplantasi sel punca auto, allo dan xenotranplan

1. memperoleh data awal karakteristik sel punca pada model diabetes
2. menentukan terapi sel punca terbaik untuk kasus diabetes

BAB 4 METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris *in vivo* dengan menggunakan rancangan pre post control design (*pre post control group design*).



Gambar 4.1 Bagan rancangan penelitian *randomized posttest control group design*

Keterangan :

- K₁ : Kelompok perlakuan 1
- K₂ : Kelompok perlakuan 2
- K₃ : Kelompok perlakuan 3

3.2 Variabel Penelitian

Klasifikasi variabel penelitian :

1. Variabel bebas (independent)
Stem cell transplant
2. Variabel tergantung (dependent)
Kadar glukosa darah, c-peptide, insulin
3. Variabel moderator
Berat badan Hewan Coba
4. Variabel Kendali

Kesehatan fisik hewan coba, Pemeliharaan dan perawatan hewan coba, Cara pemberian ekstrak lewat sonde, sanitasi terpelihara, air minum (yang diberikan secara *ad libitum*), dosis dan waktu pemberian.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan penelitian

1. Hewan coba adalah *Rattus norvegicus* strain *Wistar* dengan jenis kelamin jantan, umur 3 bulan dengan berat badan 180-200 gram.
2. Kelinci
3. Stem cell
4. Pakan tikus dan aqua, serta sekam untuk alas tidur
5. Ketamin HCl untuk anastesi
6. Preparat
7. Kit untuk pemeriksaan glukosa darah, c-peptide, insulin, dan ekspresi nestin

3.3.2 Alat-alat penelitian

3.3.2.1 Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba

1. Kandang plastik propilen ukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm yang ditutup dengan kawat kasa dengan ukuran 6 mm
2. Botol minum
3. Tempat makan dari aluminium
4. Sekam
5. Alat suntik (*syringe*) 1 cc yang ujungnya dimodifikasi
6. Timbangan untuk menimbang berat badan tikus
7. Alat suntik 5 cc untuk mengambil darah
8. Microtom

3.4 Prosedur Penelitian.

Penelitian dibagi atas dua tahap yaitu pembuatan sel punca serta tahap pelaksanaan uji transplan sel punca terhadap hewan coba.

3.4.1 Pembuatan sel punca autologous

Sel punca mesenkimal diambil dari sumsum tulang belakang tikus 1 dengan cara aspirasi dan diseparasi dengan Histopaque-1.077 (Sigma). Sel yang dipanen kemudian dikultur di

medium RPMI dan insulin transferin selenium medium (ITS) mengandung glukosa 1.0g/L. Karakterisasi sel punca mesenkimal dianalisis berdasar ekspresi CD44+ dan CD105+ menggunakan pewarnaan imunohistokimia DAB dan FACS (Armand et al., 2012).

3.4.2 Pembuatan sel punca allogenic

Sel punca mesenkimal diambil dari sumsum tulang belakang tikus 2 dengan cara aspirasi dan diseparasi dengan Histopaque-1.077 (Sigma). Sel yang dipanen kemudian dikultur di medium RPMI dan insulin transferin selenium medium (ITS) mengandung glukosa 1.0g/L. Karakterisasi sel punca mesenkimal dianalisis berdasar ekspresi CD44+ dan CD105+ menggunakan pewarnaan imunohistokimia DAB dan FACS (Armand et al., 2012).

3.4.3 Pembuatan sel punca xenotransplant

Sel punca mesenkimal diambil dari sumsum tulang belakang kelinci dengan cara aspirasi dan diseparasi dengan Histopaque-1.077 (Sigma). Sel yang dipanen kemudian dikultur di medium RPMI dan insulin transferin selenium medium (ITS) mengandung glukosa 1.0g/L. Karakterisasi sel punca mesenkimal dianalisis berdasar ekspresi CD44+ dan CD105+ menggunakan pewarnaan imunohistokimia DAB dan FACS (Armand et al., 2012).

3.4.4 Membuat tikus diabetes mellitus

Tikus wistar di Injeksi STZ 50 mg/kg BB i.p. dosis tunggal selama 14 hari sehingga didapatkan kadar glukosa darah yang meningkat.

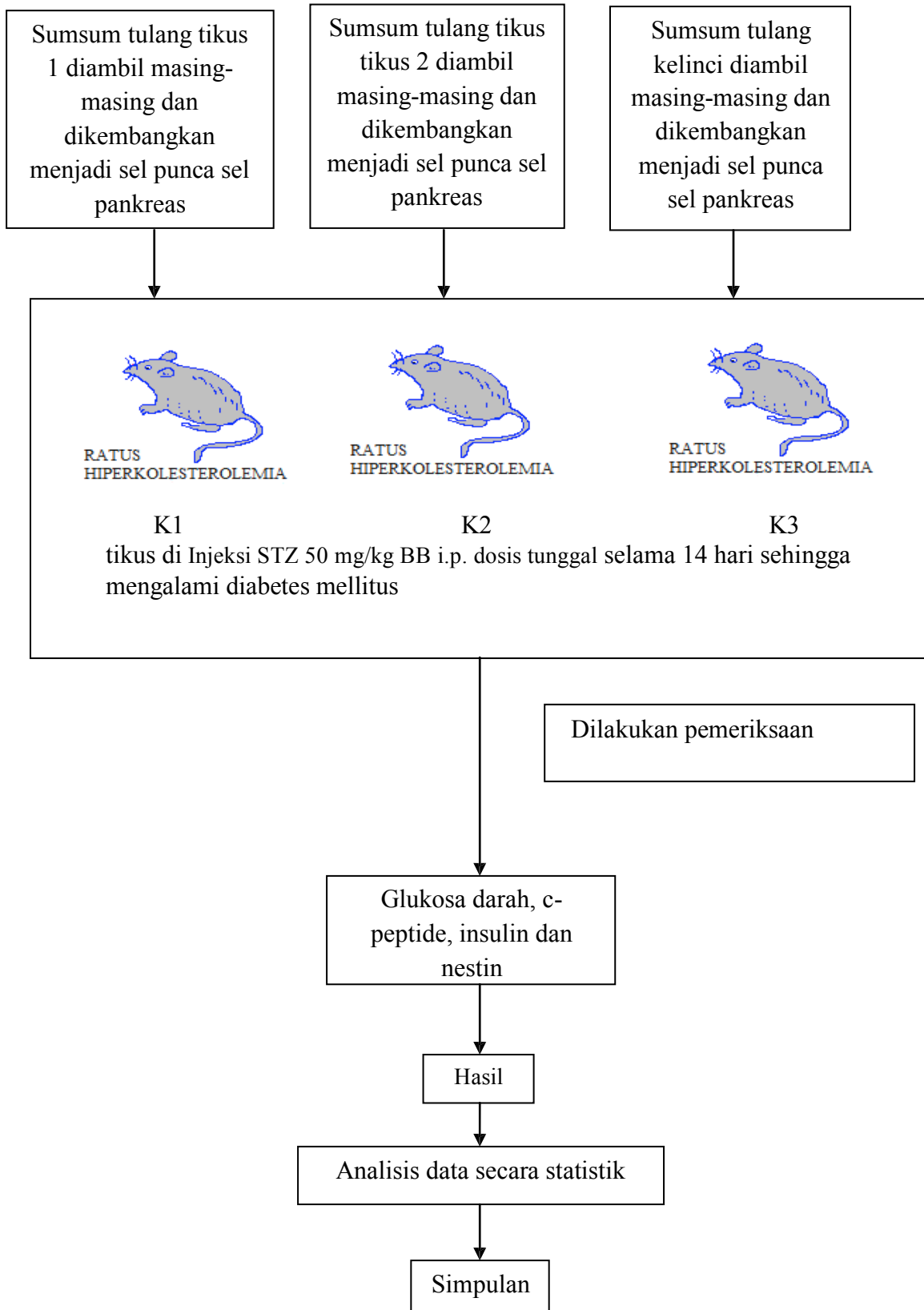
3.4.5 Perlakuan

Sel punca sebanyak 200.000 sel masing-masing diberikan secara intraperitoneal.

3.5 Pemeriksaan Laboratorium

Pada akhir perlakuan (akhir minggu ke-4), hewan coba kelompok (K₁, K₂, K₃) ditimbang berat badannya awal dan akhir, diambil darahnya untuk diperiksa kadar glukosa darah, c-peptide, dan insulin. Kadar glukosa darah diukur dengan stik Nesco multichcek. C-peptide dan insulin diukur menggunakan ELISA, dan ekspresi nestin diukur dengan teknik imunohistokimia.

DIAGRAM ALIR PENELITIAN

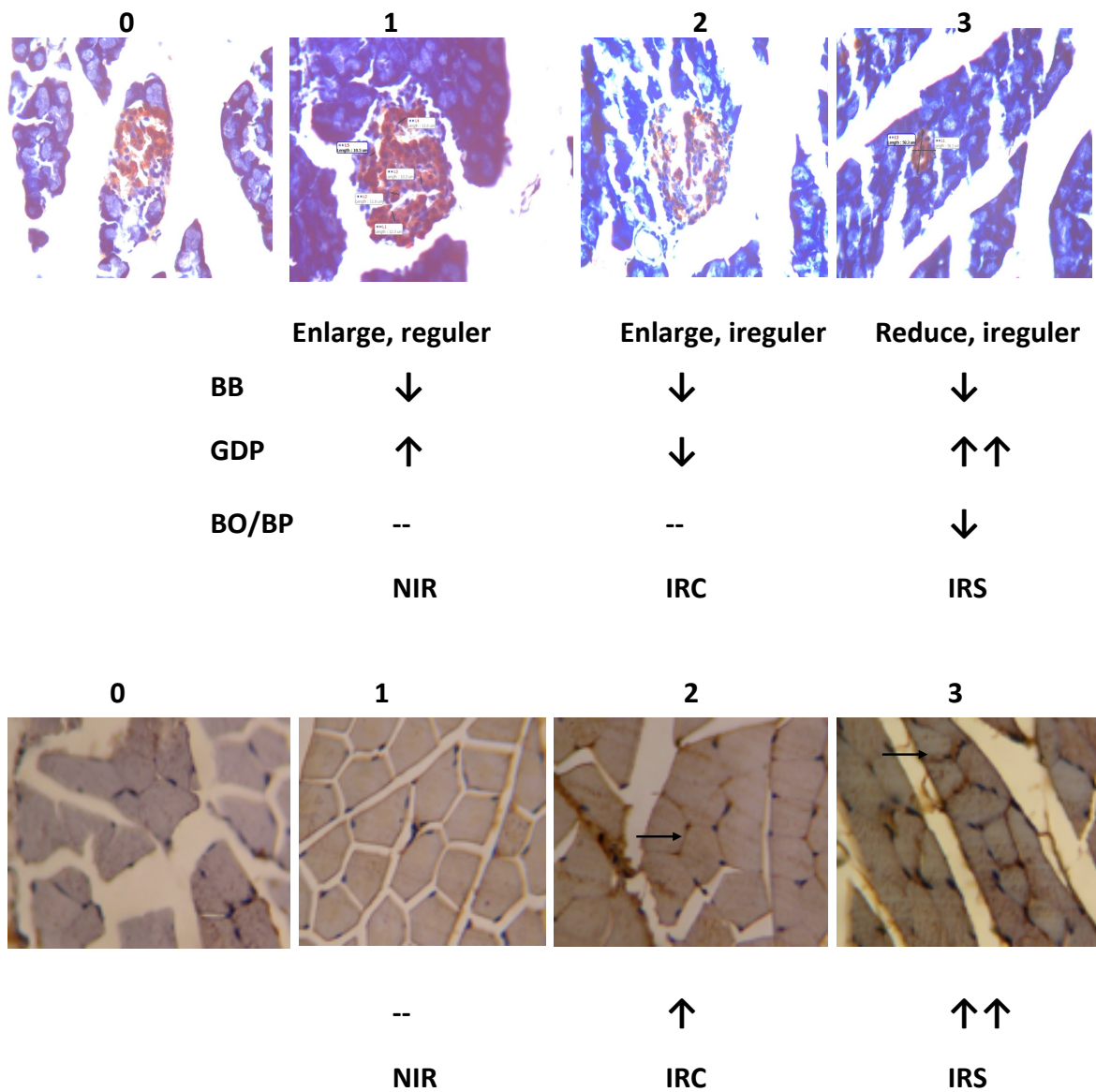


BAB 5

HASIL dan LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Model diabetes

Injeksi streptozotocin 50 mg/ kg BB ip menghasilkan model tikus diabetes yang mirip dengan model tikus transgenik diabetes yang menjadi standar WHO. Pada setiap tahapan meliputi NIR, IRC dan IRS ditemukan kemiripan baik dari perubahan pola kadar glukosa darah, berat pankreas, populasi sel beta pankreas, berat otot dan ekspresi Glut-1 otot. Dengan demikian, model tikus diabetes yang diperoleh dari injeksi stz dapat dipakai pada perlakuan berikutnya



Gambar 5.1 Perubahan karakteristik pankreas dan otot setelah tikus diinjeksi streptozotocin 50 mg/kgBB i.p

Tabel 5.1 Perubahan karakteristik setelah tikus diinjeksi stz 50 mg/kgBB

Perubahan variabel	Perubahan hari ke-		
	0→1	1→2	2→3
berat badan	↓	↓	-
berat pankreas	-	-	↓
berat otot	-	-	↓
GDP	↑	↓	↑
Ekspresi Glut1	-	↑	-
Ukuran sel beta pancreas	↑	-	↓
Respon survival	Reversibel		Irreversibel
Windows periods			

5.2 Kuantitas Stem Cell

Karakterisasi kuantitas SC pada model tikus diabetes yang diinjeksi stz diperoleh hasil berikut. Populasi SC mengalami penurunan jumlah secara bermakna ($p = 0.00001$). Populasi SC turun sampai lebih dari 50% dari kondisi awal. Dengan demikian, terapi SC autologus sulit diwujudkan

Group Statistics

	kel	N	Mean	Std. Deviation	p
SC	diabetes	8	6.2438 ^a	.59467	0.0001
	normal	13	11.0492 ^b	2.12458	

BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Tahapan penelitian yang direncanakan akan dilakukan tahun berikutnya meliputi

1. uji coba terapi allogenic SC
2. uji coba terapi xenotransplant SC

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. injeksi streptozotocin dapat digunakan sebagai pemodelan diabetes pada tikus
2. model tikus diabetes mengalami penurunan kuantitas SC, sehingga potensi terapi SC autologus sulit diwujudkan

7.2 Saran

1. melanjutkan ke terapi SC allogenic
2. melanjutkan ke terapi SC xenotransplant

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, 2007. Role of the transcription factor atf4 in the anabolic action of insulin & the anti-anabolic action of glucocorticoid. *Biological Chemistry* 292:2
- ADA, 2004. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27: Supplement S5-S10
- Barros LP, Young MT, Saklatvala J and Baldwin SA, 1997. Evidence of two mechanisms for the activation of the glucose transporter GLUT1 by anisomycin: p38(MAP kinase) activation and protein synthesis inhibition in mammalian cells. *Journal of Physiology* 504.3, pp.517-525
- Blodgett *et al.*, 2007. Structural Basis of Glut1 inhibition by cytoplasmic ATP. *J Gen Physiol.* 130: 2
- Brown, Gagliardini, and Ramaiya, 2009. Studies on the economic and social impact of diabetes in low and middle income countries. IDF Congress. Canada.
- Ciaraldi *et. al*, 2005. Skeletal muscle Glut1 transporter protein expression and basal leg glucose uptake are reduced in type 2 diabetes. *JCEM* 90:352-358
- Chambers *et. al*, 2009. Stretch stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by ros & p38 MAPK. *J.Physiol* 587:13
- Heled *et. al* 2005. Physical exercise increases the expression of TNF α and GLUT 1 in muscle tissue of diabetes prone *Psammomys obesus*. [Life Sciences Volume 77, Issue 23](#). Pages 2977-2985
- IDF. 2006. Cost Effective Approaches to Diabetes Care and Prevention
- Koivisto *et. al*, 1991. Differential regulation of the glut1 and glut4 glucose transport by glucose and insulin in 16 muscle cells in culture. *J of Biological Chemistry.* 266:4.pp 2615-2621.
- Koopmanschap, 2002. Coping with Type II diabetes: the patient's perspective. *Diabetologia.* 45:S18-S22
- Kuzuya T *et al.*, Committee of the japan diabetes society on the diagnosis criteria of diabetes mellitus. Report of the committee on the classification and diagnosis criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 55: 65-85
- Marshall *et. al*, 1999. Glut1 or Glut4 transgenes in obese mice improve glucose tolerance but do not prevent insulin resistant. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276 E390-400
- Odedra *et. al.*, 1982. Muscle protein synthesis in streptozotocin-diabetic rat. *Biochem J.* 202: 363-368.
- Seo *et. al*, 2009 atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, & energy expenditure. *Diabetes* 58: 2565_2573
- Wang *et al*, 2002 Evidence that the dephosphorylation of ser 535 in the ϵ -sub unit of eukaryotic initiation factor (eIF) 2B is insufficient for the activation of eIF2B by insulin. *Biochem J* 367: 475-481
- WHO, 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its

complication. Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of WHO consultation. Dept of noncommunicable disease surveillance. Geneva

