

**PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL
STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI P50/P65 DAN IL-6
TIKUS MODEL HIPERPIGMENTASI
(Studi Eksperimental In Vivo Tikus Galur Wistar Model
Hiperpigmentasi yang Dipapar Sinar UV-B)**

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S2



Disusun Oleh:
Yunita Ika Mayasari
(MBK 2015010189)

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

**PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS
TERHADAP EKSPRESI P50/P65 DAN IL-6 TIKUS MODEL
HIPERPIGMENTASI
(Studi Eksperimental In Vivo Tikus Galur Wistar Model Hiperpigmentasi
yang Dipapar Sinar UV-B)**


Disusun oleh :
Yunita Ika Mayasari
(MBK 2015010189)


akan dipertahankan didepan Tim Penguji
Pada tanggal 24 Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II


Pror. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK(K)

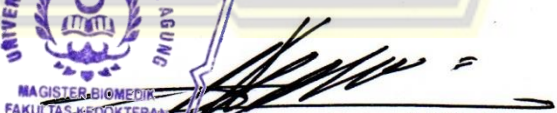

Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med

NIK. 210 199 050

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung




dr. Agung Putra, M.Si. Med

NIK. 210 199 050

PERNYATAAN

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

Semarang, Februari 2022



(Yunita Ika Mayasari)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Yunita Ika Mayasari
Tempat, tanggal lahir : Semarang , 08 Mei 1986
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Sumberejo 01 : lulus tahun 1998
2. SLTP N 02 Kendal : lulus tahun 2001
3. SLTA 01 Kendal : lulus tahun 2004
4. FK UNISSULA : lulus tahun 2010
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019 – sekarang)

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2010 - 2017 : Klinik Utama Rawat Inap Assalamah
2. Tahun 2017-Sekarang : Amiza Natural Skincare

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Sutiyono
Ibu : Senik suprihati
2. Nama Suami : Isharyadi
3. Nama Anak : 1. Aisyah Dzakiyyah Isharyadi
2. Ghazi Ahmad isharyadi

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan atas berkat-Nya, sehingga tesis dengan judul, **“PENGARUH SECRETOM HIPOKSIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI P50/P65 DAN IL-6 TIKUS MODEL HIPERPIGMENTASI”**. (Studi In Vivo Pada Tikus Galur Wistar Model Hiperpigmentasi Yang Dipapar Sinar UVB) ini dapat terselesaikan. Proposal tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam- dalamnya kepada:

1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Masgister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Pembimbing II yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
3. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.KK(K) selaku dosen pembimbing I yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya proposal tesis ini.
4. DR.Ir. Titiek Sumarawati, M Kes; Dr. Dra Atina Husaana; Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen penguji I, II dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.

5. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
6. Suami tercinta dr.Isharyadi SpOG yang selalu mensupport. Terimakasih untuk selalu ada dan mendukung disaat saya butuhkan. Serta anak kebanggaan umi: Aisyah Dzakiyyah dan Ghozi ahmad; karena dukungan kalian lah, umimu bisa berjuang sejauh ini... Semoga kelak kalian bisa meraih cita- cita lebih dari yang Umi sudah capai saat ini.
7. Seluruh keluarga besar Klinik Utama rawat Inap Assalamah dan Amiza Natural Skincare yang selalu menyemangati dan selalu memberikan izin tiap kali bimbingan ke semarang... Terimakasih atas dukungan kalian.
8. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran Unissula: Devi, Dina, Ariq, Ardi, Chandra, Ifan, Dayat, Santi, dan Nurul, dan Topik, kalian sudah seperti keluarga kedua saya... Terimakasih anak- anak asuh, akhirnya saya bisa mengakhiri pertandingan ini dengan baik berkat kalian.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

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

Semarang, Februari 2022

Yunita Ika Mayasari



ABSTRAK

PENGARUH SECRETOM HIPOKSIDIA MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP EKSPRESI P50/P65 DAN IL-6 TIKUS MODEL HIPERPIGMENTASI

Latar belakang: Radiasi UVB merupakan faktor utama penyebab hiperpigmentasi. Sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-HMSCs) mengandung *soluble molecule* bioaktif seperti *growth factor* dan sitokin anti-inflamasi yang mampu mencegah sintesis melanin dan menginduksi pembentukan kolagen. Hingga saat ini peran S-HMSCs terhadap ekspresi gen IL-6, p50, dan p65 pada pembentukan melanin hingga saat ini masih belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian S-HMSCs dalam bentuk sediaan gel terhadap ekspresi IL-6, p50, dan p65 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test control group design*. Kelompok Sham, kontrol positif, kontrol basis gel, S-HMSCs 100 μ L dan S-HMSCs 200 μ L masing-masing dipapar UVB selama 6 kali dalam 14 hari dengan 302 nm dengan MED 390 mJ/cm², sedangkan sham tidak menerima paparan UVB. Pada S-MSCs 100 μ L diberi gel S-MSCs 100 uL dan S-HMSCs 200 μ L diberi gel S-MSCs 200 uL setiap hari selama 14 hari, sedangkan kontrol basis gel menerima *base gel*. Pada hari ke 14 dilakukan terminasi dan dianalisis ekspresi IL-6, p50, dan p65 menggunakan qRT-PCR. Perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistika dengan *one way ANOVA* dengan uji beda perkelompok menggunakan *post hoc* LSD.

Hasil: Analisa ekspresi gen IL-6 (8.59 ± 3.32), p50 (4.35 ± 2.27), dan p65 (4.09 ± 1.82) pada kelompok perlakuan S-MSCs 200 μ L mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi S-MSCs dibandingkan dengan kelompok UVB.

Kesimpulan: Pemberian gel S-HMSCs berpengaruh secara bermakna terhadap kecepatan penurunan proses hiperpigmentasi.

Kata Kunci: IL-6, p50, dan p65, S-HMSCs, hiperpigmentasi

ABSTRACT

THE EFFECT OF HYPOXIC SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLS ON MITF AND TRP-1/2 EXPRESSION IN HYPERPIGMENTED RAT MODEL

Background: UVB radiation is the main factor causing hyperpigmentation. Secretome hypoxic mesenchymal stem cells (S-HMSCs) contain bioactive soluble molecules such as growth factors and anti-inflammatory cytokines that can prevent melanin synthesis and induce collagen formation. However, the role of S-HMSCs on MITF, TRP-1, and TRP-2 gene expression in melanin formation is still unclear. This study aimed to determine the effect of administration of S-HMSCs gel on the expression of IL-6, p50, and p65 in a hyperpigmented rat skin model induced by UVB light exposure.

Methods: Experimental research with post test control group. The UV-, UV+, UVG, UV100 and UV200 groups were exposed to UVB 6 times in 14 days at 302 nm with a MED of 390 mJ/cm², while UV- did not receive UVB exposure. UV100 was given 100 L of S-MSCs gel, and UV200 was given 200 L of S-MSCs gel every day for 14 days, while UVG received base gel. On the 14th day, IL-6, p50, and p65 were terminated and analyzed using qRT-PCR. Statistical analysis will perform using one way ANOVA followed with post hoc LSD test.

Results: Analysis of IL-6 (8.59± 3.32), p50 (4.35±2.27), and p65 (4.09±1.82) gene expression in the treatment group decreased along with the increase in the concentration of S-MSCs compared to the control group.

Conclusion: The administration of S-HMSCs gel is expected to affect the speed of decreasing the hyperpigmentation process significantly.

Keywords: IL-6, p50, and p65, S-HMSCs, hyperpigmentation

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
1.5. Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Sub unit p50/p65.....	9
2.1.1. Definisi.....	9
2.1.2. Peran sub unit p50/p65 pada Hiperpigmentasi.....	9
2.2. Interleukin-6 (IL-6)	12
2.2.1. Definisi.....	12
2.2.2. Peran IL-6 pada Hiperpigmentasi	12
2.3. Hiperpigmentasi	16
2.3.1. Definisi.....	16
2.3.2. Proses Hiperpigmentasi.....	16

2.4.	<i>Mesenchymal Stem Cells (MSCs)</i>	18
2.4.1.	Definisi.....	18
2.4.2.	Sumber MSCs	18
2.4.3.	Karakteristik MSCs.....	19
2.4.4.	Peran MSCs.....	19
2.5.	Hipoksia.....	20
2.6.	Sekretom <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	21
2.7.	Pengaruh S-MSCs terhadap ekspresi gen NF-kB dan IL-6 pada Hiperpigmentasi	21
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		24
3.1.	Kerangka Teori.....	24
3.2.	Kerangka Konsep	26
3.3.	Hipotesis.....	26
BAB IV METODE PENELITIAN		28
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	28
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	29
4.2.1.	Variabel Penelitian	29
4.2.2.	Defenisi Operasional.....	29
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	31
4.3.1.	Subyek Penelitian.....	31
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	32
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	32
4.3.4.	Besar Sampel.....	33
4.4.	Alat dan Bahan	33
4.4.1.	Alat.....	33
4.4.2.	Bahan.....	34
4.5.	Cara Penelitian.....	34
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	34
4.5.2.	Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i> .	34
4.5.3.	Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan <i>Flow Cytometry</i>	35

4.5.4.	Proses Hipoksia.....	37
4.5.5.	Pembuatan Sediaan Gel.....	37
4.5.6.	Pembuatan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan.....	38
4.5.7.	Terminasi dan pengambilan jaringan.....	38
4.5.8.	Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	39
4.5.9.	Pembacaan p50/p65 dan IL-6 dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	41
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	41
4.6.1.	Tempat Penelitian.....	41
4.6.2.	Waktu Penelitian	41
4.7.	Analisis Data	42
4.8.	Alur Penelitian.....	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		43
5.1.	Hasil Penelitian.....	43
5.1.1.	Isolasi Secretome <i>Mesenchymal Stem Cell</i> Hipoksia (S- MSCs)	43
5.1.2.	Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA IL-6 pada Tikus Model Hiperpigmentasi	47
5.1.3.	Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA p50 pada Tikus Model Hiperpigmentasi	50
5.1.4.	Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA p65 pada Tikus Model Hiperpigmentasi	52
5.2.	Pembahasan Hasil Penelitian.....	54
5.3.	Kelemahan Penelitian.....	57
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		58
6.1	Kesimpulan.....	58
6.2	Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA		60
LAMPIRAN		68

DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
GM-SCF	: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPMC	: <i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>
JAK2-STAT6	: <i>Janus Kinase 2 – Signal Transduction and Transcription 6</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IRF1	: <i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
kDa	: <i>Kiolodaltons</i>
KGf	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	: <i>L-3, 4-dihydroxyphenylalanine v</i>
MAPK	: <i>Mitogen-actived Protein Kinases v</i>

MC1R	: <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MITF	: <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor v</i>
MMP	: <i>Matriks Metalloproteinase</i>
MRP	: <i>Melanogenesis-related Protein</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal stem cells</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PDGF	: <i>Platet Derived Growth Factor</i>
POMC	: <i>Promotor Proopiomelanokortin</i>
PVA	: <i>Polyvinyl Alcohol</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species v</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
S-MSCs	: <i>Secretom Hypoxia Mesenchymal Stem Cell</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismuthase</i>
STAT1	: <i>Signal Transduction and Transcription 1</i>
TEA	: <i>Triethanolamine</i>
TLRs	: <i>Toll-like Receptors</i>
TRP-1	: <i>Tyrosinase-related Protein-1 v</i>
TRP-2	: <i>Tyrosinase-related Protein-2</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β1	: <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Smad2	: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic 2</i>
UVB	: <i>Ultra Violet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperpigmentasi adalah kerusakan kulit yang disebabkan oleh paparan radiasi sinar ultraviolet B (UVB) yang menyebabkan kerusakan kulit, seperti eritema, kornifikasi, sedimentasi melanin, penuaan kulit, dan kanker¹⁻³. Paparan iradiasi UVB dikaitkan dengan hiperpigmentasi akibat respon stress oksidatif sehingga terbentuk akumulasi *reactive oxygen species* (ROS)⁴. Kelebihan ROS memicu transduksi sinyal dan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), sebuah mediator inflamasi⁵. Respon inflamasi yang dimediasi oleh heterodimer subunit p50 dan p65 NF- κ B menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi seperti interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), dan interleukin-10 (IL-10) yang menyebabkan inflamasi kulit^{6,7}. Pelepasan IL-6 meningkatkan derajat kerusakan patologis dalam jaringan kulit hiperpigmentasi⁸. Respon ini juga menyebabkan oksidasi protein dan DNA sehingga menyebabkan kerusakan oksidan dan karsinogenesis dermal⁹. *Conditioned medium mesenchymal stem cells* (MSCs) mencegah inflamasi melalui hambatan jalur NF- κ B melalui pelepasan sitokin antiinflamasi¹⁰. Kondisi hipoksia MSCs meningkatkan pelepasan sitokin dan *growth factor* dalam secretom¹¹. Saat ini, pengaruh secretom hipoksia MSCs (S-MSCs) terhadap ekspresi NF- κ B dan IL-6 pada hiperpigmentasi masih belum jelas.

Pada tahun 2015, 4.2% dari 142 subjek positif mengalami hiperpigmentasi setelah terpapar tiga kali UVB *minimal erythema dose* (MED)¹². Paparan UVB mengakibatkan 8% kasus karsinoma skuamosa yang dikenal dengan kanker kulit melanoma dengan potensi metastasis tinggi^{13,14}. Kasus hiperpigmentasi semakin meningkat pada tahun 2020 dengan ~100.350 kasus baru dan 6.850 kasus kematian akibat perkembangan menjadi kanker kulit¹⁵. Kultur sel primer yang terpapar UVB 40-60% nya menunjukkan peningkatan ekspresi berbagai sitokin inflamasi¹⁶, seperti tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α), IL-6, dan interleukin-8 (IL-8)⁶. Peningkatan ini menyebabkan pembentukan melanin, mencegah sintesis kolagen, dan terjadinya proses inflamasi yang berperan pada *hiperpigmentasi*^{17,18}.

Prekondisi hipoksia pada MSCs meningkatkan pelepasan sitokin pada S-MSCs seperti interleukin-10 (IL-10) dan *growth factor* seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), VEGF, *Platet Derived Growth Factor* (PDGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)^{19,20} yang dapat mencegah inflamasi melalui penekanan sitokin proinflamasi^{21,22}. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa IL-10 dan VEGF dapat menekan kadar ROS melalui jalur NF- κ B^{23,24}. Penelitian lain juga melaporkan bahwa beberapa ekspresi sitokin proinflamasi ditekan oleh IL-10 bersumber dari *human bone marrow derived mesenchymal stem cells* yang diatur melalui NF- κ B²⁵. Disregulasi NF- κ B telah dibuktikan terlibat dalam patogenesis berbagai kasus inflamasi pada hiperpigmentasi^{26,27}. Memblok NF- κ B telah

menunjukkan efek menguntungkan pada model hewan untuk penyakit dengan respon inflamasi termasuk hiperpigmentasi^{27,28}. Penelitian terbaru melaporkan bahwa *adipose-derived stem cells* menekan ekspresi IL-6, phospho-NF- κ B p65, and TNF- α yang berkaitan dengan melemahkan stress oksidatif melalui aktivasi *downstream signal transducer* dan *activator of transcription 3* (STAT3) untuk mencegah photaging²⁹. Keunggulan pemberian S-MSCs dibanding dengan senyawa lain diantaranya adalah S-MSCs adalah bio molekul aktif yang tidak memiliki sifat imunogenisitas, tidak menimbulkan efek samping dan ukuran molekulnya yang kecil sangat mudah untuk diabsorpsi menembus barrier kulit menuju dermis.

Adanya potensi S-MSCs sebagai agen alternatif untuk mencegah hiperpigmentasi pada kulit akibat paparan sinar UVB. Maka, dalam penelitian ini akan diinvestigasi pengaruh S-MSCs pada konsentrasi 100 μ l dan 200 μ l terhadap ekspresi p50/p65 dan IL-6 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi iradiasi UVB secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah: "Apakah terdapat pengaruh S-MSCs terhadap ekspresi p50/p65 dan IL-6 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB?"

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh S-MSCs terhadap ekspresi p50/p65 dan IL-6 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan penurunan ekspresi gen p50/p65 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian S-MSCs kelompok perlakuan pada dosis (P1) 100 µl dan (P2) 200 µl dibandingkan dengan kelompok UVB.
2. Untuk membuktikan penurunan ekspresi gen IL-6 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian S-MSCs kelompok perlakuan pada dosis (P1) 100 µl dan (P2) 200 µl dibandingkan dengan kelompok UVB.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh S-MSCs dalam dunia kedokteran sebagai agen regeneratif yang berpengaruh terhadap regenerasi/ perbaikan kulit akibat paparan sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran S-MSCs dalam regenerasi/ perbaikan kulit dan pencegahan photoaging yang efektif.

Selain itu penelitian ini dapat memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh S-MSCs terhadap perbaikan/regenerasi kulit. Penelitian lebih lanjut dapat di aplikasikan bagi masyarakat.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian (2018-2021)

Peneliti,Tahun	Judul	Metode	Hasil
Sudha Balasubramanian, Chara Thej, Ankita Wavekar, Priyanka Swamynathan, Pawan K Gupta, Raviraja N Seetharam, Anish S Majumdar, 2017 ³⁰	Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation	In Vitro, eksperimental	<i>Conditional medium</i> MSCS/ sekretom menghambat aktivasi Extra Cellular Matrix (ECM)/MMP sehingga terjadi sintesis kolagen.
Yoon-Ji Kim, Dong Hee Seo, Seung Hee Lee, Sung-Hoon Lee, Geun-Ho An, Hee-Jin Ahn, Daeken Kwon, Kwang-Won Seo, Kyung-Sun Kang, 2018 ³¹	Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin	In Vitro, Eksperimental	<i>Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells</i> meningkatkan dermal density melalui stimulasi growth factor dan <i>extracellular matrix</i> .
Anny Waloski	The skin regeneration	In Vivo,	Hidrogel poli

Robert, Felipe Azevedo Gomes, Michele Patricia Rode, Maira Marques da Silva, Maria Beatriz da Rocha Veleirinho, Marcelo Maraschin, Leila Hayashi, Giordano Wosgrau Calloni, 2019 ³²	potential of a pro-angiogenic sekretom from human skin-derived multipotent stromal cells	Eksperiment al, topikal	alcohol mengandung sekretom meningkatkan angiogenesis
Cita Rosita Sigit Prakoeswa, Febrina Dewi Pratiwi, Nanny Herwanto, Irmadita Citrashanty, Diah Mira Indramaya, Dwi Murtiastutik, Hari Sukanto, Fedik A Rantam, 2019 ³³	The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on hiperpigmentasi	Clinical study, Eksperiment al	amniotic membrane stem cell-conditioned medium memperbaiki kondisi hiperpigmentasi pada 24 subjek wanita
Vivi Yustianingsih, Titiek Sumarawati, Agung Putra, 2019 ³⁴	Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells	In Vitro, Eksprimenta l	Hipoksia MSCS meningkatkan proliferasi dan stemness MSCS, serta sitokin lebih optimal.
Lu Li, Hien T Ngo, Euson Hwang, Xuan	Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal	In vitro, Eksprimenta l	Conditioned Medium from Human Adipose-

Wei, Ying Liu, Jia Liu, dan Tae-Hoo Yi, 2020 ³⁵	Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts	Derived Mesenchymal Stem Cell menurunkan ekspresi IL-6 MMP-1, dan meginduksi sintesis prokolagen tipe 1. Menurunkan aktivasi Nf-kB hingga 69%.
--	---	--

Penelitian sudha *et al.*, 2017 menggunakan *Conditional medium* MSCs tanpa filtrasi untuk meningkatkan sintesis kolagen³⁰. Penelitian Ji Kim *et al.*, 2018 menggunakan *conditioned media* dari human *umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells* untuk mencegah penuaan kulit pada sel fibroblast melalui penghambatan *extra cellular matrix* dan induksi *growth factor*³¹. Peneliti Robert *et al.*, 2019 menggunakan *secretom human skin-derived multipotent stromal cells* untuk menginduksi regenerasi kulit yang di papir UVB melalui mekanisme angiogenesis³². Pada penelitian yang dilakukan Prakoeswa *et al.*, 2019 menggunakan *conditioned medium* dari sel *amniotic membrane stem cells* berhasil mencegah hiperpigmentasi pada 24 subjek Wanita secara klinis³³. Penelitian Y³⁴ustianingsih *et al.*, 2019 mengungkapkan kondisi hipoksia MSCs meningkatkan produksi sitokin yang di sekresikan MSCs. Serta penelitian Li *et al.*, 2020 menggunakan *conditioned medium* dari human *Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell* yang menurunkan ekspresi IL-6 MMP-1, dan meginduksi sintesis prokolagen tipe 1 serta menurunkan

aktivasi Nf-kB hingga 69% secara *in vitro*³⁵. Penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena dengan menggunakan sekretom hipoksik MSCs yang di filtrasi dengan *tangential flow filtration* (TFF) sehingga diperoleh sekretom dengan ukuran dan kandungan tertentu, pada penelitian ini pemberian sekretom di berikan secara topikal dalam bentuk sediaan gel dengan dosis 100 dan 200 μ L, dibandingkan pada kontrol dengan mengukur ekspresi gen p50/p65 dan IL-6 pada tikus model hiperpigmentasi yang dipapar sinar UVB 390 mJ/cm².



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sub unit p50/p65

2.1.1. Definisi

Sub unit p50/p65 adalah kompleks protein yang mengontrol transkripsi DNA, produksi sitokin, dan kelangsungan hidup sel yang dikenal dengan NF- κ B. Sub unit p50/p65 ditemukan di hampir semua jenis sel hewan dan terlibat dalam respons seluler terhadap rangsangan seperti stres, sitokin, radikal bebas, logam berat, iradiasi ultraviolet, LDL teroksidasi, dan antigen bakteri atau virus. Regulasi p50/p65 yang salah telah dikaitkan dengan kanker, penyakit inflamasi dan autoimun, syok septik, infeksi virus, dan perkembangan kekebalan yang tidak tepat. Sub unit p50/p65 juga terlibat dalam proses hiperpigmentasi dan hiperpigmentasi³⁶.

2.1.2. Peran sub unit p50/p65 pada Hiperpigmentasi

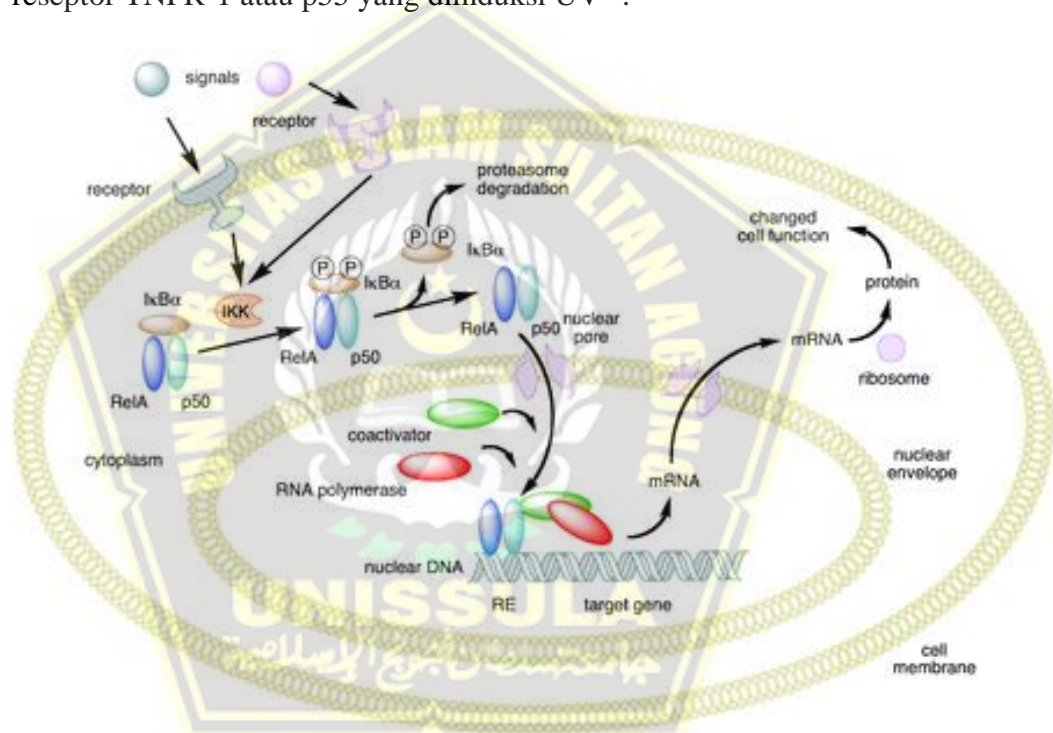
Sub unit p50/p65 diaktifkan di keratinosit kulit oleh iradiasi UV dan menginduksi berbagai gen termasuk IL-1 dan TNF yang selanjutnya merangsang jalur transduksi sinyal untuk mengaktifkan kompleks sub unit p50/p65. Sub unit p50/p65 juga diketahui menginduksi ekspresi gen siklo-oksigenase 2 (COX-2) dan endotelin. COX-2 terlibat dalam sintesis prostaglandin E2 (PGE2) dari asam arakidonat dan PGE2 dan endotelin diketahui mempromosikan sintesis melanin dalam melanosit^{27,37}.

Sub unit p50/p65 diketahui meningkatkan MMP-1 di dermis dan juga dilaporkan bahwa penyinaran UV menginduksi produksi bFGF,

melalui aktivasi sub unit p50/p65. Ditemukan bahwa kadar MMP-1 dan FGF dasar dalam supernatan kultur sel meningkat dengan ekspresi berlebih dari subunit p65 NF- κ B. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks sub unit p50/p65 memainkan peran utama dalam produksi MMP-1 dan FGF meskipun secara tidak langsung. Oleh karena itu, penghambatan jalur aktivasi NF- κ B akan memblokir jalur biologis yang mengarah ke inflamasi kronis dan proses penuaan kulit yang ditimbulkan oleh iradiasi UV, sehingga secara efektif mencegah perubahan kulit atau hiperpigmentasi kulit yang diperantarai UV²⁷.

Sub unit p50/p65 adalah salah satu mediator utama dari proses inflamasi seluler dan diketahui bahwa iradiasi UV dapat meningkatkan aktivitas transkripsi NF- κ B, menghasilkan sinyal inflamasi kronis. Keratinosit manusia yang disinari dengan UV menunjukkan peningkatan ekspresi sitokin inflamasi IL-1 β , IL-6, IL-8, dan TNF- α melalui jalur NF- κ B. TLR diekspresikan dalam keratinosit epidermis dan sel Langerhans dan sangat penting dalam identifikasi patogen dan respons imun. Telah ditunjukkan bahwa TLR memiliki fungsi penting dalam peradangan yang dimediasi UV melalui jalur pensinyalan hilirnya yang melibatkan NF- κ B. Secara khusus, keratinosit yang rusak akibat sinar UV mensekresi RNA nonkode yang dapat mengaktifkan TLR3 dan menginduksi respon inflamasi, seperti TNF- α dan IL-6^{38,39}. Epidermis kulit memiliki ekspresi TNFR yang dominan, dan TNF- α dapat mengaktifkan berbagai jalur inflamasi melalui NF- κ B dan MAPK²⁷. Telah dilaporkan bahwa penyinaran UV secara

signifikan meningkatkan TNF- α yang larut dan panjang penuh dalam keratinosit epidermis. Meskipun epidermis terus diperbarui dan apoptosis sel merupakan faktor penting untuk homeostasis epidermis, penting juga untuk dicatat bahwa apoptosis yang terganggu, prematur, atau berlebihan dapat menyebabkan disregulasi homeostasis epidermal dan meningkatkan fenotipe penuaan, seperti sel yang terbakar sinar matahari. Telah terbukti bahwa TNF- α dapat menyebabkan apoptosis keratinosit melalui jalur reseptor TNFR-1 atau p53 yang diinduksi UV²⁶.



Gambar 2.1. Mekanisme aksi NF- $\kappa\beta$ ⁴⁰

2.2. Interleukin-6 (IL-6)

2.2.1. Definisi

IL-6 adalah interleukin yang bertindak sebagai sitokin pro-inflamasi dan miokin anti-inflamasi. Osteoblas mensekresi IL-6 untuk merangsang pembentukan osteoklas. Sel otot polos di tunika media banyak pembuluh darah juga memproduksi IL-6 sebagai sitokin pro-inflamasi. Peran IL-6 sebagai miokin anti-inflamasi dimediasi melalui efek penghambatannya pada TNF-alpha dan IL-1 dan aktivasi IL-1ra dan IL-10⁴¹.

2.2.2. Peran IL-6 pada Hiperpigmentasi

Konsentrasi IL-6 meningkat selama penuaan, dan tidak tergantung pada etnis. Konsentrasi IL-6 yang cukup tinggi pada orang tua memainkan peran penting dalam gangguan fungsional, termasuk gerak rendah, fungsi kognitif dan mental, dan depresi. Tingkat yang sangat tinggi dari sitokin ini bahkan dapat memprediksi peningkatan kematian pada individu yang sangat tua. Di sisi lain, tingkat IL-6 yang rendah mewakili "inflamasi" yang lebih rendah³.

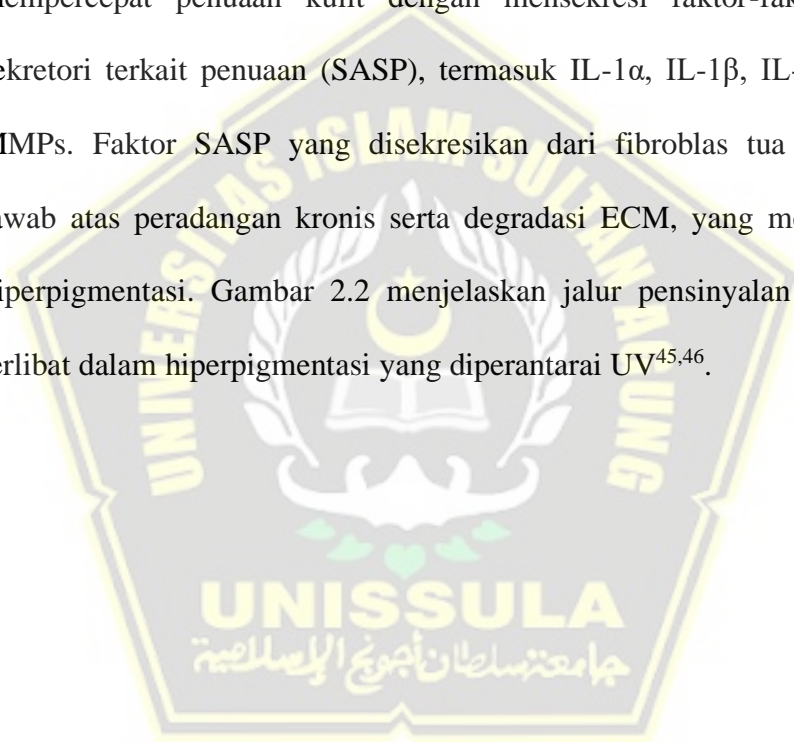
Penuaan adalah suatu kondisi yang memungkinkan atau menyebabkan munculnya beberapa penyakit. Bahkan jaringan tua yang sehat, tanpa penyakit yang tampak secara klinis, memberikan beberapa fitur molekuler yang mengkhawatirkan. Fibroblast menunjukkan kemiripan yang luar biasa dengan kanker terkait fibroblas (CAFs), termasuk ekspresi tinggi mRNA encoding IL-6. Memang, profil transkripsi fibroblas dermal wajah

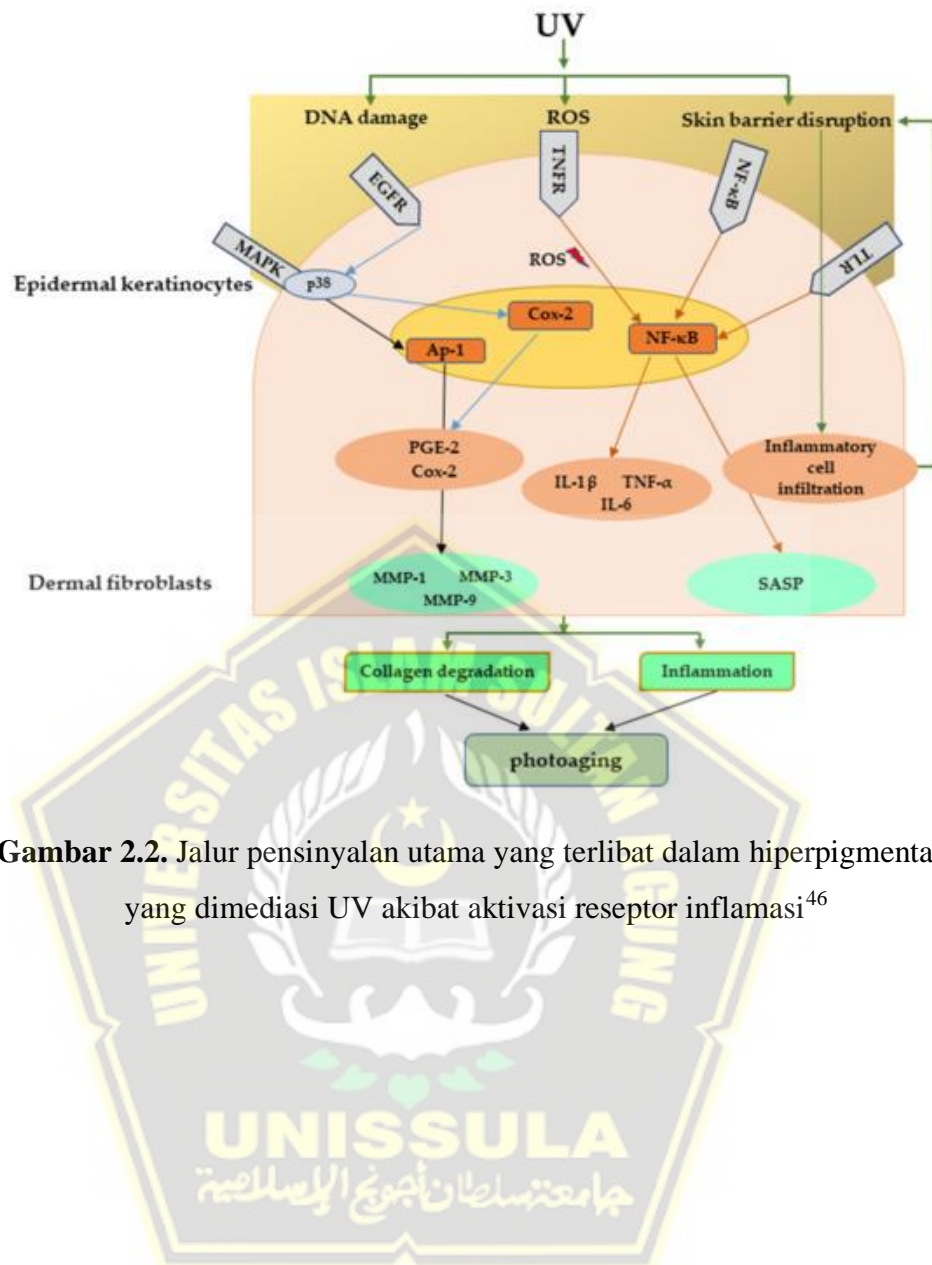
dari anak-anak, orang dewasa yang sehat, fibroblas dermal yang rusak akibat foto dari pasien yang menderita karsinoma sel basal, dan CAF langsung dari karsinoma sel skuamosa basal dan kulit mengungkapkan kesamaan yang mencolok dalam ekspresi komponen hilir pensinyalan IL-6 jalur antara fibroblas tua dan CAF. Khususnya, Janus kinase 2 (JAK2) dan transduser sinyal dan aktivator transkripsi 3 (STAT3) menunjukkan tren peningkatan yang jelas dari aktivitas yang sangat rendah pada fibroblas, hingga aktivitas menengah pada fibroblas dermal fotoaging, dan kemudian ke aktivitas yang meningkat di CAF, menunjukkan peningkatan derajat inflamasi⁴¹.

Paparan UVB pada kulit dapat menghasilkan peningkatan jumlah ROS, yang menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan, yang mengakibatkan stres oksidatif⁴². Stres oksidatif ini dapat meningkatkan produksi ROS, dan dapat memulai peradangan dan aktivasi sitokin pro-inflamasi, seperti interleukin-2 (IL-2), IL-6, dan TNF- α , melibatkan beberapa jalur NF- κ B, *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf-2), dan *activator protein 1* (AP-1)^{3,43}. Sirtuins, suatu histone deacetylase yang bergantung pada nikotinamida adenin dinukleotida (NAD(+)), juga mendapat perhatian karena kemampuannya untuk meningkatkan umur karena dapat menunda penuaan seluler dan mendorong perbaikan kerusakan DNA. Telah ditunjukkan bahwa SIRT1, anggota keluarga Sirtuins, memiliki efek anti-inflamasi dengan menghambat pensinyalan NF- κ B. UVB juga

dapat menyebabkan peradangan kronis dengan menurunkan regulasi ekspresi SIRT1 pada keratinosit manusia⁴⁴.

Berbagai stresor termasuk radiasi UV dapat mengaktifkan respon kerusakan DNA yang dapat memulai penghentian siklus sel melalui jalur p53/p21 yang melibatkan kaskade P38/MAPK dan jalur NF- κ B. Telah ditunjukkan bahwa kulit manusia yang terpapar sinar UV memiliki akumulasi sel-sel tua yang sangat tinggi. Akumulasi fibroblas tua dapat mempercepat penuaan kulit dengan mensekresi faktor-faktor fenotipe sekretori terkait penuaan (SASP), termasuk IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, dan MMPs. Faktor SASP yang disekresikan dari fibroblas tua bertanggung jawab atas peradangan kronis serta degradasi ECM, yang mengakibatkan hiperpigmentasi. Gambar 2.2 menjelaskan jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam hiperpigmentasi yang diperantarai UV^{45,46}.





Gambar 2.2. Jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam hiperpigmentasi yang dimediasi UV akibat aktivasi reseptor inflamasi⁴⁶

2.3. Hiperpigmentasi

2.3.1. Definisi

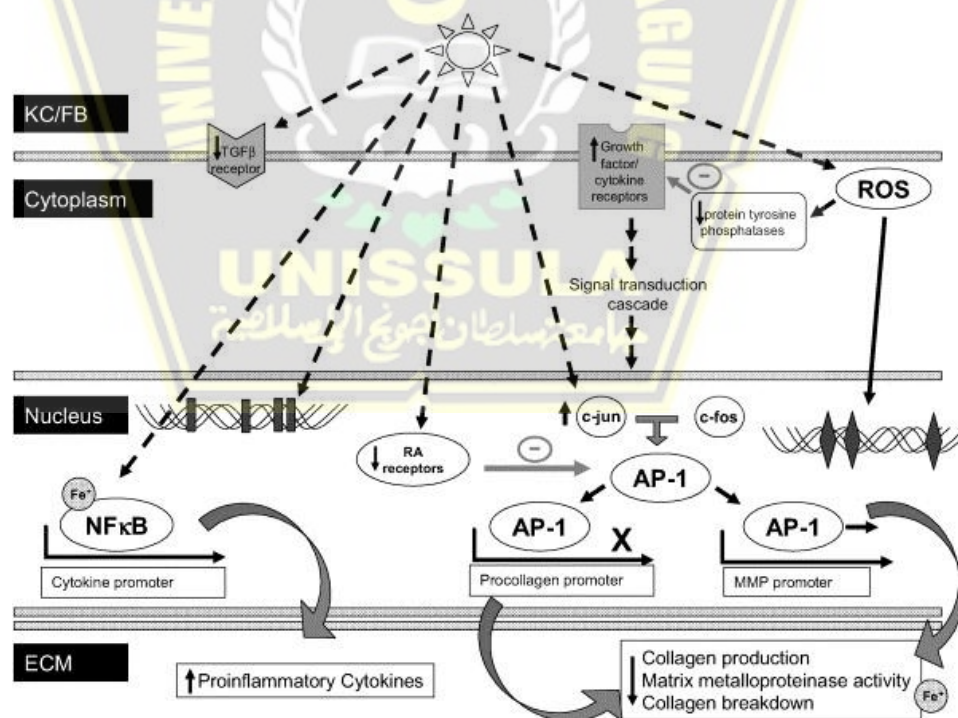
Hiperpigmentasi adalah penuaan dini pada kulit yang disebabkan oleh paparan berulang oleh radiasi UVB, terutama dari matahari tetapi juga dapat disebabkan oleh sumber UVB buatan. Hiperpigmentasi berbeda dari penuaan intrinsik dimana efek merusak dari sinar UVB mengubah struktur kulit normal secara cepat dan signifikan⁴⁷.

2.3.2. Proses Hiperpigmentasi

Hiperpigmentasi akan terjadi apabila kulit terpapar sinar UVB secara kronik dan berulang dalam kurun waktu tertentu. Pejalan kronis sinar UVB dan UVB sangat berperan dalam terjadinya hiperpigmentasi dan *photocarcinogenesis*⁴⁸. Kerusakan kulit pada hiperpigmentasi dapat terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan *appendages* kulit. Salah satu perubahan mikroskopis yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami hiperpigmentasi dapat berupa meningkatnya jumlah melanin dan berkurangnya jumlah kolagen secara bermakna⁴⁹. Kolagen merupakan bagian terbesar dari lapisan dermis, berkontribusi sekitar 70% dari massa kering kulit, sehingga kerusakannya merupakan penyebab utama manifestasi penuaan kulit berupa kerutan (*wrinkle*), hilangnya elastisitas, kekenduran (*sagging*) dan pigmentasi. Pigmentasi kulit disebabkan karena meningkatnya kadar melanin yang signifikan akibat paparan dari luar.

Dua regulator utama pada proses pembentukan kolagen oleh sel fibroblas adalah TGF- β dan AP-1. TGF- β merupakan sitokin yang

merangsang produksi kolagen, sedangkan AP-1 merupakan faktor transkripsi yang menghambat produksi kolagen serta merangsang pemecahan kolagen. Penuaan ekstrinsik yang terutama disebabkan oleh radiasi sinar UVB (hiperpigmentasi) akan menyebabkan peningkatan produksi ROS pada lapisan dermis. ROS tersebut akan memicu serangkaian reaksi molekuler berantai sehingga meningkatkan pembentukan AP-1 yang akan menstimulasi proses transkripsi enzim MMP yang berperan dalam proses degradasi kolagen. ROS bersama dengan AP-1 juga memiliki peranan dalam menghambat sintesis kolagen dengan cara menghambat reseptor tipe 2 dari TGF- β . Serangkaian proses tersebut pada intinya akan menyebabkan peningkatan pemecahan kolagen serta penurunan produksi kolagen yang merupakan dasar patofisiologi dari penuaan kulit⁵⁰⁻⁵³.



Gambar 2.3. Skema hiperpigmentasi akibat iradiasi UVB⁴⁷

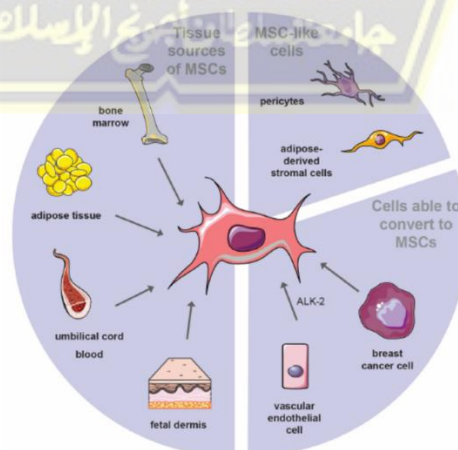
2.4. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

2.4.1. Definisi

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositas, dan neurosit. Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat⁵⁴. Secara umum, MSCs diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, MSCs yang diisolasi dari tikus, dimana MSCs tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenic⁵⁵.

2.4.2. Sumber MSCs

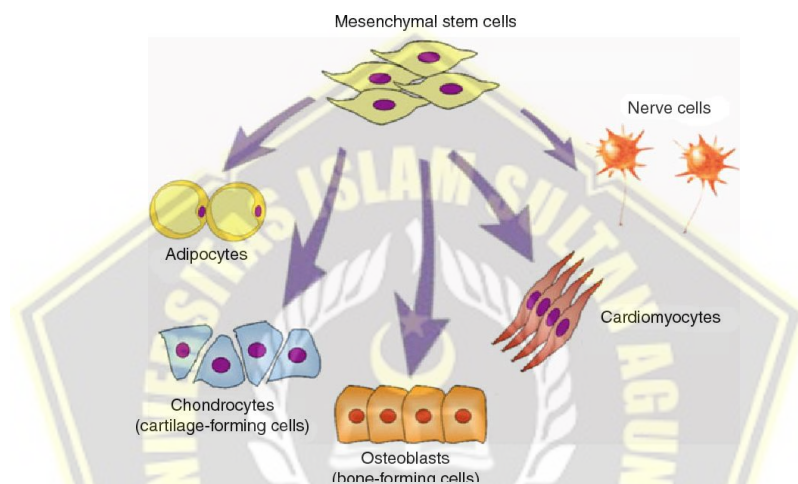
MSCs dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta⁵⁴.



Gambar 2.4. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs)⁵⁶

2.4.3. Karakteristik MSCs

MSCs memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit ³⁴. Selain itu MSCs juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengeksresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi. Hal ini menjadikan MSCs memiliki potensi yang besar dalam regenerasi kulit ⁵⁷.



Gambar 2.5. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁵⁸

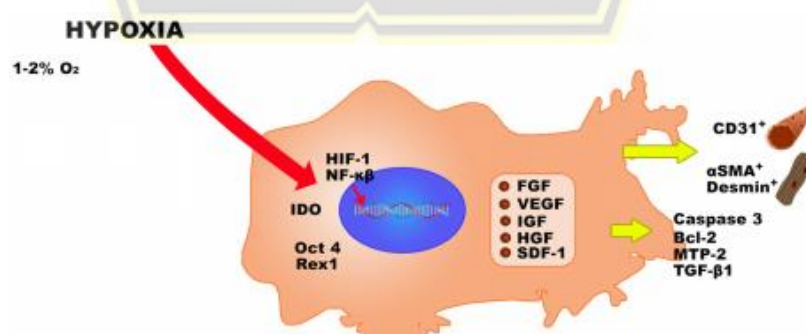
2.4.4. Peran MSCs

Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang

bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengeksresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi^{59,60}.

2.5. Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan proliferasi, self renewal, dan pelekatan MSCs⁶¹. Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs (Gambar 2.6).



Gambar 2.6. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCS⁶²

2.6. Sekretom *Mesenchymal Stem Cell*

MSCs diketahui mengeluarkan senyawa bioaktif aktif yang disebut sekretom, biasanya diklasifikasikan sebagai sitokin, kemokin, molekul adhesi sel, mediator lipid, IL, *growth factor* (GF), hormon, eksosom, mikrovesikel, faktor antiinflamasi dll^{63,64}. Faktor-faktor ini dianggap sebagai protagonis untuk berpartisipasi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan melalui parakrin yang memediasi pensinyalan sel ke sel. Dalam hal regenerasi kulit, salah satu sitokin yang bertanggung jawab yaitu TGF β ^{65,66}. TGF β memiliki peran kunci dalam regulator sintesis prokolagen I⁶⁷. TGF β secara signifikan terbukti menghambat sintesis melanin dan mengurangi aktivitas tyrosinase dan enzim-enzim yang berperan dalam jalur melanogenesis. TGF β juga menurunkan aktivitas MITF dan menurunkan produksi protein MITF, TRP-1, TRP-2 dan tyrosinase. Lebih lanjut TGF β menginduksi penundaan aktivasi ERK *signaling pathway*^{67,68}. Disisi lain TGF β menghambat PKA sehingga menyebabkan CREB tidak teraktivasi dan MITF tidak aktif⁶⁹. Kandungan IL-10 yang tinggi pada sekretom dapat menghambat produksi ROS sehingga menurunkan inflamasi dan aktivasi p53^{23,70}.

2.7. Pengaruh S-MSCs terhadap ekspresi gen NF-kB dan IL-6 pada Hiperpigmentasi

MSCs mensekresikan mediator-mediator dan *growth factor* yang disebut sekretom yang mendukung regenerasi kulit, antara lain seperti

sitokin antiinflamasi (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), tumor necrosis factor alfa (TNF- α), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF β 1), angiopoietin, IL-1, IL-6, dan IFN γ yang akan mencegah hiperpigmentasi. Kondisi hipoksia akan semakin memicu MSCs untuk mensekresikan molekul *soluble* yang mengandung lebih banyak mediator-mediator antiinflamasi dan *growth factor* ^{34,61} selanjutnya di sebut secretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-MSCs).

Irradiasi UVB menginduksi pembentuk ROS oleh mitokondria akibat stress oksidatif⁴². ROS mengaktifkan jalur NF- κ B disitoplasma melalui berbagai mekanisme. ROS mengaktifkan NF- κ B melalui fosforilasi I κ B α sehingga mengakibatkan degradasi I κ B α sehingga NF- κ B dapat masuk ke dalam nucleus untuk mengaktifkan transkripsi⁷¹. ROS juga dapat mempengaruhi sifat pengikatan DNA dari protein NF- κ B itu sendiri. Oksidasi p50 pada domain pengikatan DNA terbukti dapat mencegah pengikatan DNA sehingga p50 tidak masuk ke dalam intisel. ROS juga dapat meningkatkan fosforilasi RelA (p65) sehingga aktivasi NF- κ B lebih aktif tertranslokasi ke nucleus⁷².

NF- κ B yang aktif akan mentranslokasi ke nucleus dan menginduksi transkripsi target seperti IL-6, IL-1 β , IL-8 dan TNF- α ⁷³. IL-6 yg aktif akan berikatan dengan reseptor CD126 sehingga mengaktifkan jalur STAT3 yang menginduksi aktivasi NF- κ B untuk transkripsi sitokin inflamasi kembali⁷⁴. Peningkatan ekspresi sitokin inflamasi ini menginduksi degradasi kolagen

melalui ekspresi MMPs dan menyebabkan terbentuknya *wrinkle*⁹. IL-6 menginduksi pembentukan melanin pada proses hiperpigmentasi melalui aktivasi jalur MAPK dan PKA untuk meningkatkan produksi enzim tyrosinase⁷⁵. Dengan demikian, faktor NF- κ B dan IL-6 penting dalam proses hiperpigmentasi^{27,76}.

Sitokin IL-10 yang berasal dari S-MSCs dapat mencegah secara langsung produksi ekspresi ROS⁷⁷. IL-10 mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentraslokasi ke dalam nucleus untuk mengdiring ekspresi gen responsive STAT3, antara lain *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). Melalui sintesis SOCS3 de novo, IL-10 dapat menghambat ekspresi sejumlah gen proinflamasi termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ . SOCS3 juga menghambat aktivasi MAPK dan translokasi NF- κ B ke dalam nucleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen proinflamasi⁷⁸. Kandungan lain dari S-MSCs adalah TGF- β yang terbukti secara signifikan mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk masuk ke nucleus dan menginduksi ekspresi sitokin antiinflamasi⁷⁹. Maka dengan adanya S-MSCs, merupakan kandidat yang mampu mencegah terjadinya hiperpigmentasi kulit.

BAB III

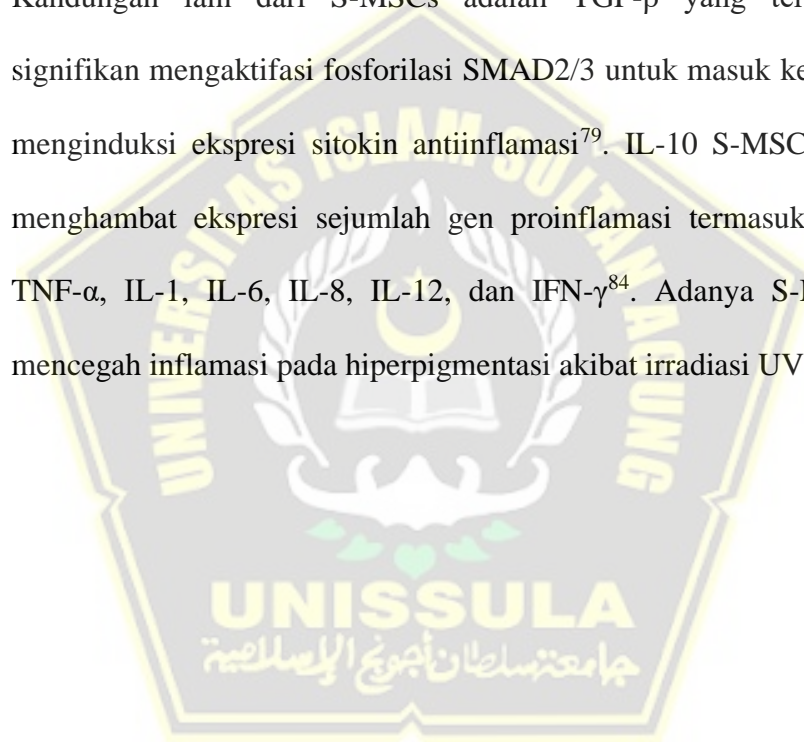
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

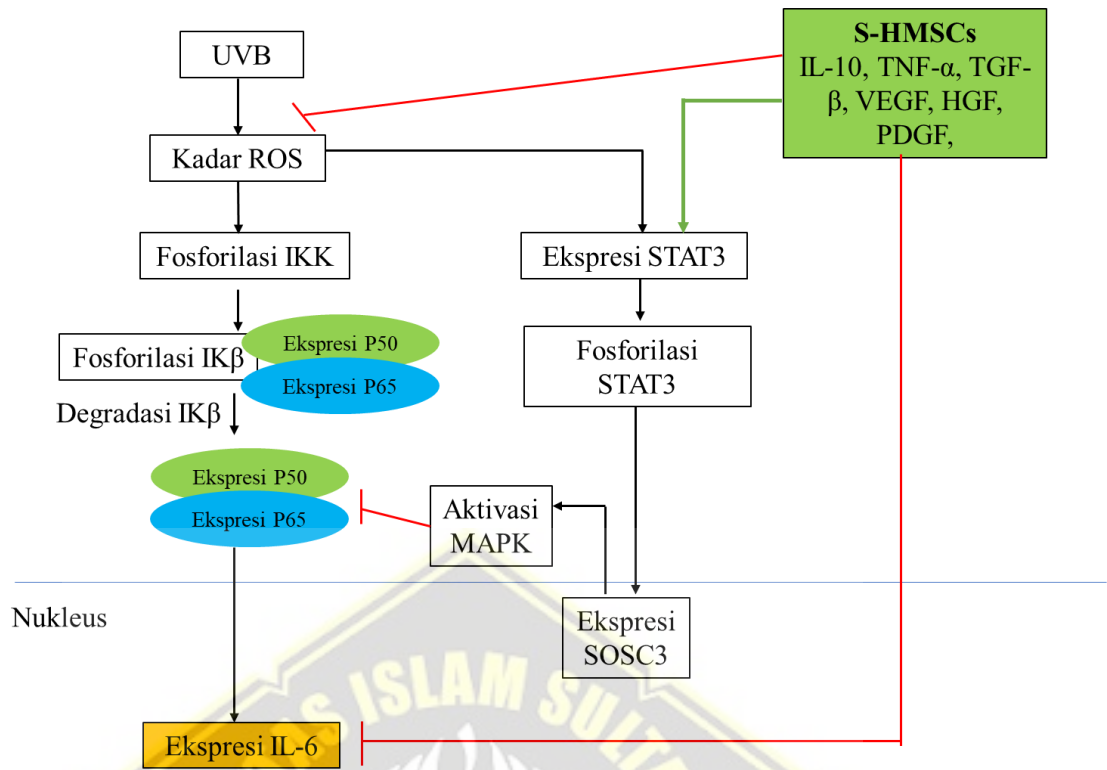
3.1. Kerangka Teori

Paparan sinar UVB dari sinar matahari menginduksi peningkatan produksi ROS yang kemudian akan menfosforilasi IKK. Fosforilasi ini akan menyebabkan IKB terfosforilasi dan membentuk kompleksi dengan subunit p50 dan p65⁵. Subunit ini akan menyebabkan degradasi IKB akibat peran ubiquitin⁸⁰. Sehingga sub unit p50/p65 akan masuk kedalam intisel dan menyebabkan transkripsi sitokin inflamasi²⁸. Irradiasi UVB juga akan mengaktivasi STAT3 untuk terfosforilasi dan menginduksi translokasi ke nucleus hingga mentranskripsi SOSC3⁷⁸. SOSC3 akan menaktifkan MAPK yang akan meningkatkan aktivasi NF-K β . Sehingga pada akhirnya translokasi NF-K β pada nucleus akan mengaktifkan transkripsi sitokin inflamasi seperti IL-6. Aktivasi sitokin ini akan mempengaruhi proses hiperpigmentasi^{81,82}.

Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan molekul *soluble* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal³⁴. Sitokin-sitokin dan mediator-mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10, IL-6, IL-1, TGF β , TGF α , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, KGF, G-CSF, GM-SCF, TNF, IGF-1, dan HGF⁸³ yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (S-MSCs). Pada penelitian ini

sekretom diberikan secara topikal dengan pembawa matriks gel pada daerah *hiperpigmentasi* hasil induksi irradiasi UVB. Aktivitas sekretom akan turut mencegah produksi ROS akibat peran IL-10²³, mengaktifasi fosforilasi STAT3 untuk membentuk homodimer yang mentraslokasi ke dalam nucleus untuk mengiring ekspresi gen responsive STAT3, yaitu SOSC3. SOSC3 juga menghambat aktivasi MAPK dan translokasi NF- κ B ke dalam nucleus sehingga tidak terjadi ekspresi gen proinflamasi⁷⁸. Kandungan lain dari S-MSCs adalah TGF- β yang terbukti secara signifikan mengaktifasi fosforilasi SMAD2/3 untuk masuk ke nucleus dan menginduksi ekspresi sitokin antiinflamasi⁷⁹. IL-10 S-MSCs juga dapat menghambat ekspresi sejumlah gen proinflamasi termasuk gen sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ ⁸⁴. Adanya S-MSCs, dapat mencegah inflamasi pada hiperpigmentasi akibat irradiasi UVB⁸⁵.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka konsep

3.3. Hipotesis

1. Terdapat pengaruh penurunan ekspresi gen p50/p65 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian S-MSCs kelompok perlakuan pada dosis (P1) 100 μ l dan (P2) 200 μ l dibandingkan dengan kelompok UVB.

2. Terdapat pengaruh penurunan ekspresi gen IL-6 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB dan pemberian S-MSCs kelompok perlakuan pada dosis (P1) 100 μ l dan (P2) 200 μ l dibandingkan dengan kelompok UVB.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian merupakan *post test only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan lima kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan bobot badan $200 \text{ gr} \pm 10 \text{ gr}$ ($cv = 5\%$).

Perlakuan terdiri dari:

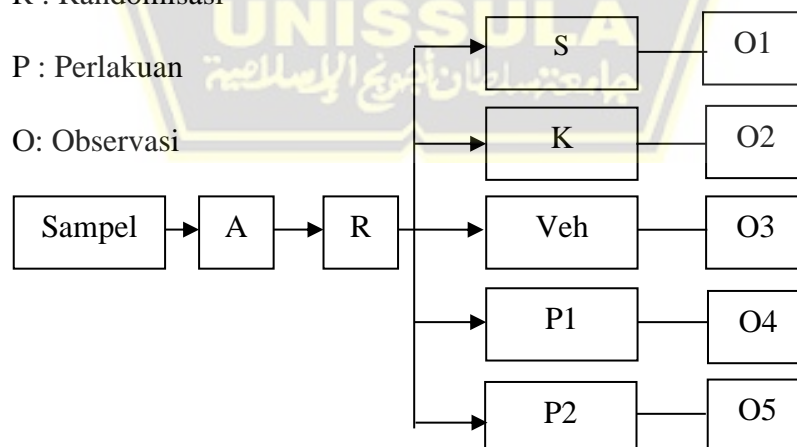
1. Kelompok: Sham (S) (tidak diberi perlakuan),
2. Kelompok: Kelompok UVB (K) (Irradiasi UVB)
3. Kelompok: Kontrol *Vehicle* (Veh) (pemberian basis gel),
4. Kelompok: P1 (pemberian gel S-MSCs dosis $100 \mu\text{L}$),
5. Kelompok: P2 (pemberian gel S-MSCs dosis $200 \mu\text{L}$),

A : Adaptasi

R : Randomisasi

P : Perlakuan

O: Observasi



Gambar 4.1. Gambar rancangan penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.2.1. Variabel bebas

Variabel bebas: gel S-MSCs dosis 100 μ l dan 200 μ L.

4.2.2.2. Variabel Terikat

Variabel dependen: ekspresi gen p50/p65 dan IL-6.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. *Mesenchymal Stem Cell* (MSCs) Hipoksia

MSC adalah *stem cell* yang memiliki bentuk menyerupai sel fibroblas (*fibroblast-shaped*), dapat melakat pada permukaan plastik dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sel dewasa. Selain itu MSC mengekspresikan marker spesifik CD29+, CD4+ dan negatif marker CD45- dan CD31- di periksa dengan *flow cytometry*. MSC pada penelitian ini diisolasi dari tikus galur Wistar pada 19 hari masa bunting dan dikultur menggunakan medium DMEM yang dicampur dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS), antijamur dan antibiotik. MSCs kemudian dimasukkan ke dalam Hypoxic chamber dan diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan kadar oksigen 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Dosis MSCs hipoksia yang digunakan sebanyak $1,5 \times 10^6$ sel dan 3×10^6 sel untuk masing-masing kelompok perlakuan.

Skala: Rasio

4.2.2.2. Sekretom hipoksia MSCs (S-MSCs)

Sekretom adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSC. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSC secara hipoksia. Kemudian dilakukan filtrasi dengan menggunakan *Tangential Flow Filtration*. S-MSCs kemudian dicampur dengan menggunakan gel berbasis air sebanyak 0,1 gram sebagai campuran. Sekretom yang digunakan dalam basis gen terbagi dalam beberapa kelompok yaitu kelompok P1 di berikan 100 μ l S-MSCs dan kelompok P2 di berikan 200 μ l S-MSCs.

Skala: Rasio

4.2.2.3. Hewan model hiperpigmentasi

Hewan model hiperpigmentasi adalah hewan model tikus jantan galur wistar yang dihilangkan bulu bagian dorsal dengan ukuran 2x2 cm dan mendapatkan paparan irradiasi sinar UVB dengan panjang gelombang 302 nm MED 390 mj/cm^2 selama 3 kali seminggu hingga 2 minggu. Hiperpigmentasi yang terbentuk divalidasi dengan pengecatan melanin menggunakan spesifik staining fontana masson staining.

Skala: Rasio

4.2.2.4. Ekspresi gen p50/p65

P50/p65 (NF- κ B) adalah gen yang memiliki peran dalam proses hiperpigmentasi melalui sekresi sitokin inflamasi akibat tingginya kadar ROS iradiasi UVB. Sampel jaringan kulit diarea penyinaran diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.2.2.5. Ekspresi gen IL-6

IL-6 adalah sitokin proinflamasi yang memiliki peran dalam proses hiperpigmentasi melalui induksi degradasi kolagen dan pembentukan melanin akibat irradiasi UVB. Sampel jaringan kulit diarea penyinaran diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk di analisis dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase.

Skala: Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang

dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari Animal House Integrated Biomedical Laboratory, Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang dan timbul Hiperpigmentasi dengan paparan sinar UVB 302 nm dengan MED 390 mJ/cm².

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus jantan putih galur *Wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Tikus kondisi hiperpigmentasi yang divalidasi adanya desposisi melanin pada kulit.
3. Bobot badan 200-250 gram.

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih jantan galur *Wistar* dengan kriteria:

1. Memiliki kelainan anatomis.
2. Sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

4.3.2.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

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

menjadi 5 perlakuan yaitu perlakuan S (tidak diberi perlakuan), K (hanya diberi paparan sinar UVBB 390 mJ/cm²), Veh (hanya diberi gel tanpa tambahan zat lainnya), P1 (Pemberian gel S-MSCs kadar 100 µL), dan P2 (Pemberian gel S-MSCs kadar 200 µL).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penilitia ini menggunakan 25 ekor tikus putih jantan galur *Wistar* dengan masing-masing 5 ekor sampel per kelompok.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri Biosafety Cabinet (BSC), mikropipet, inkubator CO₂, dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan hypoxic chamber. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam hypoxic chamber. Selain itu penelitian ini juga menggunakan peralatan berupa UVB light (broadband dengan peak emission pada 302 nm) dengan energi 390 mL/cm² yang diberikan 3 kali selama satu minggu hingga 2 minggu untuk menginduksi hiperpigmentasi pada punggung tikus, steril swab untuk mengoleskan gel S-MSCs. Alat yang digunakan untuk analisis ekspresi gen p50/p65 dan IL-6 (Illumina).

4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alcohol 70%, PBS, Ketamin, dan Xylasine.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

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

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke petri dish, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.

4. Umbilical cord dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluenensi 80%.

4.5.3. Pembacaan CD90, CD29, CD45, dan CD31 dengan *Flow Cytometry*

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

buffer. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.

2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 μ l sampel kedalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

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

7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 μ l *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).

8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

4.5.4. Proses Hipoksia

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit hingga 10 mL.
2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam hypoxic chamber.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indicator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFT untuk mendapatkan HypMSC-Scr yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis P1 dan P2.

4.5.5. Pembuatan Sediaan Gel

1. Pembuatan sediaan gel dilakukan dengan cara mencampurkan basis gel hydrogel (Katecho) sebanyak 200 mg dengan sekretom pada P1 dan P2.

2. Pengadukan dilakukan dalam kondisi aseptis hingga membentuk campuran homogen dari karakteristik fisik pengamatan di bawah mikroskop.

4.5.6. Pembuatan Hiperpigmentasi dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 1 minggu dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian punggung tikus potong hingga bersih.
3. Punggung tikus di iradiasi dengan UVB light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan minimal erythema dose (MED) 390 mJ/cm² (yang diukur dengan UV meter) sebanyak 3 kali seminggu (hari 1, 3, dan 5) selama 2 minggu menggunakan alat UV chamber⁸⁶.
4. Irradiasi UVB ditreatmen dengan pemberian gel topikal setiap hari yang mengandung S-MSCs 100 µl dan 200 µL/kgBB. Tikus sham tidak di berikan treatmen apapun, sedangkan tikus control diberikan perlakuan basis gel.

4.5.7. Terminasi dan pengambilan jaringan

1. Terminasi tikus dengan menggunakan cocktail dosis lethal sebelum dilakukan pengambilan organ. Untuk pembuatan 10 mL cocktail digunakan Ketamine 50 mg/kgBB, Xylazine 10 mg/kgBB dan Acepromazine 2 mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuskular.

2. Setelah tikus meninggal, dilakukan koleksi organ kulit kemudian disimpan dalam cryotube yang bebas dari RNAase dan disimpan pada suhu -80°C dalam RNA later.

4.5.8. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel kulit difiksasi dalam formalin 10% dan dibuat menjadi blok paraffin.
2. Sampel kulit sebanyak 100 mg diambil dari RNA later kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan kedalam tube yang telah terisi 50 mL RNA Iso Plus.
3. Potongan kulit ditumbuk menggunakan micropaste dan ditambahkan lagi RNA Iso Plus sebanyak 50 mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
4. Ditambahkan 20 mL chloroform dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.
5. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
6. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung centrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanolol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.

7. Tabung Eppendorf digoyang-goyangkan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
8. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (Diethyl pyrocarbonat) DEPC lalu bolak balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 40C.
9. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50 μm . Campuran diinkubasi pada suhu 55⁰C selama 10 menit. Selanjutnya didapatkan total RNA solution dan disimpan pada suhu -80⁰C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000 ng.
10. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1 μl OligoDT serta PCR water hingga mencapai volume 10 μl , kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70⁰C.
11. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 μl , DEPC-Treated H₂O 5 μl , ReverTraAce 1 μl . Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 250C selama 5 menit, 42⁰C selama 50 menit dan 85⁰C selama 5 menit.

4.5.9. Pembacaan p50/p65 dan IL-6 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi mRNA dari SOD dan MMP-1 dianalisis menggunakan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 μ l cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer and MgCl₂) sebanyak 12,5 μ l, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 μ l untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μ l Nuclease Free Water.
3. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan qRT-PCR illumine.
4. Peningkatan ekspresi gen di analisis dalam ratio peningkatan terhadap housekeeping gen dengan menggunakan software EcoStudy.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell & Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

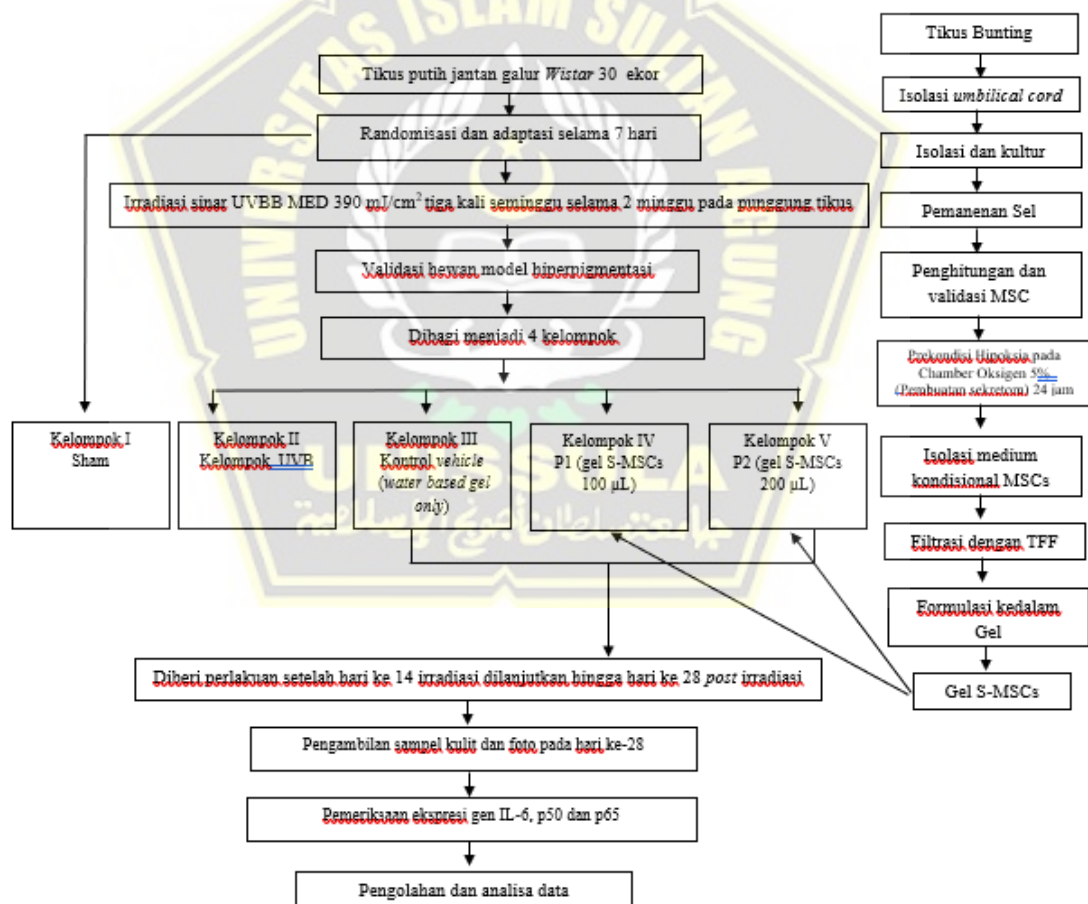
4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2020 – Januari 2021.

4.7. Analisis Data

Data yang sudah didapat, diproses, disunting, ditabulasi, dan dibersihkan, kemudian dilakukan uji deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji varian data dengan uji *Levene*. Sebaran data normal dan varian data sama, maka akan dilakukan uji beda uji *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Pengolahan analisis data dilakukan dengan menggunakan *SPSS 22.0 for Windows*.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

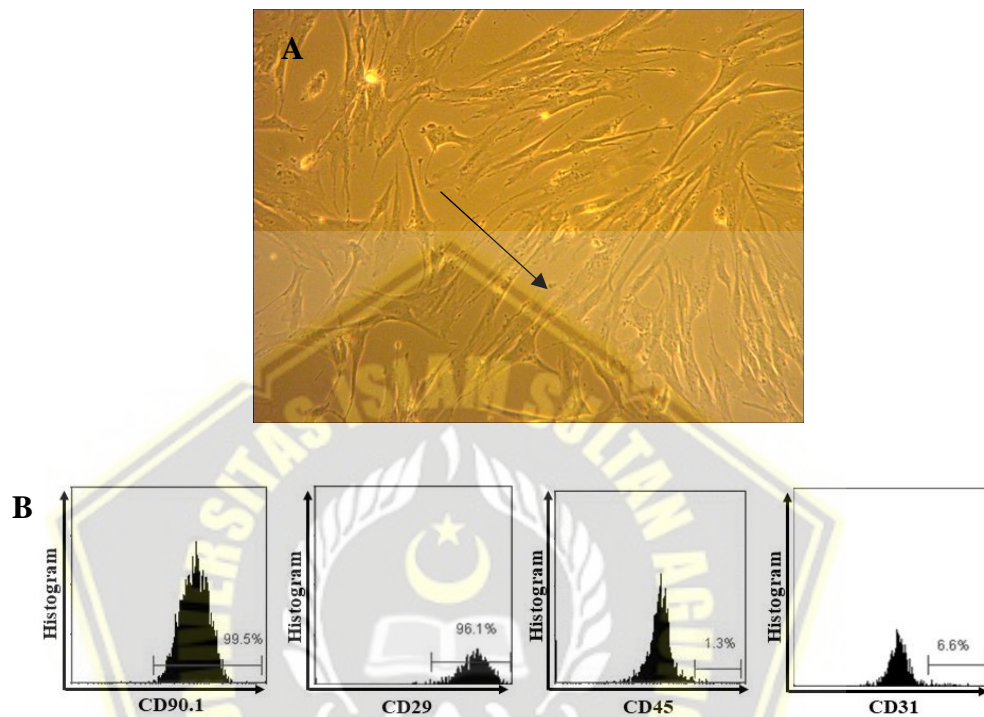
Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Januari 2022 hingga Februari 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 250-300 gram dan berumur 4-6 bulan yang di induksi hiperpigmentasi menggunakan UVB 302 nm dengan intensitas energi 390 mJ/cm^{2.86}. Penelitian ini menggunakan 25 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok dengan 2 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol basis gel, dan 1 kelompok kontrol negatif, dan 1 kelompok kontrol normal. Kelompok perlakuan pertama (P1) terdiri atas 5 hewan uji dengan pemberian gel S-MSCs dosis 100 µL dan kelompok kedua (P2) terdiri atas 6 hewan uji dengan pemberian gel S-MSCs dosis 200 µL. Kelompok kontrol basis gel (Veh) terdiri dari 6 hewan uji yang mendapatkan basis gel 0,1-gram tanpa S-MSCs. Kelompok kontrol negative (K) adalah 6 hewan uji yang mendapatkan paparan UVB tanpa pengobatan, sedangkan kelompok kontrol normal (S) adalah kelompok tikus sehat tanpa perlakuan dan intervensi.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi Secretome *Mesenchymal Stem Cell* Hipoksia (S-MSCs)

Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil

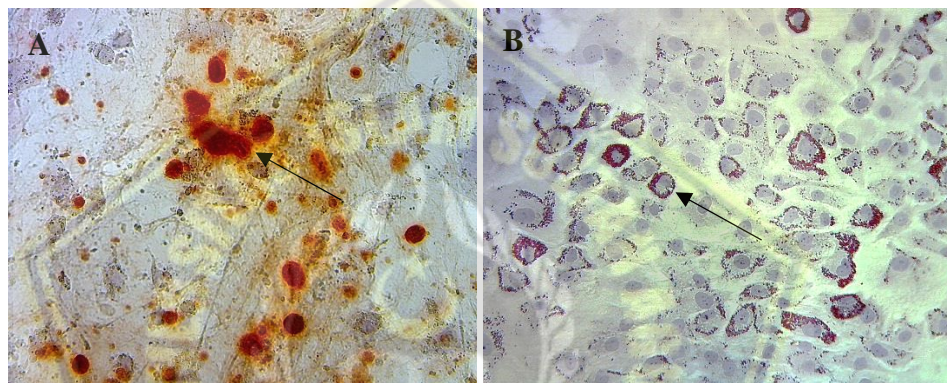
isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask kultur dengan medium khusus. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke-5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* dalam pengamatan mikroskopis (Gambar 5.1 (A)).



Gambar 5.1. (A) Isolasi MSC dengan konfluen 80% didapatkan gambaran sel berbentuk spindle-like (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.

Marker sel MSCs kemudian divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Penelitian ini menunjukkan MSCs mampu mengekspresikan CD90 (99,50%), CD29 (96,10%) dan sedikit mengekspresikan CD45 (1,30%) dan CD31 (6,60%) (Gambar 5.1 (B)).

Penelitian ini juga menganalisis kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi menjadi berbagai sel matur. MSCs diberi medium khusus agar dapat berdiferensiasi, masing-masing menjadi osteosit dan adiposit. Penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs mampu diferensiasi menjadi osteosit dan adipositas yang diindikasikan oleh endapan kalsium dan lemak berupa penampakan merah menggunakan metode pewarnaan *Alizarin red* dan *oil red o dye* pada masing-masing kultur osteogenic dan adipogenik (Gambar 5.2 (A dan B)).



Gambar 5.2. (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) Adiposit setelah pemberian pewarna *alizarin red* dan *oil red o* pada perbesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).

Sel MSCs kemudian diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 5% selama 24 jam menggunakan *chamber* hipoksia. Medium kultur MSCs yang mengandung secretome kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan *molecular weight cut-off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50 kDa yang mengandung sitokin *interleukin-10*

(IL-10) dan *transforming growth factor-β* (TGF-β)^{87,88}. IL-10 merupakan molekul antiinflamasi monomer berukuran ~18kDa yang berfungsi dominan dalam proses immunosupresi dan dapat disekresikan oleh MSCs pada kondisi hipoksia⁸⁹. TGF-β merupakan molekul *growth factor* dimer berukuran 25kDa yang memiliki peran menginduksi kolagen tipe I⁹⁰.

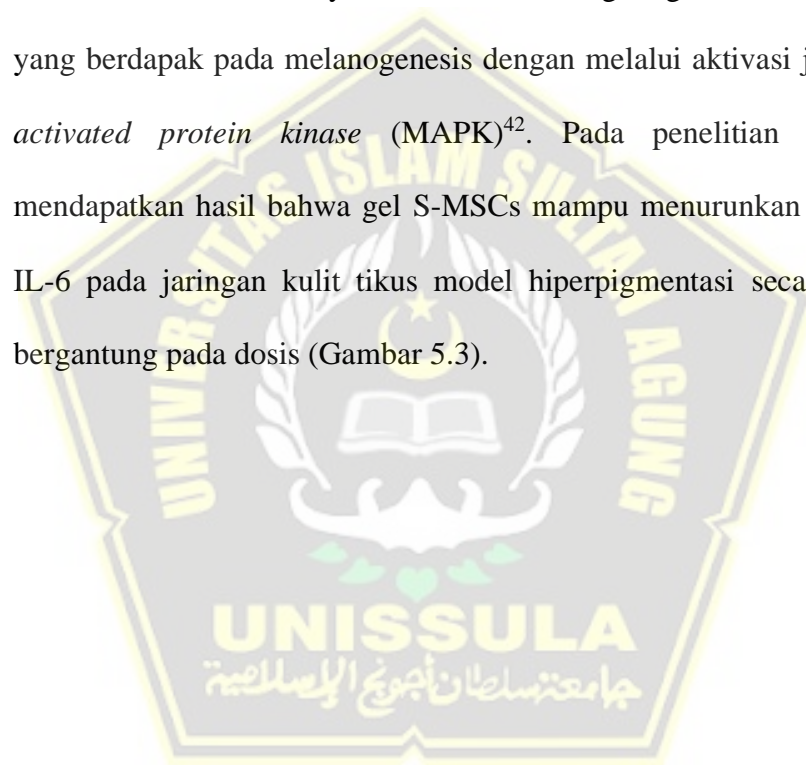
Pada penelitian ini juga di lakukan validasi hewan model hiperpigmentasi yang di papir irradiasi UVB 390 mJ/cm². Hasil pewarnaan sampel kulit pada kelompok perlakuan UVB dengan fontana masson staining menunjukan terbentuk warna hitam pada bagian melanosit kulit (Gambar 5.4). Kondisi patogenesis hiperpigmentasi terkait paparan sinar UVB, salah satu indikator terpenting adalah melanogenesis. Melanin, dapat menyerap radiasi UVB dan memberikan fotoproteksi serta berinteraksi dengan keratinosit dalam proses sintesis melanin. Sintesis melanin berlebihan menginduksi kerusakan kulit dan hiperpigmentasi.



Gambar 5.3. Morfologi melanin kulit hewan model dengan pewarnaan fontana masson staining diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Tanda panah hitam menunjukan positif melanin.

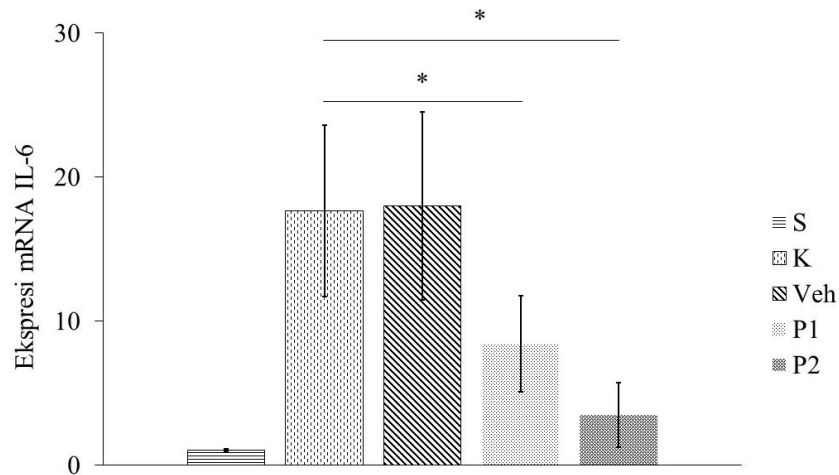
5.1.2. Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA IL-6 pada Tikus Model Hiperpigmentasi

Inflamasi merupakan proses patologis dasar yang melibatkan reaksi pertahanan jaringan dengan sistem vaskuler sebagai respon terhadap rangsangan berbagai faktor kerusakan termasuk irradiasi sinar UVB. Paparan sinar UVB terbukti menginduksi pelepasan sitokin inflamasi yang berkaitan dengan hiperpigmentasi kulit, seperti IL-6¹². Aktivasi berbagai sel imun oleh IL-6 menyebabkan induksi lingkungan mikro proinflamasi yang berdampak pada melanogenesis dengan melalui aktivasi jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK)⁴². Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel S-MSCs mampu menurunkan ekspresi gen IL-6 pada jaringan kulit tikus model hiperpigmentasi secara signifikan bergantung pada dosis (Gambar 5.3).



Tabel 5.1 Data Hasil Penelitian Ekspresi mRNA IL-6, p50 dan p65

Variabel	Kelompok					P value
	Sham (S) n=5 Mean±SD	Kelompok UVB (K) n=5 Mean±SD	Kelompok vehicle (Veh) n=5 Mean±SD	P1 n=5 Mean±SD	P2 n=5 Mean±SD	
Ekspresi mRNA IL-6	1.00±0.10	18.08± 5.96	18.01± 6.54	8.59± 3.32	3.49± 2.23	
<i>Saphiro wilk</i>	0.794	0.700	0.544	0.518	0.634	
<i>Levene test</i>						0.055
<i>One way Anova</i>						0.000
Ekspresi mRNA p50	1.00±0.10	5.72±2.50	6.07±3.25	4.35±2.27	2.99±1.76	
<i>Saphiro wilk</i>	0.977	0.895	0.064	0.848	0.296	
<i>Levene test</i>						0.058
<i>One way Anova</i>						0.009
Ekspresi mRNA p65	1.00±0.10	12.96±3.69	14.38±2.76	4.09±1.82	3.15±1.69	
<i>Saphiro wilk</i>	0.844	0.323	0.963	0.343	0.195	
<i>Levene test</i>						0.060
<i>One way Anova</i>						0.000



Gambar 5.4. Grafik ekspresi IL-6 pada semua kelompok penelitian (* $p < 0,05$ = signifikan)

Tabel 5.2. Uji Post-hoc LSD ekspresi IL-6 antar kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
S	K*	0,000	-22.1997	-11.0563
	Veh*	0,000	-22.5457	-11.4023
	P1*	0,012	-12.9577	-1.8143
	P2	0,368	-8.0317	3.1117
K	Veh	0,898	-5.9177	5.2257
	P1*	0,002	3.6703	14.8137
	P2*	0,000	8.5963	19.7397
Veh	P1*	0,002	-15.1597	-4.0163
	P2*	0,000	-0.6457	10.4977
P1	P2*	0,000	-10.4977	0.6457

Uji Post Hoc: * mean difference significant $P < 0,05$

Berdasarkan data diatas, P1 (8.59 ± 3.32) dan P2 (3.49 ± 2.23) secara signifikan mensupresi ekspresi mRNA IL-6. P1 mensupresi ekspresi IL-6 sekitar 7,5 *relative quantification* lebih rendah dan P2 mensupresi ekspresi IL-6 sekitar 14,5 *relative quantification* dibanding K (18.08 ± 5.96). P2

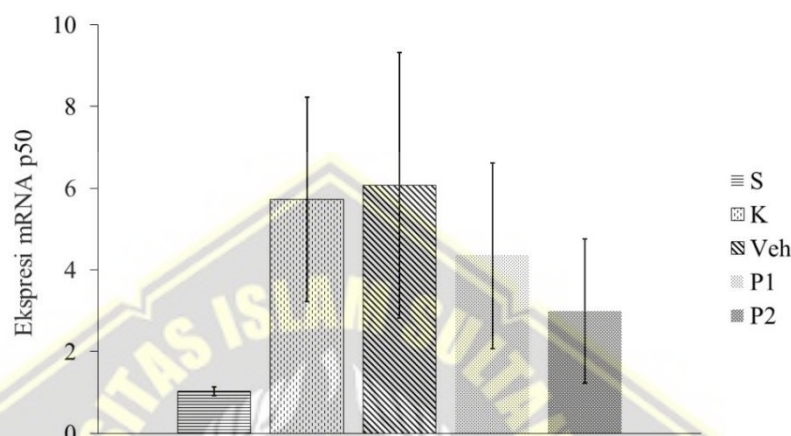
menunjukkan supresi ekspresi IL-6 yang paling optimal dan nilainya mendekati kelompok S (1.00 ± 0.10), menandakan terjadinya supresi ekspresi IL-6 yang terkontrol.

Pada data deskriptif, ekspresi IL-6 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA, dan dilanjutkan uji Post-hoc LSD. Uji beda *One-way* ANOVA didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.3 dan tabel 5.2. Penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara kelompok P1 dan P2 dengan K.

5.1.3. Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA p50 pada Tikus Model Hiperpigmentasi

Paparan UVB dengan intensitas tinggi menyebabkan induksi proses inflamasi pada lingkungan mikro yang berdampak pada ekspresi berbagai sitokin proinflamasi¹². Peningkatan sitokin proinflamasi tersebut diregulasi oleh berbagai jalur pensinyalan intraseluler, diantaranya adalah melalui jalur *nuclear factor kappa B* (NF- κ B). NF- κ B merupakan kompleks protein faktor transkripsi yang bertanggung jawab dalam aktivasi berbagai gen penghasil sitokin proinflamasi, seperti IL-6, TNF- α dan IFN- γ ²⁷. Faktor transkripsi famili NF- κ B dibagi menjadi beberapa protein, termasuk p50 (NF- κ B1) dan p65 (RelA). Protein p50 diduga

bertanggungjawab dalam berbagai mekanisme seperti apoptosis dan kematian sel yang berkaitan dengan kompleks NF- κ B⁹¹. Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel S-MSCs berdampak pada tren penurunan ekspresi gen p50 pada jaringan kulit tikus model hiperpigmentasi (Gambar 5.4).



Gambar 5.5. Grafik ekspresi p50 pada semua kelompok penelitian (* $p < 0,05$ = signifikan)

Tabel 5.3. Uji Post-hoc LSD ekspresi p50 antar kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
S	K*	0.003	-7.5604	-1.8036
	Veh*	0.002	-7.9064	-2.1496
	P1*	0.026	-6.1884	-0.4316
	P2	0.173	-4.8284	0.9284
K	Veh	0.805	-3.2244	2.5324
	P1	0.332	-1.5064	4.2504
	P2	0.062	-0.1464	5.6104
Veh	P1	0.228	-1.1604	4.5964
	P2*	0.037	0.1996	5.9564
P1	P2	0.336	-1.5184	4.2384

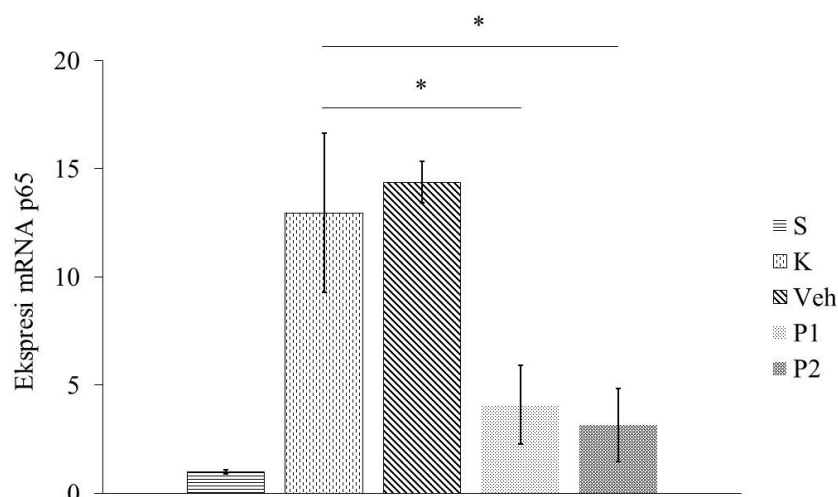
Uji Post Hoc: * mean difference significant $P < 0,05$

Berdasarkan data diatas, terdapat tren penurunan ekspresi p50 pada kelompok P1 (4.35 ± 2.27) dan P2 (2.99 ± 1.76). P1 mensupresi ekspresi p50 sekitar 1,5 *relative quantification* rendah dan P2 mensupresi ekspresi p50 sekitar 2,7 *relative quantification* dibanding K (5.72 ± 2.50). P2 menunjukkan supresi ekspresi IL-6 yang paling optimal.

Pada data deskriptif, ekspresi p50 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikasi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA, dan dilanjutkan uji Post-hoc LSD. Uji beda *One-way* ANOVA didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.4 dan tabel 5.3. Penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara kelompok P1 dan P2 dengan K.

5.1.4. Efek pemberian gel S-MSCs terhadap ekspresi mRNA p65 pada Tikus Model Hiperpigmentasi

Jalur pensinyalan NF-kB juga disusun oleh protein p65. Protein p65 bersama p50 secara umum merupakan dimer yang paling banyak terlibat dalam proses inflamasi⁹¹. Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan hasil bahwa gel S-MSCs mampu menurunkan ekspresi gen p65 secara signifikan pada jaringan kulit tikus model hiperpigmentasi (Gambar 5.4).



Gambar 5.6. Grafik ekspresi p65 pada semua kelompok penelitian

(* $p < 0,05$ = signifikan)

Tabel 5.4. Uji Post-hoc LSD ekspresi p65 antar kelompok penelitian

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi	Interval kepercayaan 95%	
			Batas Bawah	Batas Atas
S	K	0.000	-15.0046	-8.8074
	Veh	0.000	-16.4386	-10.2414
	P1	0.053	-6.1566	0.0406
	P2	0.170	-5.2126	0.9846
K	Veh	0.346	-4.5326	1.6646
	P1*	0.000	5.7494	11.9466
	P2*	0.000	6.6934	12.8906
Veh	P1*	0.000	7.1834	13.3806
	P2*	0.000	8.1274	14.3246
P1	P2	0.532	-2.1546	4.0426

Uji Post Hoc: * mean difference significant $P < 0,05$

Berdasarkan data diatas, P1 (4.09 ± 1.82) dan P2 (3.15 ± 1.69) secara signifikan mensupresi ekspresi mRNA p65. P1 mensupresi ekspresi p65 sekitar 9 *relative quantification* lebih rendah dan P2 mensupresi ekspresi IL-6

sekitar 9,8 *relative quantification* dibanding K (12.96 ± 3.69). P2 menunjukkan supresi ekspresi p65 yang paling optimal dan nilainya mendekati kelompok S, menandakan terjadinya supresi ekspresi p65 yang terkontrol.

Pada data deskriptif, ekspresi p65 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan uji homogenitas dengan menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai signifikansi semua kelompok $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji parametrik One-way ANOVA, dan dilanjutkan uji Post-hoc LSD. Uji beda *One-way* ANOVA didapatkan $p < 0,05$. Hasil uji *Post-hoc* LSD disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.5 dan tabel 5.4. Penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara kelompok P1 dan P2 dengan K.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Radiasi sinar UVB merupakan penyebab utama fotoaging kulit yang berdampak pada hiperpigmentasi yang ditandai dengan kondisi inflamasi yang berlebihan^{2,86}. Respon inflamasi yang diinduksi UVB dan fotoaging kulit disebabkan oleh aktivasi jalur pensinyalan NF-kB di epidermis yang berdampak pada sekresi berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-6⁹². Penelitian terdahulu melaporkan bahwa NF-kB berperan penting dalam *maintance* dan ekspansi proses fotoaging kulit²⁷. Hal ini mengesankan bahwa penekanan jalur pensinyalan NF-kB diharapkan dapat menekan respon inflamasi dan fotoaging yang diinduksi radiasi sinar UVB. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel

S-MSCs terhadap ekspresi mRNA IL-6, p50 dan p65 pada tikus model hiperpigmentasi. Analisis kemampuan anti-inflamasi gel S-MSCs tersebut dilakukan menggunakan model fotoaging kulit tikus jantan galur wistar karena merupakan mamalia dengan struktur kulit yang mirip dengan manusia. Tikus diinduksi menggunakan paparan sinar UVB dengan panjang gelombang 302 nm dan intensitas energi 390 mJ/cm² sebanyak tiga kali seminggu selama 2 minggu.

Penelitian ini menganalisis ekspresi mRNA IL-6 yang merupakan sitokin proinflamasi yang berperan dalam induksi inflamasi sistemik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan ekspresi mRNA IL-6 secara signifikan pada semua kelompok perlakuan dibanding kontrol, dimana penurunan optimum terjadi pada gel S-MSCs dengan dosis 200 uL. Hal ini diduga dapat terjadi karena kandungan IL-10 pada gel S-MSCs yang mampu berperan dalam penekanan proses inflamasi pada hiperpigmentasi, sehingga menurunkan ekspresi IL-6.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa IL-10 mampu berperan dalam penekanan inflamasi melalui aktivasi beberapa protein intraseluler, salah satunya adalah *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). IL-10 akan berikatan pada receptor dan mengaktifasi jalur pensinyalan *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3). Protein STAT3 akan masuk ke nukleus dan mengaktifasi sekuens mRNA SOCS3. Protein SOCS3 kemudian diekspresikan secara intraseluler dan menekan berbagai jalur pensinyalan proinflamasi, salah satunya adalah NF- κ B⁹³. Penekanan

jalur NF-kB akan berujung pada penurunan sekresi berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-6.

Penekanan jalur NF-kB tersebut didukung oleh penelitian ini, dimana pemberian gel S-MSCs pada semua perlakuan mampu menurunkan ekspresi mRNA p65 secara signifikan dibanding kontrol pada tikus model hiperpigmentasi. Penurunan ekspresi mRNA p65 paling optimal dihasilkan oleh gel S-MSCs dosis 200 uL hingga 3.15 ± 1.69 . Sisi lain, pemberian gel S-MSCs jg mampu memberikan tren penurunan pada ekspresi mRNA p50 hingga 2.99 ± 1.76 pada tikus model hiperpigmentasi. Penurunan ekspresi mRNA p50 dan p65 pada kelompok perlakuan mengesankan pemberian S-MSCs mampu menghambat proses inflamasi pada tikus model hiperpigmentasi. Kelompok perlakuan P1 dan P2 mampu menurunkan ekspresi gen p50 dan p65 serta berbeda signifikan dengan pemberian basis gel.

Protein p50 (NF-kB1) dan p65 (RelA) merupakan beberapa protein yang termasuk dalam anggota famili NF-kB dan bentuk paling umum protein NF-kB yang dapat membentuk heterodimer⁹⁴. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa kompleks heterodimer p50 dan p65 pada sitoplasma awalnya berada pada fase inaktif yang terikat pada protein inhibitor, *Inhibitory kappa B* (IkB)⁹⁵. Berbagai stimuli, seperti sitokin proinflamasi, UV dan radikal bebas yang terbentuk pada proses hiperpigmentasi mengaktifasi IkB kinase (IKK) kompleks yang selanjutnya memfosforilasi IkB protein dan berdampak pada polyubiquitinisasi dan proteolisis

molekul tersebut⁹⁶. Kompleks protein p50 dan p65 yang terlepas kemudian melakukan translokasi menuju nucleus, berinteraksi dengan sekuens DNA spesifik di dalam region promotor pada gen target dan memediasi proses transkripsi. Subunit p50 berperan penting dalam pengikatan NF- κ B pada berbagai region di DNA dan subunit p65 berperan dalam meregulasi aktivitas transkripsi kompleks DNA⁹⁷.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gel S-MSCs memiliki aktivitas anti-inflamasi pada model tikus hiperpigmentasi melalui penekanan ekspresi mRNA IL-6, p50 dan p65. Hal ini mengesankan bahwa S-MSCs memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai terapi yang tertarget dalam penekanan proses inflamasi, terutama pada hiperpigmentasi kulit.

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelemahan penelitian ini adalah peneliti tidak mengeksplorasi efek pemberian S-MSCs terhadap kadar, ekspresi protein intraseluler maupun ekspresi mRNA sitokin anti-inflamasi, seperti IL-10 yang diduga secara kuat sebagai salah satu faktor dalam penghambatan proses inflamasi. Penelitian ini juga tidak menganalisis protein intraseluler SOCS3 dan STAT3 yang merupakan jalur utama dalam menekan jalur NF- κ B. Sisi lain, penelitian ini juga tidak menggunakan variasi waktu pengamatan pada setiap fase penyembuhan inflamasi, proliferasi dan remodeling yaitu pada hari ke 3, 6, dan 9 pasca induksi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian gel S-MSCs dosis 200 μ L berpengaruh terhadap penurunan ekspresi mRNA p65 secara bermakna dan tren penurunan ekspresi mRNA p50 pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.
2. Pemberian gel S-MSCs dosis 200 μ L berpengaruh terhadap penurunan ekspresi mRNA IL-6 secara bermakna pada kulit tikus model hiperpigmentasi yang diinduksi paparan sinar UVB.

6.2 Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar, ekspresi protein intraseluler dan ekspresi mRNA IL-10 setelah dilakukan pemberian gel S-MSCs pada tikus model hiperpigmentasi.
2. Perlu pengukuran terhadap ekspresi protein SOSC3 setelah dilakukan pemberian gel S-MSCs pada tikus model hiperpigmentasi.
3. Perlu pengukuran terhadap ekspresi STAT3 setelah dilakukan pemberian gel S-MSCs pada tikus model hiperpigmentasi.

4. Perlu pengukuran pada beberapa variasi waktu pengamatan pada fase inflamasi, proliferasi dan remodeling setelah dilakukan pemberian gel S-MScs pada tikus model hiperpigmentasi.



DAFTAR PUSTAKA

- 1 Kim MR, Lee HS, Choi HS, Kim SY, Park Y, Suh HJ. Protective effects of ginseng leaf extract using enzymatic extraction against oxidative damage of UVA-irradiated human keratinocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; **173**: 933–945.
- 2 Kim HY, Sah SK, Choi SS, Kim TY. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci* 2018; **210**: 201–208.
- 3 Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ, Chiang HM. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3 β -ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless mouse skin. *Molecules* 2016; **21**: 1–14.
- 4 Yokawa K, Kagenishi T, Baluška F. UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of *Arabidopsis* root apices. *Front Plant Sci* 2016; **6**: 1–10.
- 5 Lingappan K. NF- κ B in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol* 2018; **7**: 81–86.
- 6 Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 994–1001.
- 7 Su CM, Wang L, Yoo D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep* 2021; **11**: 1–12.
- 8 Wan S, Liu Y, Shi J, Fan D, Li B. Anti-Hiperpigmentasi and Anti-Inflammatory Effects of Ginsenoside Rk3 During Exposure to UV Irradiation. *Front Pharmacol* 2021; **12**: 1–12.
- 9 Hwang IS, Kim JE, Choi S Il, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ *et al.* UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 392–400.
- 10 Su VYF, Lin CS, Hung SC, Yang KY. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ b pathway in endotoxin- induced acute lung injury. *Int J Mol Sci* 2019; **20**. doi:10.3390/ijms20092208.
- 11 Trisnadi S, Muhar AM, Putra A, Kustiyah AR. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate peritoneal adhesion through TGF- β inhibition. *Universa Med* 2020; **39**: 97.
- 12 Siebenga PS, van Amerongen G, Klaassen ES, de Kam ML, Rissmann R, Groeneveld GJ. The ultraviolet B inflammation model: Postinflammatory hyperpigmentation and validation of a reduced UVB exposure paradigm for

- inducing hyperalgesia in healthy subjects. *Eur J Pain (United Kingdom)* 2019; **23**: 874–883.
- 13 Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Ebell M, Epling JW *et al.* Screening for skin cancer US preventive services task force recommendation statement. *JAMA - J Am Med Assoc* 2016; **316**: 429–435.
 - 14 Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; **4**: 551–579.
 - 15 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; **70**: 7–30.
 - 16 Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, D’Alcontres FS. ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev* 2021; **2021**. doi:10.1155/2021/1208690.
 - 17 Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; **174**: 299–306.
 - 18 Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Hiperpigmentasi and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17060868.
 - 19 Pankajakshan D, Agrawal DK. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *J Biomed Technol Res* 2014; **1**: 1–21.
 - 20 Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji HL *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; **7**. doi:10.1038/cddis.2015.327.
 - 21 Xia X, Chiu PWY, Lam PK, Chin WC, Ng EKW, Lau JYW. Secretome from hypoxia-conditioned adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the healing of gastric mucosal injury in a rodent model. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2018; **1864**: 178–188.
 - 22 Jahandideh S, Khatami S, Eslami Far A, Kadivar M. Anti-inflammatory effects of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells secretome preconditioned with diazoxide, trimetazidine and MG-132 on LPS-induced systemic inflammation mouse model. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* 2018; **46**: 1178–1187.
 - 23 Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: 1196–1202.
 - 24 Kim YW, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 2014; **123**: 625–631.
 - 25 A. Letourneau P. Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Regulate Leukocyte-Endothelial Interactions and Activation of Transcription Factor NF-Kappa B. *J Tissue Sci Eng* 2011; **01**: 1–16.

- 26 Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: A role for p50. *Clin Exp Immunol* 2004; **135**: 64–73.
- 27 Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, Iddamalgoda A, Ito K, Kojima H *et al.* Protecting Skin Hiperpigmentasi by NF- κ B Inhibitor. *Curr Drug Metab* 2010; **11**: 431–435.
- 28 Oh JE, Kim MS, Jeon WK, Seo YK, Kim BC, Hahn JH *et al.* A nuclear factor kappa B-derived inhibitor tripeptide inhibits UVB-induced hiperpigmentasi process. *J Dermatol Sci* 2014; **76**: 196–205.
- 29 Chen S, He Z, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in hiperpigmentasi: basic science and literature review. *Stem Cell Res Ther* 2020; **11**: 1–15.
- 30 Balasubramanian S, Thej C, Walvekar A, Swamynathan P, Gupta PK, Seetharam RN *et al.* Evaluation of the Secretome Profile and Functional Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells-Derived Conditioned Medium Suggest Potential for Skin Rejuvenation. *J Cosmet Dermatological Sci Appl* 2017; **07**: 99–117.
- 31 Kim YJ, Seo DH, Lee SH, Lee SH, An GH, Ahn HJ *et al.* Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochem Biophys Reports* 2018; **16**: 96–102.
- 32 Robert AW, Azevedo Gomes F, Rode MP, Marques da Silva M, Veleirinho MB da R, Maraschin M *et al.* The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *J Tissue Eng* 2019; **10**. doi:10.1177/2041731419833391.
- 33 Prakoeswa CRS, Pratiwi FD, Herwanto N, Citrashanty I, Indramaya DM, Murtiastutik D *et al.* The effects of amniotic membrane stem cell-conditioned medium on hiperpigmentasi. *J Dermatolog Treat* 2019; **30**: 478–482.
- 34 Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Med* 2019; **38**: 164.
- 35 Li L, Ngo HTT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J *et al.* Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. doi:10.3390/ijms21010049.
- 36 Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017; **2**. doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
- 37 Hanke J. Role of NF κ B and Bcl-2 in IGFBP-3 mediated instrinsic apoptosis. *Grad Sch - New Brunswick Rutgers, State Univ NEw Jersey* 2017.
- 38 Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ *et al.* Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of

- green tea. *Biochem Pharmacol* 2006; **72**: 850–859.
- 39 Yao C, Lee DH, Oh JH, Kim MK, Kim KH, Park CH *et al.* Poly(I : C) induces expressions of MMP-1, -2, and -3 through various signaling pathways including IRF3 in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2015; **80**: 54–60.
- 40 Kuo YH, Chen CW, Chu Y, Lin P, Chiang HM. In vitro and in vivo studies on protective action of N-phenethyl caffeamide against photodamage of skin. *PLoS One* 2015; **10**: 1–13.
- 41 Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L *et al.* Interleukin-6: Molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–25.
- 42 Kwon KR, Alam MB, Park JH, Kim TH, Lee SH. Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *Spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes. *Nutrients* 2019; **11**. doi:10.3390/nu11061341.
- 43 Cooper S, Bowden G. Ultraviolet B Regulation of Transcription Factor Families: Roles of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) and Activator Protein-1 (AP-1) in UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; **7**: 325–334.
- 44 Wölfle U, Esser PR, Simon-Haarhaus B, Martin SF, Lademann J, Schempp CM. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 1081–1093.
- 45 Gupta A, Kaur CD, Jangdey M, Saraf S. Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy. *Ageing Res Rev* 2014; **13**: 65–74.
- 46 Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. doi:10.3390/ijms22083974.
- 47 Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Hiperpigmentasi: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006; **55**: 1–19.
- 48 Lan CCE. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. *Exp Dermatol* 2019; **28**: 23–27.
- 49 Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; **5**: 1–14.
- 50 Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin Hiperpigmentasi and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol* 2013; **2013**: 1–11.
- 51 Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and hiperpigmentasi. *Dermatol Nurs* 2008; **20**.
- 52 Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic

- factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci* 2008; **30**: 87–95.
- 53 Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Lab Anim Res* 2011; **27**: 1.
- 54 Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C *et al*. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int J Stem Cells* 2019; **12**: 218–226.
- 55 Schachtele S, Clouser C, Aho J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D Syst* 2018. <https://resources.rndsystems.com/images/site/wp-msc-13763.pdf> <https://www.rndsystems.com/resources/articles/markers-and-methods-verify-mesenchymal-stem-cell-identity-potency-and-quality>.
- 56 Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focus Tumor Microenviron Stem cells Metastasis* 2011. doi:10.5772/21325.
- 57 Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol* 2019; **10**: 1–10.
- 58 Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine : The Promise. 2014; : 135–156.
- 59 Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports* 2016; **2**: 168–173.
- 60 Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19092783.
- 61 Putra A, Pertiwi D, Milla MN, Indrayani UD, Jannah D, Sahariyani M *et al*. Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; **7**: 305–310.
- 62 Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014; **12**: 1–14.
- 63 Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* 2019; **8**: 467.
- 64 Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 552.
- 65 Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H *et al*. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–8.
- 66 Kevin Range and DMYAM. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* 2012; **23**: 1–7.

- 67 Lin PS, Chang HH, Yeh CY, Chang MC, Chan CP, Kuo HY *et al.* Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. *J Formos Med Assoc* 2017; **116**: 351–358.
- 68 Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 1482–1491.
- 69 Yang H, Li G, Wu JJ, Wang L, Uhler M, Simeone DM. Protein kinase a modulates transforming growth factor- β signaling through a direct interaction with Smad4 protein. *J Biol Chem* 2013; **288**: 8737–8749.
- 70 Gao Y, Tu D, Yang R, Chu CH, Gao HM, Hong JS. Through reducing ROS production, IL-10 suppresses caspase-1-dependent IL-1 β maturation, thereby preventing chronic neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–15.
- 71 Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes* 2013; **6**: 0–7.
- 72 Brand RM, Wipf P, Durham A, Epperly MW, Greenberger JS, Falo LD. Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1–10.
- 73 Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pereira Lima GP. Antioxidant activity of Y-oryzanol: A complex network of interactions. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17081107.
- 74 Rolfe AJ, Bosco DB, Wang J, Nowakowski RS, Fan J, Ren Y. Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell Biosci* 2016; **6**. doi:10.1186/s13578-016-0110-x.
- 75 Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L *et al.* Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep* 2020; **21**: 1421–1430.
- 76 Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Front Genet* 2018; **9**: 1–14.
- 77 Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC *et al.* The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; **6**: 1779–1783.
- 78 Porro C, Cianciulli A, Panaro MA. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. *Biomolecules* 2020; **10**: 1–15.
- 79 Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X *et al.* TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* 2013; **32**: 1549–1559.

- 80 Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF- κ B in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: Epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxidants Redox Signal* 2008; **10**: 799–811.
- 81 Schneider LA, Raizner K, Wlaschek M, Brenneisen P, Gethöffer K, Scharffetter-Kochanek K. UVA-1 exposure in vivo leads to an IL-6 surge within the skin. *Exp Dermatol* 2017; **26**: 830–832.
- 82 Omoigui S. The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging - Role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immun Ageing* 2007; **4**: 1–22.
- 83 Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol* 2018; **9**: 1–17.
- 84 Saggini A, Maccauro G, Tripodi D, De Lutiis MA, Conti F, Felaco P *et al.* Allergic inflammation: Role of cytokines with special emphasis on IL-4. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; **24**: 305–311.
- 85 Nishio T, Usami M, Awaji M, Shinohara S, Sato K. Dual effects of acetylsalicylic acid on ERK signaling and Mitf transcription lead to inhibition of melanogenesis. *Mol Cell Biochem* 2016; **412**: 101–110.
- 86 You YJ, Wu PY, Liu YJ, Hou CW, Wu CS, Wen KC *et al.* Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin. *Antioxidants* 2019; **8**: 1–16.
- 87 Bar-Or D, Thomas GW, Rael LT, Gersch ED, Rubinstein P, Brody E. Low Molecular Weight Fraction of Commercial Human Serum Albumin Induces Morphologic and Transcriptional Changes of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015;**4**(8):945-955.
- 88 Putra A, Widyatmoko A, Ibrahim S *et al.* Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia [version 3; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research.* 2021;**10**:228
- 89 Walter MR. The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;**380**:191-212.
- 90 Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;**2015**:137823.
- 91 Oh JE, Kim MS, Jeon WK, *et al.* A nuclear factor kappa B-derived inhibitor tripeptide inhibits UVB-induced photoaging process. *J Dermatol Sci.* 2014;**76**(3):196-205.
- 92 Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Malek S, Ghosh G. Mechanism of kB DNA binding by Rel/NF- κ B dimers. *J Biol Chem.* 2000;**275**:24392–99.
- 93 Cevey ÁC, Penas FN, Alba Soto CD, Mirkin GA, Goren NB. IL-

- 10/STAT3/SOCS3 Axis Is Involved in the Anti-inflammatory Effect of Benznidazole. *Front Immunol.* 2019;10:1267.
- 94 Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Investig* 2012;122:2601–12.
- 95 Makino S, Mitsutake N, Nakashima M, Saenko VA, Ohtsuru A, Umezawa K, et al. DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, suppresses growth and type I collagen accumulation in keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2008;51:171–80.
- 96 Huxford T, Ghosh G. A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a000075.
- 97 Siggers T, Chang AB, Teixeira A, et al. Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF- κ B family DNA binding. *Nat Immunol.* 2011;**13**(1):95-102.