

**PENGARUH PEMBERIAN MSCs-EXOSOME
HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI GEN IL-1 β
DAN CASPASE 1**

**(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Jantan dengan
Penurunan Kolagen Akibat Irradiasi Sinar UVB)**

Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

**Farah Diana Sari
MBK. 2321010349**

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN MSCs-EXOSOME HIPOKSIA
TERHADAP EKSPRESI GEN IL-1 DAN CASPASE 1
(Studi Eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Jantan dengan
Penurunan Kolagen Akibat Irradiasi Sinar UVB)**

Disusun oleh:

Farah Diana Sari

MBK. 2321010349

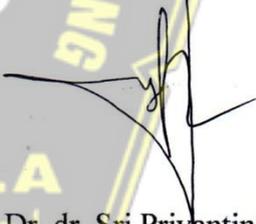
Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 28 Agustus 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk di terima

Menyetujui.

Pembimbing I

Pembimbing II


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


Dr. dr. Sri Priyantini, Sp.A
NIK. 210105097

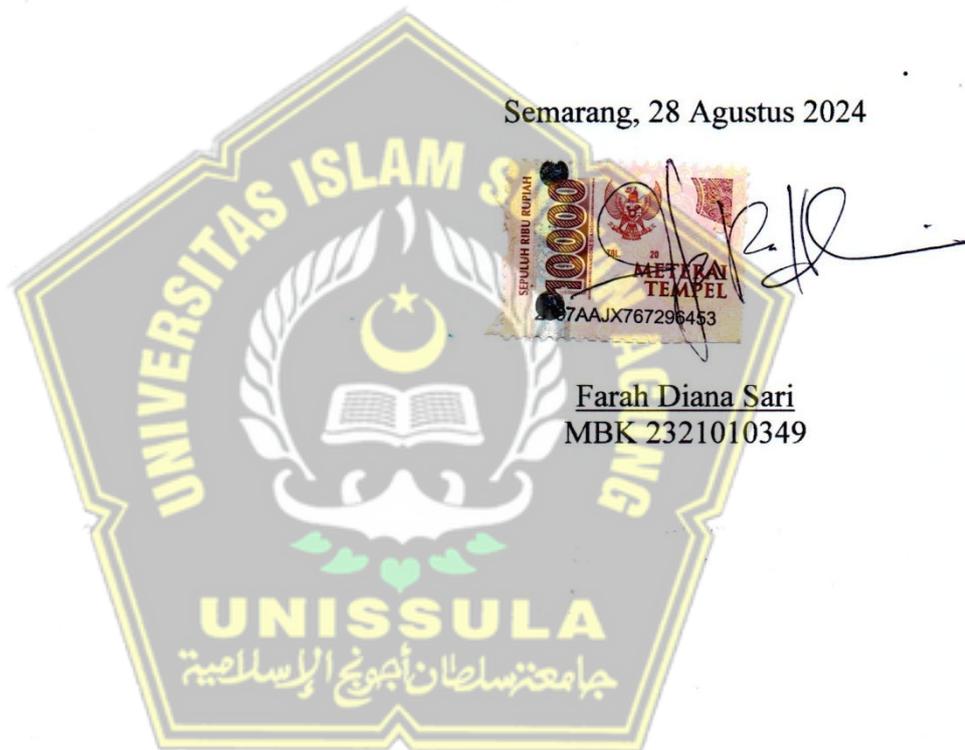
Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung


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

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini hasil dari pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh keserjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.

Semarang, 28 Agustus 2024



Farah Diana Sari
MBK 2321010349

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunianya pada penulis, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul: **PENGARUH PEMBERIAN MSCs-EXOSOME HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI GEN IL-1 β DAN CASPASE 1 (Study eksperimental *in Vivo* Pada Tikus Wistar Jantan dengan Penurunan Kolagen Akibat Irradiasi Sinar UVB).**

Tesis ini ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

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

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H,Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister dan pembimbing Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang sekaligus selaku pembimbing I dalam penelitian yang bersedia

meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.

4. Dr.dr. Sri Priyantini, Sp.A., selaku pembimbing II dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. Eko Setiawan, SP.B. selaku dosen penguji I yang meluangkan waktu dan pikiran untuk memberikan masukan kepada penulis selama proses penulisan tesis.
6. Prof. Dr. dr. Prasetyowati Subchan, Sp.D.V.E., Subsp. D.K.E., FINSADV, FAADV selaku dosen penguji II yang meluangkan waktu dan pikiran untuk memberikan masukan kepada penulis selama proses penulisan tesis.
7. Dr. Atina Husaana, M.Si.Apt. selaku dosen penguji III yang meluangkan waktu dan pikiran untuk memberikan masukan kepada penulis selama proses penulisan tesis.
8. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung atau tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
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. Aamiin yaa rabbal alamin.

Semarang, Agustus 2024

(Farah Diana Sari)



ABSTRAK

Latar Belakang: Penuaan kulit dan kerusakan akibat paparan sinar UVB mengakibatkan penurunan kolagen dan peningkatan peradangan, yang dapat dimodulasi oleh intervensi seluler seperti MSCs-exosome. MSCs-exosome diketahui memiliki potensi terapeutik dalam memperbaiki kerusakan jaringan melalui berbagai mekanisme, termasuk modulasi jalur inflamasi.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh pemberian MSCs-exosome yang diinduksi hipoksia terhadap ekspresi gen IL-1 β dan caspase-1 pada tikus Wistar jantan yang mengalami penurunan kolagen akibat iradiasi sinar UVB.

Metode: Studi eksperimental *in vivo* ini melibatkan 30 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok: kontrol, kelompok UVB, kelompok UVB dengan perlakuan Hyaluronic Acid, kelompok UVB dengan perlakuan MSCs-exosome hipoksia 200 μ L dan kelompok UVB dengan perlakuan MSCs-exosome hipoksia 300 μ L. Kelompok UVB dan MSCs-exosome hipoksia menerima paparan sinar UVB selama 2 minggu, dan menerima perlakuan MSCs-exosome yang diinduksi hipoksia 1 kali setelah paparan UVB. Setelah perlakuan, ekspresi gen IL-1 β dan caspase-1 diukur menggunakan teknik qRT-PCR pada jaringan kulit tikus.

Hasil: Paparan sinar UVB secara signifikan meningkatkan ekspresi IL-1 β dan caspase-1 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pemberian MSCs-exosome hipoksia menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 β dan caspase-1 yang signifikan dibandingkan dengan kelompok UVB tanpa perlakuan, mengindikasikan efek anti-inflamasi dan protektif terhadap kerusakan kolagen.

Kesimpulan: Pemberian MSCs-exosome yang diinduksi hipoksia memiliki potensi untuk menurunkan ekspresi gen IL-1 β dan caspase-1 pada tikus Wistar jantan yang mengalami penurunan kolagen akibat iradiasi sinar UVB. Temuan ini mendukung penggunaan MSCs-exosome hipoksia sebagai strategi terapeutik untuk mengatasi kerusakan kulit yang disebabkan oleh paparan sinar UVB.

Kata Kunci: MSCs-exosome, hipoksia, IL-1 β , caspase-1, sinar UVB, penurunan kolagen, inflamasi kulit.

ABSTRACT

Background: Ultraviolet B (UVB) irradiation induces significant skin damage by decreasing collagen levels and increasing inflammatory responses. Hypoxia-induced exosomes derived from mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as a promising therapeutic approach for tissue repair and inflammation modulation. This study investigates the effect of hypoxia-induced MSCs-exosomes on the expression of IL-1 β and caspase-1, key biomarkers of inflammation and apoptosis.

Objective: To evaluate the impact of hypoxia-induced MSCs-exosomes on IL-1 β and caspase-1 gene expression in Wistar male rats subjected to collagen degradation due to UVB irradiation.

Methods: An experimental in vivo study was conducted with 30 male Wistar rats divided into five groups: control, UVB, UVB + Hyaluronic Acid, UVB + hypoxia-induced MSCs-exosomes 200 μ L and UVB + hypoxia-induced MSCs-exosomes 300 μ L. UVB and UVB + MSCs-exosomes groups were exposed to UVB irradiation for 2 weeks to induce collagen degradation. Following irradiation, the UVB + MSCs-exosomes group received 1 time injection of hypoxia-induced MSCs-exosomes. IL-1 β and caspase-1 gene expression was measured using qRT-PCR in skin tissue samples to assess the intervention's effects.

Results: UVB exposure significantly increased the expression of IL-1 β and caspase-1 compared to the control group. Administration of hypoxia-induced MSCs-exosomes significantly reduced the expression of both genes compared to the UVB group, indicating an anti-inflammatory effect and a potential for reducing UVB-induced collagen damage.

Conclusion: Hypoxia-induced MSCs-exosomes effectively decrease IL-1 β and caspase-1 gene expression in rats with collagen degradation caused by UVB irradiation. These findings suggest that MSCs-exosomes under hypoxic conditions could be a viable therapeutic strategy for mitigating skin damage and inflammation associated with UVB exposure.

Keywords: MSCs-exosomes, hypoxia, IL-1 β , caspase-1, UVB irradiation, collagen degradation, skin inflammation.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN TESIS.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
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.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Interleukin-1 Beta (IL-1 β).....	6
2.1.1. Definisi IL-1 β	6
2.1.2. Mekanisme Aktivasi IL-1 β	7
2.1.3. Faktor Mempengaruhi Ekspresi IL-1 β	8
2.2. Caspase 1.....	9
2.2.1. Definisi Caspase 1.....	9
2.2.2. Mekanisme Aktivasi Caspase 1.....	10

2.3.	Ultra Violet B.....	12
2.3.1.	Definisi Ultraviolet B (UVB)	12
2.3.2.	Pengaruh UVB terhadap Jalur Aktivasi IL-1 β dan Caspase....	14
2.4.	Mesenchymal <i>Stem Cell</i> (MSC)	15
2.4.1.	Definisi Mesenchymal <i>Stem Cell</i> (MSC)	15
2.4.2.	<i>Exosome Mesenchymal Stem Cell</i>	17
2.4.3.	Peran Kondisi Hipoksia terhadap Sekresi Exosome MSC	18
2.4.4.	Peran Exosome MSC terhadap Ekspresi IL-1 β dan Caspase 1	20
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....		23
3.1.	Kerangka Teori	23
3.2.	Kerangka Konsep	26
3.3.	Hipotesis	26
BAB IV METODE PENELITIAN		27
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	27
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	28
4.2.1.	Variabel Penelitian	28
4.2.2.	Definisi Operasional	29
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	30
4.3.1.	Subyek Penelitian	30
4.3.2.	Sampel Penelitian	31
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	31
4.3.4.	Besar Sampel	32
4.4.	Alat dan Bahan	32
4.4.1.	Alat	32
4.4.2.	Bahan	34
4.5.	Cara Penelitian.....	34
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	34
4.5.2.	Prosedur Isolasi MSC dari <i>Umbilical Cord</i>	35
4.5.3.	Prosedur Isolasi Exosome.....	36
4.5.4.	Proses Hipoksia	36
4.5.5.	Paparan UVB Subyek Percobaan	37

4.5.6. Validasi Penurunan Kolagen.....	38
4.5.7. Pengambilan Sampel Jaringan.....	39
4.5.8. Ekstraksi RNA dan Sintesis Cdna.....	40
4.5.9. Pembacaan IL-1 β dan Caspase 1 dengan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> (qRT-PCR).....	41
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	42
4.6.1. Tempat Penelitian	42
4.6.2. Waktu Penelitian	42
4.7. Analisis Data.....	43
4.8. Alur Penelitian.....	44
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
5.1. Hasil Penelitian.....	45
5.1.1. Hasil Validasi MSCs.....	45
5.1.2. Hasil Validasi <i>Collagen Loss</i>	47
5.1.3. Kadar IL-1 β	49
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	54
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	61
6.1. Kesimpulan.....	61
6.2. Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA.....	62
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR SINGKATAN

Apaf-1	: <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
ASC	: <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
CARD	: <i>Caspase Recruitment Domain</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase-2 inhibitor</i>
DAMPs	: <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECM	: <i>Matriks Ekstraseluler</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated</i>
HA	: <i>Hyaluronic Acid</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HSC	: <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IL-IRa	: <i>Interleukin 1 Receptor Antagonist</i>
IL-IRAcP	: <i>IL-1 Receptor Accessory Protein</i>
IL-IR	: <i>IL-1 Receptor type 1</i>
IKK	: <i>I κB Kinase</i>
lncRNA	: <i>long Non-Coding RNA</i>
IRAK	: <i>IL 1 Receptor Associated Kinase</i>
JNK	: <i>C-Jun NH2-terminal kinase</i>
LPS	: <i>LipoPoliSakarida</i>
MED	: <i>Minimal Erythema Dose</i>
MiRNA	: <i>Micro RNA</i>
MMPs	: <i>Matriks Metalloproteinases</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MyD88	: <i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	: <i>Natrium Chlorida</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NFW	: <i>Nuclease Free Water</i>

p53	: <i>Tumor Protein p53</i>
PAMPs	: <i>Patogen Associated Molecular Patterns</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
TFF	: <i>Tangential Flow Filtration</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TLRs	: <i>Toll-Like Receptors</i>
TNF	: <i>Tumor Nekrosis Factor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TSG-6	: <i>TNF-Stimulated gene 6</i>
UVA	: <i>UltraViolet A</i>
UVB	: <i>UltraViolet B</i>
UVC	: <i>UltraViolet C</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Originalitas Penelitian.....	5
Tabel 5.1.	Data Hasil Analisis Kadar IL-1 β dan Caspase 1	50
Tabel 5.2.	Perbedaan rerata Ekspresi IL-1 β antar dua kelompok dengan Uji Post Tamhane	51
Tabel 5.3.	Perbedaan rerata ekspresi Caspase 1 antar dua kelompok dengan Uji Tamhane	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1.	Kerangka Teori	25
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep	26
Gambar 4.1.	Alur Perancangan Penelitian	28
Gambar 4.2.	Pengecatan <i>Masson Trichrome</i> pada tikus yang di papar sinar UV dan yang tidak di papar sinar UV	39
Gambar 4.3.	Alur Penelitian.....	44
Gambar 5.1.	(A) Isolasi MSC dengan konfluen 80% didapatkan gambaran sel berbentuk <i>spindle-like</i> (ditunjuk oleh anak panah) pada pembesaran 100x. (B) Analisis <i>flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31.	45
Gambar 5.2.	(A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) Adiposit setelah pemberian pewarna <i>alizarin red</i> dan <i>oil red o</i> pada perbesaran 100x (ditunjukkan dengan panah hitam).	46
Gambar 5.3.	Validasi <i>Collagen Loss</i> . Kerutan terlihat lebih jelas pada tikus yang terpapar UVB (B) dibandingkan dengan yang tidak terpapar (A). Kolagen yang ditunjukkan dengan warna biru (panah hitam) lebih sedikit terlihat pada kelompok yang dipapar UVB (D), dibanding dengan kelompok tanpa paparan UVB (C) .	48
Gambar 5.4.	Grafik Ekspresi Relatif IL-1 β pasca pemberian injeksi EH-MSK pada Tikus yang terpapar UVB	52
Gambar 5.5.	Grafik ekspersi relatif Caspase 1	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Ethical Clearance</i>	68
Lampiran 2.	Surat Keterangan Penelitian	69
Lampiran 3.	Hasil Analisis	70
Lampiran 4.	Hasil Data SPSS	72
Lampiran 5.	Dokumentasi Penelitian	75



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penelitian terkini melaporkan bahwa MSCs Exosome Hipoksia mengandung beragam jenis protein dan miRNA yang memiliki peran penting dalam proses antiinflamasi dan antiapoptosis. Beberapa protein yang terkandung di dalamnya meliputi interleukin-10 (IL-10), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), dan *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), yang memiliki sifat antiinflamasi dan pro-regeneratif. Sementara itu, miRNA seperti miR-146a dan miR-21 dikenal memiliki efek antiinflamasi dan antiapoptosis dengan menekan ekspresi gen pro-inflamasi dan pro-apoptosis.¹ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa 100 μ L MSCs Exosome Hipoksia mampu meningkatkan kolagen pada tikus yang terpapar UVB. Kombinasi protein dan miRNA ini bekerja sinergis dalam melindungi sel-sel dari kerusakan dan mempromosikan pemulihan jaringan. Namun demikian, penelitian mengenai peran MSCs Exosome Hipoksia dalam menekan ekspresi IL-1 β dan Caspase 1 masih terbatas sehingga perlu dilakukan.²⁻⁴

Ultraviolet B (UVB) dikenal dapat memicu radikal bebas berujung pada proses inflamasi yang dapat menyebabkan degradasi dan penurunan produksi kolagen yang merupakan protein utama penyokong kulit. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa protein proinflamasi seperti interleukin-1 beta (IL-1 β) dan caspase 1 berperan dalam mengurangi kolagen.⁵ Namun disisi lain MSCs Exosome Hipoksia diketahui

mengandung protein seperti IL-10 dan miRNA yang bersifat antiinflamasi dan proliferasif. Eksosom ini mengandung molekul sinyal dan protein yang dapat memodulasi respon inflamasi serta meningkatkan produksi kolagen. Potensi terapi dengan eksosom MSC sebagai agen anti-penuaan kemungkinan dapat berpengaruh terhadap penurunan IL-1 β dan caspase 1 pada kulit yang terpapar UVB, namun demikian hal ini perlu dibuktikan. Hal ini yang menyebabkan perlunya penelitian pengaruh pemberian MSCs Exosome Hipoksia terhadap IL-1 β dan caspase 1 untuk dilakukan.^{6,7}

Studi epidemiologi secara konsisten menunjukkan bahwa kehilangan kolagen akibat paparan sinar UVB cenderung meningkat, terutama di daerah-daerah tropis dengan tingkat paparan matahari tinggi seperti Indonesia. Populasi yang sering terpapar sinar matahari langsung, terutama di daerah tropis, memiliki risiko yang lebih tinggi mengalami kehilangan kolagen yang signifikan. Prevalensi yang tinggi ini terjadi pada berbagai kelompok usia, mulai dari dewasa muda hingga lanjut usia, menunjukkan bahwa paparan UVB dapat memengaruhi berbagai rentang usia. Meskipun terapi standar menggunakan *Hyaluronic Acid* (HA) untuk kondisi kehilangan kolagen akibat paparan UVB, peran HA terbatas pada menjaga hidrasi dan integritas *Extracellular Matriks* (ECM), menciptakan lingkungan yang mendukung sintesis dan pemeliharaan kolagen, namun tidak mengatasi inflamasi dan stres oksidatif yang menjadi penyebab utama kehilangan kolagen. Karena itu, penghentian penggunaan HA dapat menyebabkan kekambuhan kehilangan kolagen.

Ultraviolet B (UVB) merupakan salah satu pemicu utama kerusakan kulit yang menginduksi produksi IL-1 β . IL-1 β memicu aktivasi caspase-1, yang merupakan mediator utama inflamasi. Aktivasi caspase-1 menyebabkan pelepasan *Nuklear Factor Kappa B* (NF- κ B), yang meningkatkan produksi faktor sitokin pro-inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α). Peningkatan TNF- α dan aktivitas NF- κ B dapat mempercepat proses apoptosis sel-sel fibroblast melalui jalur yang terkait dengan protein-protein apoptosis. Apoptosis yang dipercepat ini pada akhirnya mengarah pada penurunan kolagen, menghasilkan kerusakan kulit yang signifikan.⁷

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan informasi yang disajikan sebelumnya, pertanyaan yang diajukan dapat dirumuskan sebagai berikut: Apakah pemberian MSCs Exosome Hipoksia mempengaruhi ekspresi gen IL-1 β dan Caspase 1 pada tikus yang mengalami paparan sinar UVB?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan keseluruhan dari penelitian ini adalah untuk menganalisa efek pemberian MSCs Exosome Hipoksia terhadap ekspresi gen IL-1 β dan Caspase 1 pada tikus Wistar yang terpapar sinar UVB.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan perbedaan ekspresi IL-1 β pada tikus wistar yang terpapar sinar UVB dan diberikan MSCs Exosome Hipoksia secara subkutan dengan dosis 200 μ L dan 300 μ L dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Untuk membuktikan perbedaan tingkat Caspase 1 pada tikus wistar yang terpapar sinar UVB dan diberi MSCs Exosome Hipoksia secara subkutan dengan dosis 200 μ L dan 300 μ L dibandingkan dengan kelompok kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Studi ini diharapkan memberikan bukti ilmiah mengenai efek dari pemberian MSCs Exosome Hipoksia terhadap ekspresi IL-1 β dan Caspase 1 pada tikus Wistar yang terpapar sinar UVB.

1.4.2. Manfaat Praktis

Harapan dari penelitian ini akan menjadi landasan bagi para praktisi medis dan industri untuk mengembangkan MSCs Exosome Hipoksia sebagai terapi untuk perlindungan kulit yang terkena paparan UVB.

1.5. Originalitas Penelitian

Berdasarkan kajian yang telah dilakukan, berikut merupakan penelitian terkait pengaruh penggunaan MSCs-Exosome:

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No.	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1.	Xiu <i>et al.</i> , 2022	MSCs-Derived miR-150-5p-Expressing Exosome Promote Skin Wound Healing by Activating PI3K/AKT Pathway through PTEN.	MSC-Exosome	Aktivasi PI3K/Akt-PTEN	MSC-Exosome mampu menurunkan apoptosis dan meningkatkan skin wound healing/penyembuhan luka
2.	Shen <i>et al.</i> , 2022	Exosomal microRNA -93 - p secrete by bone marrow mesenchymal stem cells downregulates apoptotic peptidase activating factor 1 to promote wound healing.	MSC-Exosome	miR-93- 3p/APAF-1	MSC-Exosome mampu menaikkan proliferasi dan migrasi sel pada proses apoptosis sel
3.	Hu <i>et al.</i> , 2020	Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress dermal fibroblasts-myofibroblasts transition via inhibiting the TGF- β 1/Smad 2/3 signaling pathway	MSC-Exosome	Inhibit the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway	MSC-Exosome mampu menurunkan apoptosis dan fibroblast-myofibroblast-blast transition
4.	Shen <i>et al.</i> , 2020	Ultraviolet B irradiation enhances the secretion of exosomes by human primary melanocytes and changes their exosomal miRNA profile	Exosome	UVB irradiation induced melanin production and increased the exosome release by the melanocytes.	Upregulated Exosomal miRNAs were miR-4488, miR-320d, and miR-7704 (fold change > 4.0).
5.	Choi <i>et al.</i> , 2019	Functional recovery in photo-damaged human dermal fibroblasts by human adipose-derived Stem Cell extracellular vesicles	MSC-Exosome	Overexpression of MMP-1, -2, -3 and -9 induced by UVB irradiation and enhanced the expression of collagen types I, II, III and V and elastin.	MSC-Exosome mampu menjadi agen anti-aging pada kulit
6.	He <i>et al.</i> , 2019	MSCS-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing	MSC-Exosome	miR-223 coated by MSCS - Exos regulates M2 polarization of macrophages by targeting Pknox 1	MSC-Exosome mampu mengobati pasien yang mengalami hiperpigmentasi
7.	Liao <i>et al.</i> , 2020	Antiaging Properties of Exosomes from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Photoaged Rat Skin	MSC-Exosome	Collagen, MMP degradation	100 μ L eksosom dapat peningkatan Kolagen dan penurunan MMP

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin-1 Beta (IL-1 β)

2.1.1. Definisi Interleukin-1 Beta (IL-1 β)

Interleukin-1 Beta (IL-1 β) merupakan bagian dari keluarga besar sitokin interleukin-1 (IL-1), yang mencakup IL-1 α dan IL-1 β . Kedua sitokin ini memainkan peran penting dalam respon inflamasi tubuh, tetapi IL-1 β adalah yang paling banyak dipelajari karena keterlibatannya dalam berbagai kondisi inflamasi dan autoimun. Selain IL-1 α dan IL-1 β , keluarga IL-1 juga meliputi IL-1 *Receptor antagonist* (IL-1Ra) dan IL-18, yang masing-masing memiliki peran unik dalam modulasi respon inflamasi.

Interleukin-1 beta (IL-1 β) adalah sebuah protein yang terdiri dari 153 asam amino, dengan berat molekul sekitar 17,5 kDa. Struktur tiga dimensi IL-1 β terdiri dari lembaran beta antiparalel yang membentuk silinder atau 'tong', karakteristik umum dari keluarga IL-1. Tidak seperti beberapa sitokin lainnya, IL-1 β tidak memiliki struktur yang sangat bergantung pada alfa-heliks, tetapi lebih pada lembaran beta yang memberikan stabilitas pada molekul tersebut.

Gen yang mengkode IL-1 β adalah IL1B, yang terletak pada kromosom 2q14. Gen ini terdiri dari tujuh ekson dan enam intron. Transkripsi IL1B diinduksi oleh berbagai sinyal inflamasi seperti

Lipopolisakarida (LPS), *Tumor Necrosis Factor* (TNF), dan interleukin-1 (IL-1) itu sendiri. Promotor dari gen IL1B memiliki beberapa elemen pengikat faktor transkripsi yang penting untuk regulasi ekspresinya.

Dalam penelitian yang melibatkan PCR untuk mendeteksi IL-1 β , primer yang sering digunakan adalah 5'-ATG GCA ACT GTT CCT GAA CT-3' sebagai forward primer dan 5'-CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CA-3' sebagai *reverse primer*. Primer ini dirancang untuk mengamplifikasi bagian spesifik dari gen IL1B, memungkinkan deteksi dan kuantifikasi ekspresi IL-1 β dalam sampel biologis.

2.1.2. Mekanisme Aktivasi IL-1 β

Interleukin-1 beta (IL-1 β) dihasilkan sebagai prekursor inaktif (pro-IL-1 β) yang membutuhkan pemrosesan oleh enzim caspase-1 dalam kompleks protein inflammasome untuk menjadi aktif. Proses ini sering dimulai oleh pengenalan ligan *Patogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) oleh reseptor seperti *Toll-Like Receptors* (TLRs), yang mengaktifkan jalur sinyal nuklir NF- κ B dan menyebabkan peningkatan transkripsi pro-IL-1 β .

Interleukin-1 beta (IL-1 β) mengikat reseptor spesifiknya, IL-1 *receptor type I* (IL-1R1), yang kemudian membentuk kompleks dengan IL-1 *Receptor Accessory Protein* (IL-1RAcP). Kompleks ini memulai serangkaian sinyal intraseluler yang mengaktifkan kaskade

sinyal *downstream* seperti MyD88, IRAK, dan TRAF6, yang pada akhirnya mengaktifkan faktor transkripsi seperti NF- κ B dan AP-1.

Aktivasi NF- κ B dan AP-1 oleh IL-1 β mengarah pada transkripsi gen-gen yang berperan dalam respons inflamasi, seperti TNF- α , IL-6, dan COX-2. Selain itu, jalur MAP kinase (p38, JNK, dan ERK) juga diaktifkan, yang berperan dalam pengaturan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam inflamasi dan respon imun.

2.1.3. Faktor Mempengaruhi Ekspresi IL-1 β

Ekspresi IL-1 β dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti infeksi, stres seluler, dan sinyal inflamasi lainnya. Protein-protein yang berperan dalam proses ini meliputi TLRs yang mendeteksi PAMPs, adaptor protein seperti MyD88, kinase seperti IRAK, dan faktor transkripsi seperti NF- κ B dan AP-1. Selain itu, mikroRNA juga dapat mengatur ekspresi IL-1 β dengan menghambat transkripsi atau mendegradasi mRNA IL-1 β . Secara keseluruhan, IL-1 β adalah molekul penting dalam sistem imun yang mengatur berbagai proses inflamasi melalui interaksi kompleks dengan berbagai protein dan jalur sinyal. Penelitian lebih lanjut tentang IL-1 β dan regulasinya dapat memberikan wawasan berharga untuk pengembangan terapi baru bagi penyakit inflamasi dan autoimun.

2.2. Caspase 1

2.2.1. Definisi Caspase 1

Caspase-1 adalah anggota keluarga protease sistein yang dikenal sebagai caspases, yang memainkan peran penting dalam proses inflamasi dan apoptosis. Keluarga caspase dibagi menjadi dua subkelompok utama: caspase inisiator (seperti caspase-2, -8, -9, dan -10) dan caspase eksekutor (seperti caspase-3, -6, dan -7). Caspase-1 termasuk dalam kelompok caspase inflamasi, yang juga mencakup caspase-4, -5, dan -12 pada manusia. Caspase inflamasi ini terlibat dalam pemrosesan dan aktivasi sitokin inflamasi seperti IL-1 β dan IL-18, yang berperan penting dalam respon inflamasi tubuh terhadap infeksi dan cedera.

Caspase-1 adalah protein yang terdiri dari 404 asam amino dengan berat molekul sekitar 45 kDa dalam bentuk precursor yang dikenal sebagai pro-caspase-1. Setelah diaktifkan, pro-caspase-1 dipecah menjadi subunit p20 dan p10, yang bersama-sama membentuk enzim aktif. Struktur kristal caspase-1 menunjukkan bahwa enzim ini membentuk homodimer untuk menjadi aktif, dengan situs aktif yang berisi residu katalitik sistein. Struktur tiga dimensi ini penting untuk fungsi proteolitik caspase-1 dalam mengaktifkan sitokin inflamasi.

Gen yang mengkode caspase-1 adalah CASP1, yang terletak pada kromosom 11q23. Gen ini terdiri dari 10 ekson dan 9 intron.

Ekspresi CASP1 diinduksi oleh berbagai sinyal inflamasi seperti LPS dan TNF. Promotor gen CASP1 memiliki beberapa elemen pengikat faktor transkripsi, termasuk NF- κ B, yang berperan dalam regulasi ekspresinya selama respon inflamasi. Aktivasi NF- κ B adalah langkah kunci dalam meningkatkan transkripsi CASP1 sebagai respons terhadap sinyal inflamasi.

Untuk mendeteksi ekspresi gen CASP1 menggunakan PCR, primer yang sering digunakan adalah: forward primer 5'-GGA GGA CAC TGA TGG AAA TGA G-3' dan reverse primer 5'-TGG AAG AAG AAG GCA GGT GAC-3'. Primer ini dirancang untuk mengamplifikasi bagian spesifik dari gen CASP1, memungkinkan deteksi dan kuantifikasi ekspresi caspase-1 dalam berbagai sampel biologis. Penggunaan primer yang tepat sangat penting untuk memastikan spesifisitas dan sensitivitas dalam analisis ekspresi gen.

2.2.2. Mekanisme Aktivasi Caspase 1

Aktivasi caspase-1 melibatkan pembentukan kompleks protein yang dikenal sebagai inflammasome. Inflammasome terdiri dari sensor seperti NLRP3, adaptor ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), dan pro-caspase-1. Aktivasi inflammasome sering dimulai oleh pengenalan PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) atau DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), yang menyebabkan oligomerisasi sensor

inflammasome dan rekrutmen ASC, yang pada gilirannya memfasilitasi autoproteolisis pro-caspase-1 menjadi caspase-1 aktif.

Reseptor yang terlibat dalam aktivasi caspase-1 adalah sensor inflammasome seperti NLRP3, NLRC4, dan AIM2. Sensor ini mendeteksi berbagai rangsangan patogen dan stres seluler. Setelah aktivasi, sensor ini mengikat ASC melalui domain CARD (*Caspase Recruitment Domain*), yang kemudian merekrut dan mengaktifkan pro-caspase-1. Proses ini menghasilkan pembentukan inflammasome yang aktif dan aktivasi caspase-1. Inflammasome adalah kompleks multiprotein yang memainkan peran penting dalam memediasi respons inflamasi yang cepat.

Aktivasi caspase-1 memerlukan kaskade sinyal yang melibatkan berbagai faktor transkripsi. NF- κ B adalah faktor transkripsi utama yang menginduksi ekspresi pro-IL-1 β dan pro-IL-18, yang kemudian diproses oleh caspase-1. Aktivasi NF- κ B dapat diinduksi oleh sinyal inflamasi seperti LPS melalui TLR4 (*Toll-like receptor 4*), yang mengaktifkan kompleks MyD88-IRAK-TRAF6 dan menyebabkan translokasi NF- κ B ke dalam nukleus. Aktivasi ini adalah langkah kunci dalam jalur inflamasi yang mengarah pada produksi sitokin inflamasi.

Ekspresi caspase-1 dipengaruhi oleh berbagai faktor termasuk infeksi, stres seluler, dan sinyal inflamasi. Protein seperti p53, yang berfungsi sebagai penjaga genom, juga dapat mempengaruhi

ekspresi caspase-1. Sitokrom C, yang dilepaskan dari mitokondria selama stres seluler, dapat berinteraksi dengan APAF-1 untuk membentuk apoptosome, yang kemudian mengaktifkan caspase-9 dan mengarah pada aktivasi caspase eksekutor seperti caspase-3. Selain itu, protein adaptor seperti ASC dan sensor inflammasome seperti NLRP3 memainkan peran kunci dalam aktivasi caspase-1. Regulasi kompleks dari ekspresi dan aktivasi caspase-1 menunjukkan pentingnya protein ini dalam menjaga keseimbangan antara respon inflamasi dan apoptosis, yang kritis untuk kesehatan dan homeostasis seluler.

2.3. Ultra Violet B

2.3.1. Definisi Ultraviolet B (UVB)

Ultraviolet (UV) merupakan bagian dari spektrum elektromagnetik yang memiliki panjang gelombang lebih pendek dari cahaya tampak tetapi lebih panjang dari sinar-X. UV dibagi menjadi tiga jenis berdasarkan panjang gelombangnya: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), dan UVC (100-280 nm). UVA memiliki panjang gelombang terpanjang dan dapat menembus lapisan kulit yang lebih dalam hingga ke dermis. UVB memiliki panjang gelombang menengah dan sebagian besar diserap oleh lapisan epidermis. UVC memiliki panjang gelombang terpendek dan paling berbahaya, tetapi diserap sepenuhnya oleh lapisan ozon atmosfer dan tidak mencapai permukaan bumi.

Kedalaman penetrasi masing-masing jenis UV ke dalam kulit berbeda-beda. UVA, dengan panjang gelombangnya yang lebih panjang, mampu menembus jauh ke dalam dermis, lapisan kulit di bawah epidermis. Dampaknya termasuk penuaan kulit dini dan kerusakan DNA jangka panjang yang dapat memicu kanker kulit. UVB, di sisi lain, terutama diserap oleh lapisan epidermis, lapisan kulit terluar. Paparan UVB menyebabkan kerusakan DNA langsung pada sel kulit di epidermis dan bertanggung jawab atas *sunburn* (kulit terbakar). UVC, meskipun tidak mencapai permukaan bumi, sangat berbahaya dan mampu menyebabkan kerusakan DNA yang parah jika terpapar.

Dampak UVB pada kulit sangat signifikan dan beragam. UVB memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel kulit. Kerusakan ini dapat mengaktifkan jalur sinyal inflamasi, termasuk aktivasi inflammasome dan NF- κ B, yang pada akhirnya meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β . Paparan berlebihan terhadap UVB juga menyebabkan *sunburn*, ditandai dengan kemerahan, nyeri, dan peradangan pada kulit. Selain itu, kerusakan DNA akibat UVB dapat memicu mekanisme perbaikan DNA yang tidak sempurna, meningkatkan risiko mutasi yang dapat menyebabkan kanker kulit seperti karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa. Penurunan fungsi fibroblas dan produksi

kolagen akibat apoptosis yang diinduksi oleh UVB juga berkontribusi pada penuaan kulit.

2.3.2. Pengaruh UVB terhadap Jalur Aktivasi IL-1 β dan Caspase

Paparan radiasi UVB dapat mengaktifkan jalur produksi IL-1 β melalui beberapa mekanisme molekuler yang dimediasi oleh NADPH oxidase dan ROS. Ketika kulit terpapar UVB, NADPH oxidase diaktifkan, yang mengarah pada peningkatan produksi ROS. ROS ini berperan sebagai sinyal bahaya yang memicu berbagai jalur sinyal seluler. Salah satu jalur utama yang diaktifkan oleh ROS adalah jalur NF- κ B. Aktivasi NF- κ B dimulai dengan aktivasi reseptor permukaan sel seperti *Toll-like Receptors* (TLRs), yang kemudian mengaktifkan adaptor protein MyD88 dan kompleks IKK (*Inhibitor κ B kinase*). Kompleks IKK memfosforilasi I κ B, inhibitor dari NF- κ B, yang mengarah pada degradasi I κ B dan memungkinkan NF- κ B untuk masuk ke nukleus.

Di dalam nukleus, NF- κ B meningkatkan transkripsi berbagai gen pro-inflamasi, termasuk pro-IL-1 β . Peningkatan transkripsi IL-1 β menyediakan substrat yang diperlukan untuk diaktifkan oleh caspase-1. IL-1 β yang diproduksi dalam bentuk precursor (pro-IL-1 β) memerlukan pemrosesan oleh inflammasome untuk menjadi bentuk aktifnya. Inflammasome NLRP3, yang juga diaktifkan oleh ROS, berinteraksi dengan adaptor protein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) dan pro-caspase-

1. Kompleks inflammasome ini mengaktifkan caspase-1, yang kemudian memotong pro-IL-1 β menjadi IL-1 β aktif. IL-1 β aktif ini kemudian dilepaskan dari sel dan memediasi respon inflamasi lebih lanjut.

Produksi IL-1 β yang berlebihan akibat paparan UVB dapat memicu jalur yang mengarah pada apoptosis fibroblas. Aktivasi caspase-1, selain memproses IL-1 β , juga dapat memicu kematian sel inflamasi melalui jalur apoptosis. Apoptosis fibroblas yang diinduksi oleh aktivasi caspase-1 menyebabkan penurunan jumlah fibroblas fungsional di dermis kulit, yang berakibat pada penurunan produksi kolagen. Kolagen adalah komponen utama matriks ekstraseluler yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada kulit. Penurunan kolagen akibat apoptosis fibroblas dapat menyebabkan tanda-tanda penuaan kulit seperti kerutan dan kehilangan elastisitas. Dengan demikian, radiasi UVB tidak hanya menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan produksi ROS, tetapi juga memicu respon inflamasi yang mengarah pada penurunan kualitas jaringan kulit melalui jalur inflammasome dan apoptosis.

2.4. Mesenchymal Stem Cell (MSC)

2.4.1. Definisi Mesenchymal Stem Cell (MSC)

Mesenchymal Stem Cell (MSC) adalah sel induk *multipotent* yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, termasuk osteoblas, kondrosit, dan adiposit. MSC

umumnya diidentifikasi melalui ekspresi *surface marker* spesifik, seperti CD73, CD90, dan CD105, dengan persentase ekspresi yang sangat tinggi. CD73 dan CD90 biasanya diekspresikan pada lebih dari 95% dari seluruh populasi MSC, sementara CD105 juga hadir pada persentase yang tinggi, sekitar 90-95%. Identifikasi ini penting untuk memastikan kemurnian dan karakteristik MSC yang tepat untuk aplikasi terapeutik.

Selain *surface marker* yang tinggi, MSC juga harus menunjukkan negatif untuk marker *Hematopoietic Stem Cell* (HSC) lineage, seperti CD34 dan CD45. Hal ini memastikan bahwa populasi MSC tidak terkontaminasi dengan sel hematopoietik yang memiliki karakteristik dan fungsi berbeda. MSC juga harus tidak mengekspresikan marker sel endotelial seperti CD31, sehingga lebih mempertegas kemurnian sel MSC yang digunakan. Verifikasi ini dilakukan melalui *flow cytometry* atau teknik molekuler lainnya yang memastikan MSC yang digunakan dalam penelitian dan terapi memiliki karakteristik yang sesuai dengan standar internasional.

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa MSC mensekresikan berbagai biomolekul aktif sebagai bentuk komunikasi yang disebut sebagai sekretom. Sekretom terdiri dari protein dan eksosom yang mengandung berbagai macam komponen seperti asam amino, asam lemak materi genetik seperti miRNA dan siRNA. Eksosom yang dikeluarkan oleh MSC berperan dalam komunikasi antar sel dan

modulasi respons imun. Eksosom MSC telah terbukti memiliki efek terapeutik pada berbagai kondisi, seperti peradangan, luka, dan penyakit degeneratif. Potensi ini menjadikan MSC dan eksosomnya sebagai kandidat kuat untuk pengembangan terapi berbasis sel dan terapi non-seluler yang menawarkan alternatif yang aman dan efektif dalam bidang medis modern.

2.4.2. Exosome Mesenchymal Stem Cell

Exosome yang dilepaskan oleh *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) mengandung berbagai jenis molekul bioaktif, termasuk protein dan RNA, yang memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel dan modulasi respons biologis. Protein yang terdapat dalam eksosom MSC mencakup berbagai kategori, seperti enzim, faktor pertumbuhan, dan sitokin. Beberapa protein penting termasuk TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*) yang berperan dalam proses imunomodulasi dan regenerasi jaringan, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) yang berfungsi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan, serta VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) yang mendukung angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru. Selain itu, exosome MSC juga mengandung enzim proteolitik seperti *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) yang membantu dalam remodeling jaringan dan penyembuhan luka.

Lipid dalam eksosom MSC, seperti fosfolipid, kolesterol, dan ceramide, tidak hanya mempertahankan integritas struktural vesikel

tetapi juga berperan dalam fusi membran dan pengiriman muatan bioaktif ke sel target. Kombinasi lipid ini memberikan stabilitas dan fungsionalitas pada exosome, memastikan bahwa muatan molekul bioaktif dapat diantarkan secara efektif ke sel penerima.

Di sisi RNA, eksosom MSC mengandung berbagai jenis RNA, termasuk mRNA, microRNA (miRNA), dan long non-coding RNA (lncRNA). miRNA khususnya memiliki peran penting dalam regulasi gen melalui mekanisme post-transkripsi. Beberapa miRNA yang sering ditemukan dalam exosome MSC meliputi miR-21, miR-146a, dan miR-124. miR-21 terlibat dalam mengatur apoptosis dan proliferasi sel, serta memiliki peran dalam proses penyembuhan luka dan respon inflamasi. MiR-146a dikenal karena fungsinya dalam mengatur respon imun dan inflamasi dengan menekan ekspresi gen pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α . MiR-124 berperan dalam neuroproteksi dan diferensiasi sel saraf, menjadikannya penting dalam aplikasi terapi untuk gangguan neurologis. Kombinasi dari berbagai jenis miRNA ini memungkinkan eksosom MSC untuk secara efektif memodulasi aktivitas sel target dan menawarkan potensi terapeutik yang luas dalam berbagai kondisi penyakit.

2.4.3. Peran Kondisi Hipoksia terhadap Sekresi Exosome MSC

Hipoksia, atau kondisi kekurangan oksigen, berdampak signifikan pada peningkatan sekresi eksosom oleh MSC yang berperan dalam regulasi kolagen. Eksosom adalah vesikel kecil yang

dilepaskan oleh sel dan memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel dan pengangkutan molekul bioaktif.

Kondisi hipoksia mengaktifkan jalur *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α), yang berfungsi sebagai regulator utama respons sel terhadap rendahnya kadar oksigen. Aktivasi HIF-1 α meningkatkan ekspresi gen yang terkait dengan pembentukan dan pelepasan eksosom. MSCs Exosome Hipoksia mengandung lebih banyak faktor pertumbuhan, sitokin, dan miRNA yang dapat mempengaruhi regulasi kolagen.

MSCs Exosome Hipoksia mengandung berbagai molekul bioaktif yang mengalami peningkatan, termasuk:

1. MiRNA: MikroRNA seperti miR-21, miR-210, dan miR-126 meningkat di bawah hipoksia. MiRNA ini terlibat dalam modulasi ekspresi gen yang berperan dalam sintesis kolagen dan proses penyembuhan luka.
2. Faktor Pertumbuhan: Eksosom mengandung peningkatan jumlah faktor pertumbuhan seperti VEGF, TGF- β , dan IGF. Faktor-faktor ini merangsang fibroblas untuk meningkatkan produksi kolagen dan angiogenesis.
3. Sitokin dan Chemokin: Eksosom mengandung sitokin seperti IL-6 dan chemokin yang dapat meningkatkan respon inflamasi yang terkontrol, yang penting untuk proses penyembuhan dan perbaikan jaringan.

4. Protein Ekstraseluler: Protein seperti kolagen tipe I dan III, fibronectin, dan laminin juga ditemukan dalam eksosom, yang berperan langsung dalam memperkuat matriks ekstraseluler dan mendukung sintesis kolagen baru.

Peningkatan regulasi kolagen melalui MSCs Exosome Hipoksia penting untuk terapi regeneratif dan perbaikan jaringan, termasuk pada kondisi penurunan kolagen akibat paparan UVB. Kolagen adalah komponen utama matriks ekstraseluler yang memberikan kekuatan dan struktur pada jaringan. MSCs Exosome Hipoksia dapat meningkatkan sintesis kolagen oleh fibroblas, sel yang bertanggung jawab atas produksi kolagen. Ini dapat mempercepat proses penyembuhan luka, memperbaiki kerusakan jaringan, dan meningkatkan kualitas jaringan yang diregenerasi.

2.4.4. Peran *Exosome* MSC terhadap Ekspresi IL-1 β dan Caspase 1

Exosome yang dilepaskan oleh *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) memainkan peran penting dalam modulasi respon inflamasi dan apoptosis, terutama melalui pengaruhnya terhadap ekspresi IL-1 β (Interleukin 1 beta) dan Caspase 1. IL-1 β adalah sitokin pro-inflamasi utama yang berperan dalam memediasi respon inflamasi akut dan kronis. *MSC-derived exosomes* telah terbukti dapat mengurangi ekspresi IL-1 β dengan mengantarkan molekul bioaktif, termasuk microRNA (miRNA), yang menekan jalur sinyal pro-inflamasi. Sebagai contoh, miR-146a dan miR-21 yang terkandung

dalam eksosom MSC dapat menghambat aktivasi NF- κ B, suatu faktor transkripsi yang penting dalam produksi IL-1 β , sehingga membantu menurunkan respon inflamasi dan mengurangi kerusakan jaringan.

Selain itu, Caspase-1 adalah enzim protease yang terlibat dalam aktivasi IL-1 β dari bentuk precursor yang tidak aktif menjadi bentuk aktifnya melalui proses yang dikenal sebagai inflammasome. Exosome MSC dapat memodulasi aktivitas inflammasome dengan menurunkan ekspresi dan aktivasi Caspase-1. Molekul-molekul tertentu dalam eksosom MSC, seperti protein antiinflamasi TSG-6 (TNF-*stimulated gene 6*) dan STC1 (Stanniocalcin-1), serta miRNA seperti miR-223 dan miR-181a, bekerja untuk menekan jalur inflammasome NLRP3, yang merupakan salah satu mekanisme utama dalam aktivasi Caspase-1. Dengan mengurangi aktivasi Caspase-1, eksosom MSC secara langsung mengurangi produksi IL-1 β aktif, sehingga menekan respon inflamasi yang berlebihan dan melindungi jaringan dari kerusakan yang disebabkan oleh inflamasi kronis.

Peran modulator dari eksosom MSC terhadap IL-1 β dan Caspase-1 menjadikannya alat terapeutik potensial dalam mengobati berbagai penyakit inflamasi dan autoimun. Dengan menargetkan dan menekan jalur inflamasi ini, eksosom MSC dapat membantu mengurangi peradangan, mencegah kerusakan jaringan, dan

mempercepat proses penyembuhan. Misalnya, dalam konteks penyakit inflamasi seperti *rheumatoid arthritis* atau penyakit Crohn, eksosom MSC dapat menurunkan ekspresi IL-1 β dan menghambat aktivasi Caspase-1, sehingga mengurangi peradangan dan nyeri yang berkaitan dengan penyakit-penyakit ini. Dengan demikian, terapi berbasis eksosom MSC menawarkan pendekatan baru yang menjanjikan untuk pengobatan berbagai kondisi inflamasi yang sulit ditangani dengan terapi konvensional.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

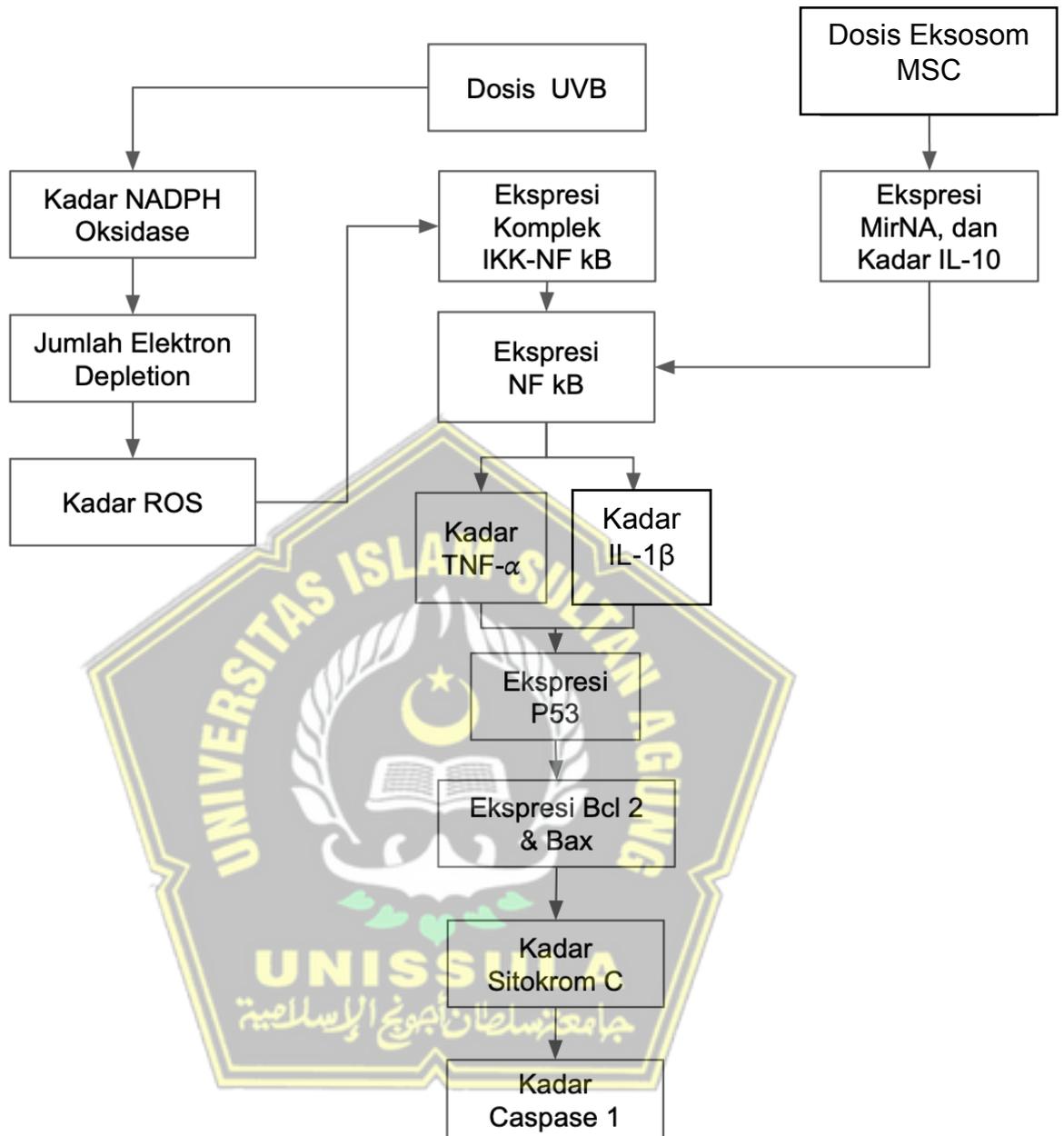
Paparan sinar ultraviolet B (UVB) telah terbukti sebagai faktor utama yang menyebabkan kerusakan kulit, termasuk penurunan kadar kolagen. UVB merangsang produksi IL-1 β dalam sel fibroblas. IL-1 β memicu jalur sinyal yang melibatkan *faktor nuklir kappa B* (NF- κ B) dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α). Aktivasi NF- κ B memperkuat respons inflamasi dan apoptotik dengan meningkatkan ekspresi TNF- α . TNF- α , pada gilirannya, dapat memodulasi ekspresi protein pro-apoptosis seperti Bax, dan mengurangi ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2.

Perubahan dalam rasio Bax/Bcl-2 menyebabkan pelepasan sitokrom C dari mitokondria ke sitoplasma. Sitokrom C kemudian membentuk kompleks dengan *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (Apaf-1) dan procaspase-9, membentuk apoptosom. Ini mengaktifkan caspase-9, yang kemudian mengaktifkan caspase-3, inisiasi fase eksekusi dari jalur apoptotik.

Selain itu, TNF- α juga dapat meningkatkan ekspresi p53, yang merupakan regulator kunci apoptosis. Peningkatan p53 menyebabkan aktivasi langsung Bax, memperkuat jalur apoptotik. Pada saat yang sama, p53 juga dapat mengatur ekspresi caspase-1, yang merupakan mediator utama inflamasi dan juga dapat memodulasi jalur apoptosis.

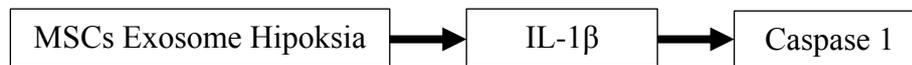
Dalam konteks ini, apoptosis sel fibroblas dipicu oleh sinar UVB melalui berbagai jalur, termasuk melalui regulasi ekspresi IL-1 β , TNF- α dan p53. Pelepasan sitokrom C dan aktivasi caspase-1 menjadi titik penting dalam proses ini, mengarah pada kematian sel fibroblas. Akibatnya, kolagen dalam jaringan kulit menurun karena hilangnya sel-sel fibroblas yang penting untuk produksi kolagen.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

MSC Exosome Hipoksia menurunkan ekspresi gen IL-1 β dan Caspase 1 pada tikus wistar yang diinduksi sinar UVB antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.



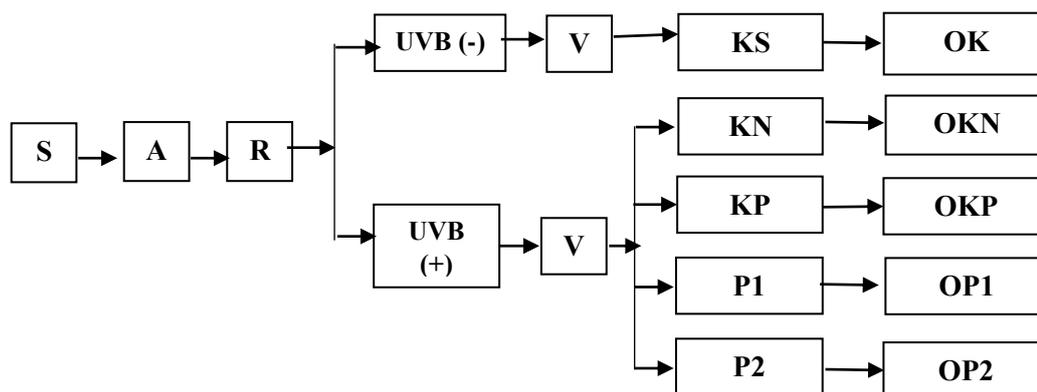
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *Posttest only control group* dengan metode rancang acak lengkap dengan empat kali ulangan per perlakuan. Objek penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan bobot badan 200-250 gram. Perlakuan terdiri dari:

1. Tikus sehat tanpa paparan UVB, Kelompok: Normal
2. Kontrol Negatif atau Kelompok Sham (Tikus yang dipapar UVB mengalami penurunan kolagen dengan perlakuan pemberian NaCl dosis 300 μ L secara subkutan), Kelompok: KN
3. Kontrol Positif (Tikus yang dipapar UVB mengalami penurunan kolagen dengan perlakuan pemberian *Hyaluronic Acid* (HA) dosis 200 μ L secara subkutan), Kelompok: KP
4. Perlakuan 1 (Tikus yang dipapar UVB mengalami penurunan kolagen dengan pemberian MSCs Exosome Hipoksia dosis 200 μ L secara subkutan), Kelompok: P1
5. Perlakuan 2 (Tikus yang dipapar UVB mengalami penurunan kolagen dengan pemberian MSCs Exosome Hipoksia dosis 300 μ L secara subkutan), Kelompok: P2



Gambar 4.1. Alur Perancangan Penelitian

Keterangan:

- S : Sampling
 A : Adaptasi
 R : Randomized
 UVB (+) : Pemberian paparan UVB
 UVB (-) : Tanpa paparan UVB
 V : Validasi pembentukan animal model penurunan kolagen
 P1 : Pemberian MSCs Exosome Hipoksia dosis 200 μ L
 P2 : Pemberian MSCs Exosome Hipoksia dosis 300 μ L
 OKS : Observasi Kelompok Normal
 OKN : Observasi Kontrol Negatif
 OKP : Observasi Kontrol Positif
 OP1 : Observasi Perlakuan 1
 OP2 : Observasi Perlakuan 2

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas: MSCs Exosome Hipoksia dosis 200 μ l dan 300 μ L.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel dependen: Ekspresi gen IL-1 β dan Caspase 1.

4.2.1.3. Variabel Prakondisi

Variabel prakondisi dalam penelitian ini adalah sinar UV-B.

4.2.1.4. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah strain tikus wistar, umur, jenis kelamin, berat badan, nutrisi/pakan tikus, dan kondisi lingkungan tempat pemeliharaan hewan coba.

4.2.2. Definisi Operasional

4.2.2.1. MSCs Exosome Hipoksia

MSCs Exosome Hipoksia adalah vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSCs yang mengekspresikan marker CD9, CD63, CD81. EH-MSK diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs Exosome Hipoksia yang kemudian difiltrasi menggunakan *Tangential Flow Filtration (TFF)*, dengan ukuran filter 100-500 kDa. MSCs Exosome Hipoksia dibuat dalam sediaan injeksi yang memiliki kondisi isotonis dan isohidris. Kondisi Isotonis didapatkan dengan menambahkan larutan NaCl 0,9%. Sediaan MSCs Exosome Hipoksia diukur menggunakan pH meter dan osmometer untuk mengetahui kondisi Isotonis dan Isohidris. MSCs Exosome Hipoksia diberikan secara injeksi subkutan di area kulit dengan dosis 200 μ L untuk P1 dan 300 μ L untuk P2. Skala: Rasio

4.2.2.2. Ekspresi Gen IL-1 β

Ekspresi IL-1 β adalah jumlah mRNA protein IL-1 β yang dianalisis dari sampel jaringan kulit di area penyinaran yang dengan metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang disajikan dalam bentuk presentase. Skala: Rasio

4.2.2.3. Ekspresi Gen Caspase 1

Ekspresi Caspase 1 adalah jumlah mRNA protein Caspase 1 yang dianalisis dari sampel jaringan kulit di area penyinaran diambil dan dilakukan ekstraksi RNA untuk dianalisis 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 dalam kondisi sehat dan dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh dokter hewan dari *Animal House* di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* Semarang (SCCR) yang dipapar sinar UVB 302 nm dengan energi 160 mJ/cm²/hari selama 8 menit dengan jarak 20 cm, 5 hari dalam seminggu yaitu pada hari ke 1,2,4,5,dan 7 selama 2 minggu hingga berkurangnya densitas kolagen.

4.3.2. Sampel Penelitian

Kriteria Inklusi:

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus jantan galur wistar dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat, aktif dan tingkah laku normal
3. Bobot badan 200-250 gram.
4. Tidak ada kelainan anatomis

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini dipilih menggunakan metode *randomized sampling*. Tikus jantan galur Wistar dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok pertama terdiri dari tikus sehat yang tidak mengalami penurunan kolagen akibat paparan UVB. Kelompok kedua merupakan kontrol negatif, di mana tikus model yang terpapar UVB dan mengalami penurunan kolagen diberi larutan NaCl. Kelompok ketiga adalah kontrol positif, yang terdiri dari tikus model yang terpapar UVB dan mengalami penurunan kolagen, kemudian diberi *Hyaluronic Acid*.

Perlakuan pertama melibatkan pemberian MSCs Exosome Hipoksia dengan dosis 200 µl secara subkutan pada tikus model yang terpapar UVB dan mengalami penurunan kolagen. Perlakuan kedua melibatkan pemberian MSCs Exosome Hipoksia dengan dosis

300 µl secara subkutan pada tikus model yang mengalami penurunan kolagen akibat paparan UVB.

4.3.4. Besar Sampel

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Perhitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah tikus 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan peneliti yaitu minimal 5 ekor tikus perkelompok, dengan tambahan 1 tikus perkelompok sebagai cadangan.

Keterangan:

t = banyaknya perlakuan

n = banyak sampel setiap perlakuan

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Peralatan untuk Kultur Sel:

1. *Biosafety Cabinet* (BSC)
2. Mikropipet
3. Inkubator CO₂

4. *Dissecting Kit*
5. Flask 25T
6. *Hypoxic Chamber*
7. Oksigen-meter

Peralatan untuk Paparan UVB:

1. UVB Light (*broadband, peak emission* pada 302 nm)
2. Steril Swab

Peralatan untuk Pengumpulan Data:

1. Tabung Hematokrit
2. *Biopsy Punch* 6 mm
3. Sentrifuge
4. Mikropipet
5. Micropipet Tip 1000 μ L
6. Pisau Cukur
7. Kandang Paparan
8. Kandang Pemeliharaan
9. Tempat Air Minum Tikus

Peralatan untuk Analisis Ekspresi Gen:

1. qRT-PCR (Illumina)

Peralatan untuk Analisis Data:

1. RT-PCR
2. Mikroskop
3. Staining Jar

4. *Coated Desk Glass*
5. *Cover Glass*
6. Laptop

4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari atas

1. *Umbilical cord*
2. NaCl 0,9%
3. PBS
4. DMEM
5. FBS
6. Fungizone
7. Penstrep
8. Alkohol 70%
9. PBS
10. Ketamin
11. Xylazine
12. Primer IL-1 β
13. Caspase 1



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

10. Kemudian sel dipanen (*passage*) untuk perbanyakkan, passage 1 konfluen kemudian disubkultur sampai dengan passage 4, condition medium dikoleksi setelah sel mencapai konfluensi 70% atau lebih.

4.5.3. Prosedur Isolasi Exosome

1. *Condition medium* yang sudah dikoleksi dari passage 4, kemudian di sentrifuge 300xg selama 5 menit untuk menghilangkan sel, selanjutnya di sentrifuge 2000xg selama 30 menit untuk menghilangkan debris.
2. Supernatant yang sudah di sentrifuge kemudian di filtrasi dengan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF) menggunakan *sterile hollow fiber polyether-sulfone membrane* 10, 50, 500 kD.
3. Exosome yang telah terisolasi pada ukuran 100-500 kda, kemudian dicairkan menggunakan larutan NaCl 0,9%.
4. Sediaan MSCs Exosome Hipoksia diukur menggunakan pH meter dan osmometer untuk mengetahui kondisi isohidris dan isotonis.

4.5.4. Proses Hipoksia

1. MSCs yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplet hingga 10 mL.

2. Flask yang telah berisi MSCs kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oksigen-meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indikator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. *Chamber* yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFF untuk mendapatkan MSCs Exosome Hipoksia.
7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500 µl *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).

4.5.5. Paparan UVB Subyek Percobaan

1. Tikus yang sudah diadaptasi selama 7 hari dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb).
2. Rambut pada bagian punggung tikus potong hingga bersih.

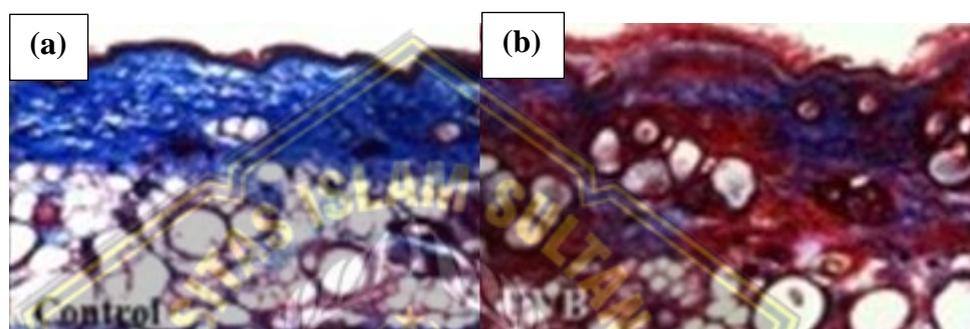
3. Punggung tikus dipapar dengan UV light (*broadband* dengan *peak emission* 302 nm) dengan *Minimal Erythema Dose* (MED) 160 mJ/cm²/hari 10 kali dalam 14 hari.
4. Tikus Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 kemudian diberi perlakuan menggunakan injeksi MSCs Exosome Hipoksia dengan dosis 200µL dan 300µL yang diberikan satu kali injeksi pada hari ke-15 dan diobservasi selama 14 hari (hingga hari ke 28).

4.5.6. Validasi Penurunan Kolagen

Validasi pengecatan kolagen dilakukan dengan menggunakan protokol pengecatan *Masson Trichome* dengan tahapan sebagai berikut:

1. Deparafinisasi slide jaringan
2. Panaskan Cairan Bouin ke 54-64°C
3. Inkubasi slide dalam *Bouin's Fluid* yang dipanaskan selama 60 menit dan dinginkan selama 10 menit
4. Bilas dengan air mengalir
5. Inkubasi slide di Hematigoksin Besi *Weigert* selama 5 menit
6. Bilas dengan air
7. Inkubasi slide dalam larutan *Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin* selama 15 menit
8. Bilas dengan air
9. Inkubasi dalam larutan asam fosfomolibdat / fosfotungstat selama 10-15 menit

10. Inkubasi slide dalam larutan *Aniline Blue* selama 5-10 menit
11. Bilas dengan air
12. Inkubasi slide dalam larutan asam asetat selama 3-5 menit
13. Dehidrasi slide kemudian pasang desk glass
14. Kolagen akan berwarna biru pada pengamatan menggunakan mikroskop.



Gambar 4.2. Pengecatan *Masson Trichrome* pada:
 (a) Tikus yang tidak di papar UVB, dan (b) Tikus yang di papar UVB selama 8 menit setiap sesi dan dipapar 10 kali dalam 14 hari

4.5.7. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Seluruh tikus dimatikan terlebih dahulu dengan cara servikal dislokasi sebelum jaringan diambil. Bagian kulit dibersihkan menggunakan alkohol 70%. Jaringan diambil menggunakan biopsi punch 6 mm di area punggung bagian tengah yang sudah dicukur dan dipapar UVB dengan cara dipotong secara fullthickness sebesar kurang lebih 10mg. Sampel jaringan dibagi menjadi dua untuk fiksasi dalam formalin 10% selama 24 jam dan dalam RNA later. Jaringan yang dimasukkan ke dalam formalin selama 24 jam kemudian disimpan pada tabung yang

berisi alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin. Sampel yang dimasukkan ke dalam RNA later kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* hingga proses analisis data.

4.5.8. Ekstraksi RNA dan Sintesis Cdna

1. Sampel kulit sebanyak 50mg kemudian dimasukan ke dalam tube berisi 1 μ L Trizol, kemudian dilakukan proses homogenisasi menggunakan ultrasonikator dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.
2. Sampel kemudian ditambahkan dengan 0.2 μ L kloroform dan diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu ruang.
3. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000xg selama 15 menit dengan suhu 4°C.
4. Sampel akan membentuk tiga lapis larutan, sisi bawah berwarna merah muda berisi protein, sisi tengah berwarna putih asap berisi DNA dan sisi atas berwarna bening berisi RNA (*aqueous phase*).
5. Pisahkan aqueous phase di sisi atas ke tube yang berbeda.
6. Sampel aqueous phase kemudian ditambahkan 0.5 μ L isopropanol, kemudian diresuspensi, diinkubasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000xg pada suhu 4°C selama 10 menit.

7. Supernatant kemudian dibuang dan pellet ditambahkan dengan 1 μ L 75% ethanol lalu diresuspensi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7500 x g di suhu 4°C selama 5 menit.
8. Supernatant kemudian dibuang dan pellet RNA ditambahkan dengan 50 μ L *Nuclease-Free Water* (NFW).
9. Konsentrasi sampel RNA kemudian dikuantifikasi menggunakan udrop *microplate reader*.
10. Sampel RNA sebanyak 0,1 μ g dalam 1 μ L kemudian ditambahkan 5 μ L NFW dan dilakukan proses denaturasi dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
11. Sampel RNA kemudian ditambahkan 2 μ L 4x DN Master Mix dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
12. Proses *reverse transcription* kemudian dilakukan dengan menambahkan 2 μ L 5x RT Master Mix dan diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit dan 98°C selama 5 menit menggunakan *thermal cycler*.
13. Sampel cDNA kemudian disimpan pada suhu -20°C

4.5.9. Pembacaan IL-1 β dan Caspase 1 dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR)

1. Ekspresi gen dari IL-1 β dan Caspase 1 dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR).

2. Campuran dari 1 μ L cDNA sampel, 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix sebanyak 10 μ L, forward primer 0,8 μ L, reverse primer 0,8 μ L dan NFW 7,4 μ L.
3. Primer IL-1 β yang digunakan adalah F: 5'-ACC TGA GGT GTC AGG ACC -3' dan R: 5'- CCG TCG AGC ATG AGC CAA-3'. Primer Caspase 1 yang digunakan adalah F: 5'- CCT TTG CTG GGC AAC CTG GA -3' dan R: 5'- GCC TTG CAC AAC CCT CCC TT -3'.
4. Proses qRT-PCR dilakukan menggunakan suhu 95°C selama 2 menit, 95°C selama 5 detik dan 56°C selama 20 detik sebanyak 50 siklus. Proses qRT-PCR dilakukan dengan menganalisis probe terhidrolisis pada panjang gelombang 520 nm.
5. Kuantifikasi data qRT-PCR dilakukan menggunakan *Software EcoStudy*.

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Semarang.

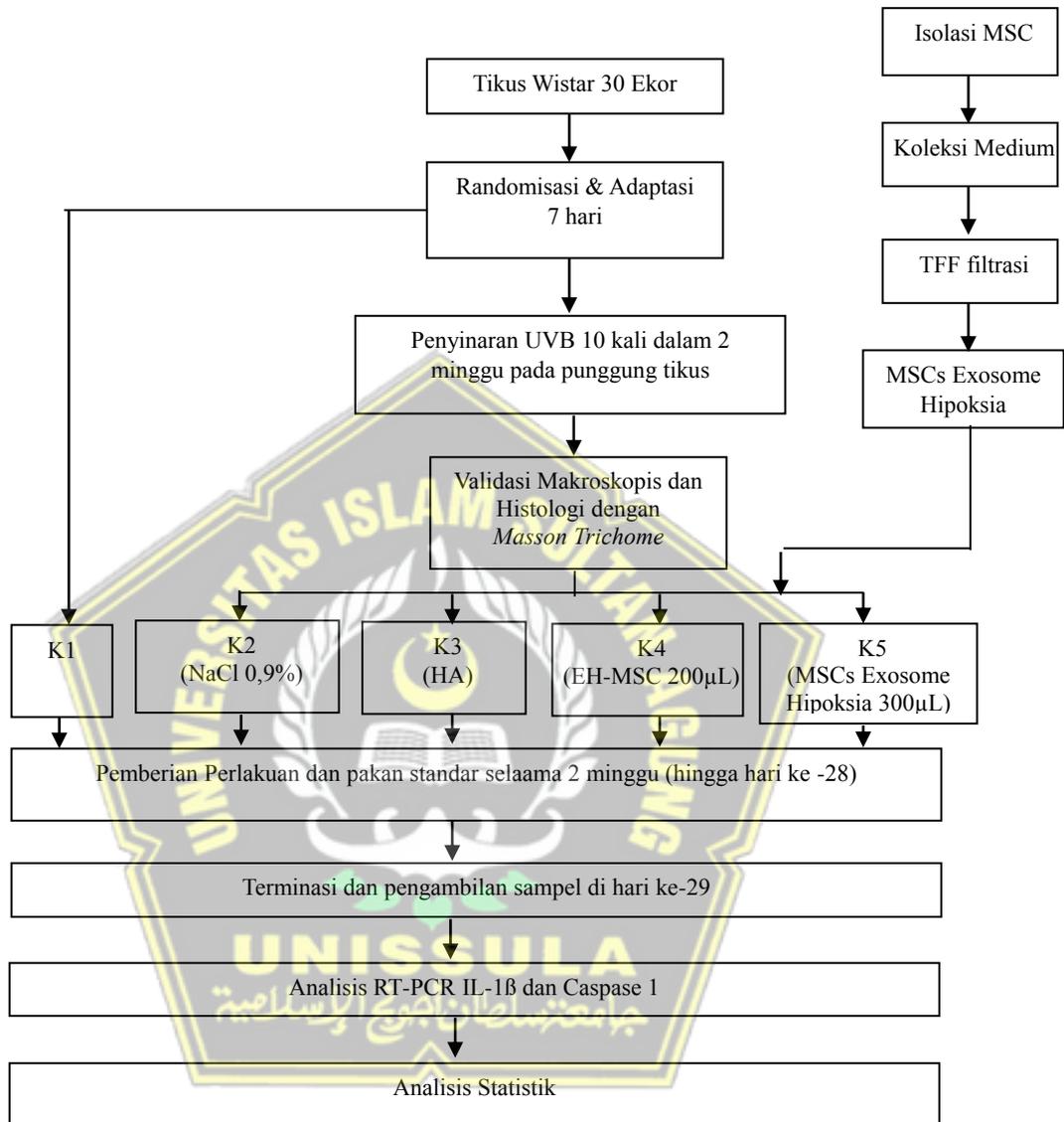
4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2024 – Agustus 2024.

4.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dilakukan uji deskriptif menggunakan skala data rasio. Analisis normalitas dan variasi data kemudian dilakukan menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test*. Uji ekspresi gen α -SMA diperoleh data normal ($P > 0,05$), namun tidak homogen ($P < 0,05$), maka dilakukan uji beda *One Way Anova*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,025$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Data densitas kolagen memiliki sebaran data tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok penelitian setelah uji *Kruskal Wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok penelitian. Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok penelitian. Pengolahan analisis data pada penelitian ini menggunakan aplikasi dekstop SPSS 26.0 for Windows.

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.3. Alur Penelitian

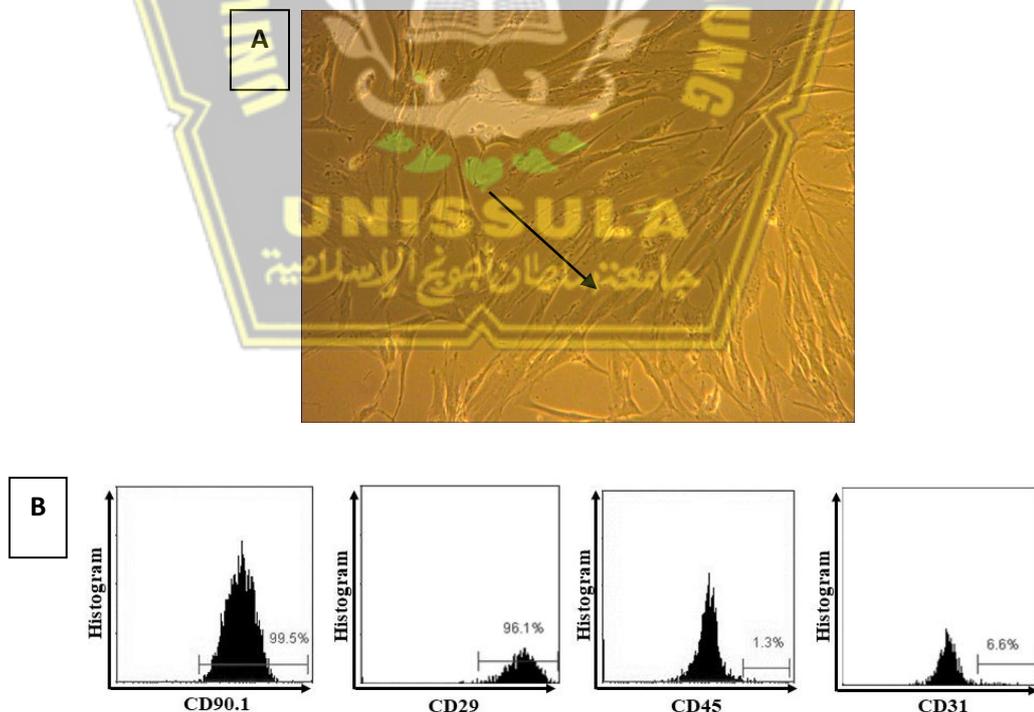
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

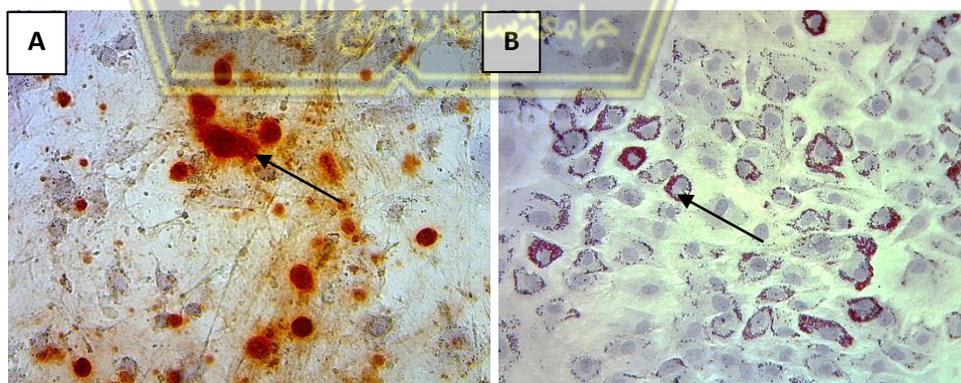
5.1.1. Hasil Validasi MSCs

Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell dan Cancer Research* (SCCR), Semarang, menggunakan tali pusat tikus bunting berusia 21 hari. Setelah isolasi, sel-sel tersebut dikultur dalam flask kultur menggunakan medium khusus. Pada passage ke-5, hasil kultur menunjukkan sel-sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi menyerupai *spindle* saat diamati menggunakan mikroskop. (Gambar 5.1A).



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.

Setelah isolasi dan kultur MSCs, marker sel divalidasi menggunakan analisis *flow cytometry* untuk mengevaluasi kemampuan MSCs dalam mengekspresikan surface marker spesifik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MSCs secara signifikan mengekspresikan CD90 (99,50%) dan CD29 (96,10%), dengan ekspresi minimal pada CD45 (1,30%) dan CD31 (6,60%), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.1B. Selain analisis marker, penelitian ini juga mengevaluasi potensi diferensiasi MSCs menjadi berbagai jenis sel matur, termasuk osteosit dan adiposit. MSCs dikultur dalam medium khusus untuk menginduksi diferensiasi, dan hasilnya menunjukkan bahwa MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, ditandai dengan adanya endapan kalsium yang divisualisasikan melalui pewarnaan *Alizarin red*, serta berdiferensiasi menjadi adiposit, yang diindikasikan oleh endapan lemak yang tampak merah setelah pewarnaan *oil red O* pada kultur 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).

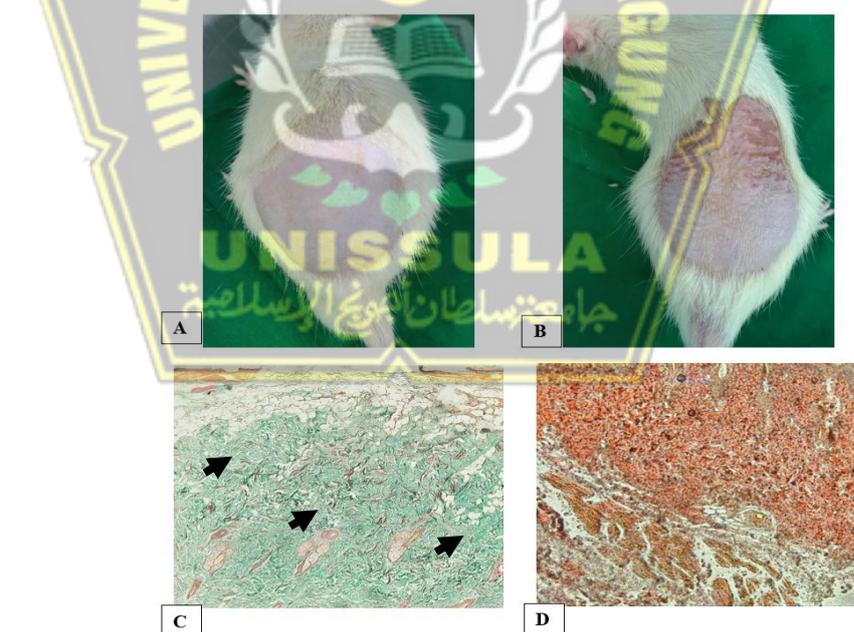
Sel MSCs selanjutnya diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi Oksigen sebesar 5% selama 24 jam menggunakan *hypoxia chamber* untuk menstimulasi produksi sekretom yang lebih tinggi, termasuk eksosom. Setelah masa inkubasi, medium kultur MSCs yang mengandung sekretom dikumpulkan dengan hati-hati. Medium ini kemudian difiltrasi menggunakan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF), sebuah teknik pemurnian yang efektif untuk memisahkan partikel berdasarkan ukuran molekul. Proses filtrasi dilakukan dengan menggunakan *molecular weight cut-off* yang spesifik, yang memungkinkan pemisahan molekul dengan ukuran antara 10 hingga 500 kDa. Hasil akhir dari filtrasi ini adalah konsentrat yang mengandung eksosom, yang dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut atau aplikasi terapi potensial.¹⁰⁻¹²

5.1.2. Hasil Validasi *Collagen Loss*

Validasi bahwa tikus mengalami *collagen loss* akibat paparan UVB dilakukan melalui pengamatan makroskopis, untuk memastikan validitas model hewan. Dalam penelitian ini, tikus Wistar dipaparkan sinar UVB dengan intensitas 160 mJ/cm² selama 8 menit per sesi, sebanyak 10 kali dalam 14 hari, pada jarak 20 cm. Pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa tikus yang terpapar UVB mengalami peningkatan signifikan dalam jumlah dan kedalaman kerutan dibandingkan dengan tikus yang tidak terpapar,

sebagaimana ditunjukkan dalam Gambar 5.3. Hal ini mengindikasikan bahwa paparan UVB berhasil menginduksi *collagen loss* pada tikus, menjadikannya model yang valid untuk studi lebih lanjut mengenai mekanisme kerusakan kolagen dan intervensi terapeutik.

Selain dilakukan secara makroskopis, validasi juga dilakukan secara mikroskopis menggunakan pengecatan *Masson Trichrome* untuk melihat densitas kolagen pada tikus yang dipapar UVB. Berdasarkan hasil pengecatan didapatkan bahwa terjadi penurunan densitas kolagen pasca paparan UVB seperti yang terlihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Validasi *Collagen Loss*. Kerutan terlihat lebih jelas pada tikus yang terpapar UVB (B) dibandingkan dengan yang tidak terpapar (A). Kolagen yang ditunjukkan dengan warna biru (panah hitam) lebih sedikit terlihat pada kelompok yang dipapar UVB (D), dibanding dengan kelompok tanpa paparan UVB (C)

Tikus yang tidak terpapar UVB digunakan sebagai kelompok kontrol sehat (K1). Tikus yang menunjukkan penurunan densitas kolagen setelah paparan UVB dikategorikan sebagai kelompok yang mengalami *collagen loss*, dan selanjutnya dibagi menjadi empat kelompok perlakuan. Kelompok K2 terdiri dari tikus yang terpapar UVB dan diberi injeksi NaCl 0,9% dengan dosis 300 μ L secara subkutan. Kelompok K3 terdiri dari tikus yang terpapar UVB dan menerima injeksi *Hyaluronic Acid* dengan dosis 200 μ L secara subkutan. Sedangkan, kelompok K4 dan K5 terdiri dari tikus yang terpapar UVB dan diberi injeksi MSCs Exosome Hipoksia masing-masing dengan dosis 200 μ L dan 300 μ L.

Pemberian injeksi MSCs Exosome Hipoksia dilakukan satu kali dan pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke 15 pasca injeksi MSCs Exosome Hipoksia. Jaringan kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan RIPA buffer dengan penambahan *protease inhibitor*.¹³ Setelah jaringan membentuk suspensi, kemudian dilakukan sentrifugasi dan supernatant dikumpulkan untuk analisis kadar TNF- α dan GPx menggunakan metode RT-PCR.¹⁴

5.1.3. Kadar IL-1 β

Berdasarkan analisis normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa ekspresi IL-1 β dan Caspase 1 data bersifat normal namun tidak homogen, sehingga dilakukan uji beda dengan *Anova* dan *Post*

Hoc Tamhane untuk mengetahui distribusi data per kelompok perlakuan. Hasil analisis ditampilkan dalam tabel 5.1.

Tabel 5.1. Data Hasil Analisis Kadar IL-1 β dan Caspase 1

Variabel	Kelompok					P
	K1	K2	K3	K4 (pg/mL)	K5	
	(pg/mL) Rerata \pm SD	(pg/mL) Rerata \pm SD	(pg/mL) Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	(pg/mL) Rerata \pm SD	
IL-1β	1,33	3,5	2,5	1,4	1,17	
Std. deviasi	0,18	0,21	0,37	0,17	0,06	
Shapiro Wilk						>0,05
Lavene test						0,03
One Way Anova						<0,001
Caspase1	1,02	2,11	1,73	1,31	1,17	
Std. deviasi	0,01	0,07	0,16	0,04	0,07	
Shapiro Wilk						>0,05
Lavene test						0,03
One Way Anova						<0,001

Data ekspresi IL-1 β menunjukkan bahwa kelompok K1 (kontrol sehat) memiliki nilai rata-rata $1,33 \pm 0,18$. Kelompok K2, yang terpapar UVB dan diberi injeksi NaCl 0,9%, menunjukkan peningkatan ekspresi IL-1 β yang paling tinggi, yaitu $3,55 \pm 0,21$. Kelompok K3, yang menerima injeksi *Hyaluronic Acid*, memiliki nilai ekspresi sebesar $2,55 \pm 0,37$. Kelompok K4, yang diobati dengan MSCs Exosome Hipoksia dosis $200\mu\text{L}$, menunjukkan nilai ekspresi sebesar $1,42 \pm 0,17$. Sementara itu, kelompok K5, yang menerima dosis MSCs Exosome Hipoksia $300\mu\text{L}$, memiliki nilai ekspresi IL-1 β yang terendah yaitu $1,17 \pm 0,06$.

Data ekspresi caspase-1 menunjukkan perbedaan signifikan di antara kelompok. Kelompok K1 memiliki nilai $1,02 \pm 0,01$, sebagai ekspresi basal. Kelompok K2 menunjukkan peningkatan signifikan

dengan nilai $2,11 \pm 0,07$, menunjukkan peningkatan inflamasi dan apoptosis akibat UVB. Kelompok K3 menunjukkan penurunan menjadi $1,72 \pm 0,16$, tetapi masih lebih tinggi dari kontrol. Kelompok K4 memiliki nilai $1,30 \pm 0,04$, mendekati kontrol, menunjukkan efek perlindungan yang baik. Kelompok K5 menunjukkan nilai terendah di antara kelompok perlakuan, yaitu $1,17 \pm 0,08$, mendekati kondisi normal.

Berdasarkan uji *Anova* yang bersifat signifikan, data *post hoc* IL-1 β dianalisis menggunakan uji *Post Hoc Tamhane*.

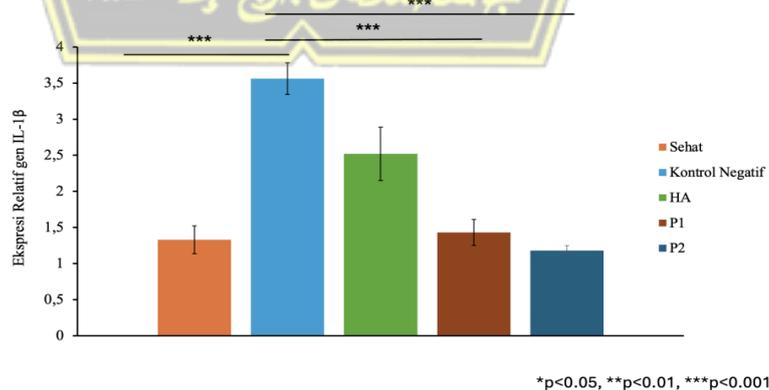
Tabel 5.2. Perbedaan rerata Ekspresi IL-1 β antar dua kelompok dengan Uji *Post Tamhane*

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	<0,001
	K3	0,001
	K4	<0,001
	K5	<0,001
	K3	0,011
K2	K3	0,011
	K4	<0,001
	K5	<0,001
K3	K4	0,012
	K5	0,004
K4	K5	0,004

Hasil uji *post Hoc Tamhane* menunjukkan perbedaan signifikan dalam ekspresi IL-1 β di antara kelompok-kelompok penelitian. Kelompok K2 (UVB + NaCl) menunjukkan peningkatan signifikan dalam ekspresi IL-1 β dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (K1) ($P < 0,001$), menunjukkan dampak negatif paparan UVB. Kelompok K3 (UVB + *Hyaluronic Acid*) juga

memiliki ekspresi IL-1 β yang lebih tinggi dari K1 ($P = 0,001$), meskipun lebih rendah daripada K2 ($P = 0,011$), mengindikasikan efek perlindungan moderat.

Kelompok K4 (UVB + MSCs Exosome Hipoksia dosis 200 μ L) dan K5 (UVB + MSCs Exosome Hipoksia dosis 300 μ L) menunjukkan penurunan signifikan dalam ekspresi IL-1 β dibandingkan dengan K2 ($P < 0,001$ untuk keduanya), menegaskan efektivitas MSCs Exosome Hipoksia dalam menekan inflamasi. Perbedaan antara K3 dengan K4 ($P = 0,012$) dan K3 dengan K5 ($P = 0,004$) menunjukkan bahwa MSCs Exosome Hipoksia lebih efektif daripada *Hyaluronic Acid*. Terakhir, peningkatan dosis MSCs Exosome Hipoksia dari 200 μ L (K4) ke 300 μ L (K5) menunjukkan pengurangan signifikan lebih lanjut dalam ekspresi IL-1 β ($P = 0,004$), menandakan bahwa dosis yang lebih tinggi memberikan manfaat antiinflamasi yang lebih kuat.



Gambar 5.4. Grafik Ekspresi Relatif IL-1 β pasca pemberian injeksi MSCs Exosome Hipoksia pada Tikus yang terpapar UVB

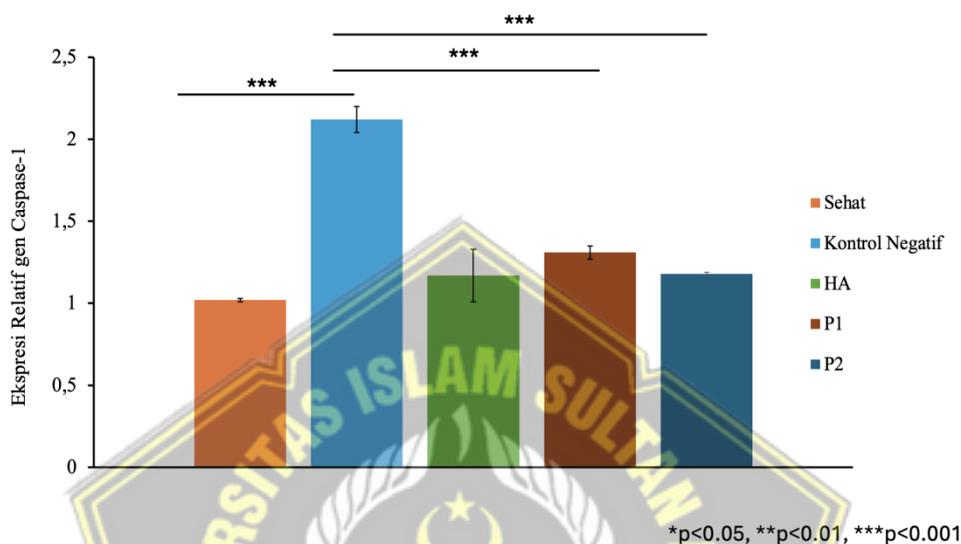
.Berdasarkan uji Anova yang bersifat signifikan, data *post hoc* ekspresi Caspase 1 dianalisis menggunakan uji *Post Hoc Tamhane*.

Tabel 5.3. Perbedaan rerata ekspresi Caspase 1 antar dua kelompok dengan Uji *Post Hoc Tamhane*

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
K1	K2	<0,001
	K3	0,001
	K4	<0,001
	K5	<0,001
K2	K3	0,011
	K4	<0,001
	K5	<0,001
K3	K4	0,012
	K5	0,004
K4	K5	0,004

Hasil uji *post hoc Tamhane* untuk ekspresi caspase-1 menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok-kelompok yang dibandingkan. Kelompok K2 menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan dengan kontrol sehat K1 ($P < 0,001$), menandakan peningkatan tajam dalam ekspresi Caspase 1 akibat paparan UVB. Kelompok K3 juga menunjukkan perbedaan signifikan dengan K1 ($P = 0,001$), meskipun ekspresi Caspase 1 di K3 lebih rendah dibandingkan K2. Kelompok K4 dan K5 juga berbeda signifikan dengan K1 ($P < 0,001$), tetapi nilainya lebih dekat ke kontrol sehat. Perbandingan antara K2 dan K3 ($P = 0,011$) menunjukkan bahwa *Hyaluronic Acid* secara signifikan menurunkan ekspresi Caspase 1 dibandingkan NaCl. Kelompok K4 menunjukkan penurunan yang lebih signifikan dibandingkan K2 ($P < 0,001$). Perbedaan signifikan

antara K3 dengan K4 ($P = 0,012$) dan K3 dengan K5 ($P = 0,004$) menunjukkan bahwa MSCs Exosome Hipoksia lebih efektif daripada *Hyaluronic Acid* dalam menurunkan ekspresi Caspase1.



Gambar 5.5. Grafik ekspresi relatif Caspase 1

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Paparan sinar UVB pada kulit menyebabkan berbagai kerusakan seluler yang memicu respons inflamasi dan degradasi kolagen, yang merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler di kulit. Salah satu indikator utama dari respons inflamasi ini adalah peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi IL-1 β , yang memicu peradangan dan mempercepat proses penuaan kulit. Dalam studi ini, perbandingan antara kelompok K4 dan K5, yang diberi MSCs Exosome Hipoksia dengan dosis masing-masing 200 μ L dan 300 μ L, menunjukkan penurunan IL-1 β dan Caspase 1 yang lebih signifikan dibandingkan dengan kelompok K2 (injeksi NaCl) dan K3 (injeksi *Hyaluronic Acid*) yang menunjukkan terapi menggunakan MSCs

Exosome Hipoksia lebih efektif dalam menangani kerusakan kulit akibat paparan UVB.

Eksosom yang dihasilkan oleh MSC, terutama ketika MSCs Exosome Hipoksia, memiliki kandungan faktor pertumbuhan, sitokin, dan molekul bioaktif lainnya yang lebih tinggi dibandingkan dengan MSCs yang dikultur dalam kondisi normoksia.¹⁷ Eksosom ini bertindak sebagai pembawa molekul-molekul ini ke sel target, yang kemudian dapat mengatur berbagai proses biologis, termasuk modulasi sistem imun dan perbaikan jaringan. Dalam konteks kulit yang mengalami *collagen loss* akibat paparan UVB, MSCs Exosome Hipoksia memiliki kemampuan untuk menekan aktivasi inflammasome, kompleks protein yang merespons sinyal bahaya dan kerusakan sel.¹⁸ Inflammasome ini berperan dalam aktivasi Caspase 1, yang pada gilirannya mengaktifkan IL-1 β dari bentuk prekursor inaktifnya, pro-IL-1 β .¹⁹

Penurunan Caspase 1 yang lebih signifikan pada kelompok K4 dan K5 dibandingkan K2 dan K3 menunjukkan bahwa MSCs Exosome Hipoksia tidak hanya menargetkan inflamasi secara langsung tetapi juga memodulasi jalur molekuler yang lebih hulu, seperti inflammasome dan Caspase 1. Penekanan pada Caspase 1 ini mengurangi produksi IL-1 β , sehingga mengurangi peradangan yang diinduksi oleh UVB. Penurunan IL-1 β pada K4 dan K5 menunjukkan bahwa MSCs Exosome Hipoksia bekerja secara efektif dalam menghambat jalur inflamasi yang diaktifkan oleh paparan

UVB, yang tidak hanya membantu mengurangi kerusakan jaringan tetapi juga mendukung proses regenerasi kulit.^{15,16}

Lebih lanjut, MSCs Exosome Hipoksia juga berperan penting dalam perbaikan jaringan kulit yang rusak akibat UVB.²⁰ Mereka mengandung berbagai faktor pertumbuhan seperti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*), dan HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) yang mempromosikan angiogenesis, regenerasi sel, dan perbaikan matriks ekstraseluler. Faktor-faktor ini membantu memperbaiki kerusakan kolagen dan mendukung proses regenerasi kulit, yang sangat penting untuk memulihkan integritas struktural kulit setelah paparan UVB.²¹ Eksosom juga berkontribusi dalam mengurangi respons inflamasi yang diperburuk oleh degradasi jaringan dengan memperbaiki kerusakan kolagen dan matriks ekstraseluler.^{7,22}

Kelompok K2 yang menerima injeksi NaCl tidak menunjukkan manfaat terapeutik yang signifikan karena NaCl tidak memiliki sifat antiinflamasi atau kemampuan untuk memperbaiki kerusakan sel. Oleh karena itu, ekspresi IL-1 β dan Caspase 1 tetap tinggi pada kelompok ini, mencerminkan peradangan yang berkelanjutan dan kerusakan jaringan. Kelompok K3, yang menerima injeksi *Hyaluronic Acid*, menunjukkan hasil yang lebih baik daripada K2, tetapi masih kurang efektif dibandingkan dengan K4 dan K5.²³

Dosis MSCs Exosome Hipoksia juga memainkan peran penting dalam efektivitas terapi. Pada kelompok K5, yang menerima dosis lebih tinggi

(300 μ L), penurunan IL-1 β dan Caspase 1 lebih signifikan dibandingkan dengan K4 (200 μ L), menunjukkan bahwa dosis yang lebih tinggi dari eksosom ini dapat memberikan jumlah molekul bioaktif yang lebih besar, yang pada gilirannya meningkatkan efek antiinflamasi dan reparatif. Ini menunjukkan adanya korelasi dosis-respons, di mana peningkatan dosis MSCs Exosome Hipoksia memberikan manfaat tambahan dalam menekan jalur inflamasi dan memperbaiki kerusakan kulit.²⁴

MSCs Exosome Hipoksia memiliki kandungan bioaktif yang berperan penting dalam mengatur respons inflamasi dan proses apoptosis. Kandungan-kandungan ini meliputi berbagai jenis microRNA (miRNA), sitokin anti-inflamasi, dan *growth factor* yang bersama-sama berkontribusi dalam menurunkan kadar interleukin-1 β (IL-1 β) dan Caspase 1, dua komponen utama yang terlibat dalam peradangan dan kematian sel yang dipicu oleh inflamasi. Berbeda dengan *Hyaluronic Acid* yang dikenal karena kemampuannya dalam menjaga kelembapan kulit dan sedikit membantu dalam memperbaiki jaringan, tetapi tidak memiliki efek langsung yang kuat dalam menghambat jalur inflamasi atau menurunkan ekspresi Caspase 1 dan IL-1 β . *Hyaluronic Acid* lebih berperan sebagai agen pelembap dan pelindung kulit daripada sebagai agen antiinflamasi atau reparatif yang menargetkan mekanisme molekuler yang mendalam.

MSCs Exosome Hipoksia mengandung miRNA seperti miR-21, miR-146a, dan miR-223, yang berperan dalam menghambat jalur inflamasi seperti NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B*

cells). NF- κ B adalah jalur utama yang mengatur produksi berbagai sitokin pro-inflamasi termasuk IL-1 β . MiRNA merupakan regulator penting dalam proses pasca-transkripsi yang dapat mengontrol ekspresi gen dengan mengikat mRNA target dan menghambat translasi atau memicu degradasinya. MiR-21 dan miR-146a dapat menekan aktivasi NF- κ B dengan menghambat molekul-molekul kunci seperti IRAK1 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) dan TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*), yang secara langsung mengurangi produksi IL-1 β . Penurunan IL-1 β ini secara langsung berdampak pada pengurangan aktivitas inflamasi yang merusak.

MiR-223, yang juga terdapat dalam MSCs Exosome Hipoksia, memainkan peran khusus dalam menurunkan Caspase 1. Caspase 1 adalah enzim yang bertanggung jawab untuk mengaktifkan IL-1 β dari bentuk prekursor yang inaktif menjadi bentuk aktif yang berfungsi dalam respon inflamasi. Dengan menurunkan ekspresi Caspase 1, miR-223 mengurangi aktivasi IL-1 β , sehingga mengurangi keseluruhan tingkat peradangan. Ini menunjukkan bahwa miRNA dalam MSCs Exosome Hipoksia tidak hanya menargetkan NF- κ B untuk menekan produksi IL-1 β tetapi juga mengintervensi langsung pada jalur inflamasi yang mengarah ke aktivasi IL-1 β melalui Caspase 1.

MSCs Exosome Hipoksia juga mengandung berbagai sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*). IL-10 adalah sitokin yang dikenal luas untuk sifat anti-inflamasi yang kuat, bekerja dengan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan mengurangi

ekspresi molekul yang terlibat dalam aktivasi sel-sel imun. IL-10 dalam eksosom MSC dapat berkontribusi secara langsung dalam menurunkan produksi IL-1 β , serta mencegah aktivasi jalur inflamasi NF-K κ B.

TGF- β , di sisi lain, tidak hanya memiliki sifat anti-inflamasi tetapi juga berperan dalam proses penyembuhan dan regenerasi jaringan. TGF- β dapat menghambat proliferasi sel-sel inflamasi dan merangsang produksi komponen-komponen matriks ekstraseluler yang penting untuk perbaikan jaringan.^{25,26} Dengan demikian, TGF- β tidak hanya membantu menurunkan inflamasi tetapi juga mempromosikan perbaikan jaringan yang rusak akibat inflamasi, memperkuat efek positif MSCs Exosome Hipoksia dalam mengatasi kerusakan jaringan yang disebabkan oleh peradangan berlebihan.²⁷

MSCs Exosome Hipoksia juga diperkaya dengan *growth factor* seperti VEGF, HGF, dan FGF. *Growth factor* ini berperan penting dalam memperbaiki dan meregenerasi jaringan yang rusak.²⁸ VEGF mempromosikan *angiogenesis*, yang penting untuk mendukung penyembuhan luka dan meningkatkan suplai darah ke area yang rusak, sementara HGF dan FGF berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel-sel fibroblas yang penting untuk pembentukan kolagen dan pemulihan struktur jaringan.²⁹

Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak melakukan pengukuran sepenuhnya tentang ekspresi gen protein dan *pathway* lainnya yang terlibat dalam ekspresi IL-1 β dan Caspase 1, sehingga dapat mengetahui

seungguhnya jalur MSCs Exosome Hipoksia dalam menekan IL-1 β dan Caspase 1 hingga tahap apoptosis pada tikus yang mengalami *collagen loss* akibat terpapar UVB. Berbagai jenis protein dan *pathway* yang terlibat dalam proses degradasi *collagen* sangat kompleks. Penelitian ini mungkin tidak sepenuhnya menjelaskan interaksi antara protein dan faktor lain yang mungkin terlibat. Studi lanjutan diperlukan untuk memetakan secara lebih rinci mekanisme molekuler yang mendasari.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1. Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh injeksi MSCs Exosome Hipoksia secara subkutan terhadap penurunan ekspresi IL-1 β dan Caspase 1 pada tikus jantan galur Wistar yang terpapar UV-B menunjukkan hal-hal berikut:

1. Terdapat perbedaan ekspresi IL-1 β pada kelompok K4 dan K5 yang terpapar sinar UVB dan diinjeksi MSCs Exosome Hipoksia secara subkutan dengan dosis 200 μ l dan 300 μ l dibandingkan dengan kelompok Kontrol Negatif.
2. Terdapat perbedaan ekspresi Caspase 1 pada kelompok K4 dan K5 yang terpapar sinar UVB dan diinjeksi MSCs Exosome Hipoksia secara subkutan dengan dosis 200 μ l dan 300 μ l dibandingkan dengan kelompok kontrol Negatif.

1.2. Saran

Studi yang akan datang diharapkan untuk mengukur ekspresi gen protein jalur terlibat dalam ekspresi IL-1 β dan Caspase 1 sehingga dapat mengetahui jalur MSCs Exosome Hipoksia dalam menekan IL-1 β dan Caspase 1 pada tikus yang mengalami *collagen loss* akibat terpapar UVB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anny Waloski Robert, Bruna Hilzendeger Marcon, Addeli Bez Batti Angulski, Sharon de Toledo Martins, Amanda Leitolis, Marco Augusto Stimamiglio, Alexandra Cristina Senegaglia, Alejandro Correa, Lysangela Ronalte Alves. Selective Loading and Variations in the miRNA Profile of Extracellular Vesicles from Endothelial-like Cells Cultivated under Normoxia and Hypoxia. *IJMS* 2022;23:10066
2. Arsinoe C. Thomaidou, Maria Goulielmaki, Antonis Tsintarakis, Panagiotis Zoumpourlis, Marialena Toya, Ioannis Christodoulou, Vassilis Zoumpourlis. miRNA-Guided Regulation of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Umbilical Cord: Paving the Way for Stem-Cell Based Regeneration and Therapy. *IJMS* 2023;24:9189
3. Baumann, L. Dan Wenkle, S.2007. Improving Elasticity: The Scine of Aging Skin. *Cosmetic Dermatology*. Vol 20, No:3 168-170.
4. Caiqi Shen, Changbo Tao, Aijun Zhang, Xueyang Li, Yanping Guo, Hanxiao Wei, Qichuan Yin, Qiang Li & Peisheng Jin (2022) Exosomal microRNA-93-3p secreted by bone marrow mesenchymal stem cells downregulates apoptotic peptidase activating factor 1 to promote wound healing, *Bioengineered*, 13:1, 27-37, DOI: 10.1080/21655979.2021.1997077
5. Cherng, J. Y., Chen, L. Y. & Shih, M. F. Preventive effects of β -thujaplicin against UVB-induced MMP-1 and MMP-3 mRNA expressions in skin fibroblasts. *Am. J. Chin. Med.* (2012) doi:10.1142/S0192415X12500309.
6. Chuchao Zhou, Boyu Zhang, Yanqing Yang, Qiong Jiang, Tianyu Li, Jun Gong, Hongbo Tang, Qi Zhang. Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing. *Stem Cell Res Ther* 2023;14.
7. Chircov, Cristina, Grumezescu, Alexandru Mihai, Bejenaru, Ludovic Everard. (2018) Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*.
8. Edye, Michelle E., Lopez-Castejon, Gloria, Allan, Stuart M. Brough, David. (2013) Acidosis drives damage-associated molecular pattern (DAMP)-

induced interleukin-1 secretion via a caspase-1-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry*.

9. Fan Y, Jeong JH, You GY, Park JU, Choi TH, Kim S. An experimental model design for photoaging. *J Craniofac Surg*. Published online 2015. doi:10.1097/SCS.0000000000001902
10. Griffiths CEM. The clinical identification and quantification of photodamage. In: *British Journal of Dermatology*. ; 1992. doi:10.1111/j.1365-2133.1992.tb16986.x
11. Jallad, K. N. Chemical characterization of sunscreens composition and its related potential adverse health effects. *Journal of Cosmetic Dermatology* (2017) doi:10.1111/jocd.12282.
12. Jia-Yi Ding, Min-Jiang Chen, Ling-Feng Wu, Gao-Feng Shu, Shi-Ji Fang, Zhao- Yu Li, Xu-Ran Chu, Xiao-Kun Li, Zhou-Guang Wang, Jian-Song Ji. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges. *Military Med Res* 2023;10
13. Jieun Kim, Eun Hee Kim, Hanbee Lee, Ji Hee Sung, Oh Young Bang, Clinical-Scale Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Therapy for Wound Healing, *International Journal of Molecular Sciences*, 10.3390/ijms24054273, 24, 5, (4273), (2023).
14. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. Published online 2015. doi:10.1016/j.arr.2015.01.001
15. Kim ES, Jeon HB, Lim H, Shin JH, Park SJ, Jo YK, *et al.* (2015) Conditioned Media from Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibits Melanogenesis by Promoting Proteasomal Degradation of MITF. *PLoS ONE* 10(5): e0128078. doi:10.1371/journal.pone.0128078
16. Kim SR, Zou X, Tang H, Puranik AS, Abumoawad AM, Zhu XY, Hickson LJ, Tchkonina T, Textor SC, Kirkland JL, Lerman LO. Increased cellular senescence in the murine and human stenotic kidney: Effect of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2021 Feb;236(2):1332-1344. doi: 10.1002/jcp.29940. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32657444; PMCID: PMC7900892.

17. Lai, Peilong, Weng, Jianyu, Guo, Liyan, Chen, Xiaomei, Du, Xin, (2019) Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. *Biomarker Research*.
18. Lee LY, Liu SX. Pathogenesis of Photoaging in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Dermatology Venereol* 2021.
19. Lian Bonnici, Sherif Suleiman, Pierre Schembri-Wismayer, Analisse Cassar. Targeting Signalling Pathways in Chronic Wound Healing. *IJMS* 2023;25:50
20. Lotfy, A., AboQuella, N.M. & Wang, H. Mesenchymal stromal/*Stem Cell* (MSCS)- derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther* 14, 66 (2023).
21. Mori K, Uchida T, Yoshie T, Mizote Y, Ishikawa F, Katsuyama M *et al.* A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. *FEBS J* 2019 doi:10.1111/febs.14671.
22. Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients*. Published online 2018. doi:10.3390/nu10040495
23. Oh M, Lee J, Kim YJ, Rhee WJ, Park JH. Exosomes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Ameliorate the Aging of Skin Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 9;19(6):1715. doi: 10.3390/ijms19061715. PMID: 29890746; PMCID: PMC6032439.
24. Pan, Hong, Lam, Ping Keun, Tong, See W., Leung, Kevin K., Teoh, Anthony Y., Ng, Enders K. (2019) Mesenchymal Stem Cells Combined with Tissue Fusion Technology Promoted Wound Healing in Porcine Bowel Anastomosis. *Stem Cells International*.
25. Poon F, Kang S, Chien AL. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2015. doi:10.1111/phpp.12145.
26. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. (2019) Hypoxia-preconditioned MSCs have superior effect in

- ameliorating renal function on acute renal failure animal model. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*.
27. Putra A, Ridwan F, Putridewi A, Kustiyah A, Wirastuti K, Sadyah N, Rosdiana I, Munir D. (2018) The role of tnf- α induced mscs on suppressive inflammation by increasing tgf- β and il-10. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*.
 28. Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol. Published online 2011. doi:10.1101/cshperspect.a004978
 29. Sadgrove NJ, Simmonds MSJ. Topical and nutri cosmetic products for healthy hair and dermal antiaging using “dual-acting” (2 for 1) plant-based peptides, hormones, and cannabinoids. FASEB BioAdvances. 2021. doi:10.1096/fba.2021-00022
 30. Saritani ATB, Wiraguna, Anak Agung Gde Putra, Maker LPII, 3. Litoria ternatea l. extract cream 5% inhibits the increase of mmp-1 levels and decrease of collagen amount in wistar rats (*rattus norvegicus*) dermic skin exposed to ultraviolet b. *Neurol Spinale Med Chir*. 2021;4:109-113.
 31. Schuster, Norbert, Krieglstein, Kerstin. (2002) Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell and Tissue Research*.
 32. Seol JE, Ahn SW, Seol B, *et al*. Echinochrome a protects against ultraviolet b-induced photoaging by lowering collagen degradation and inflammatory cell infiltration in hairless mice. Published online 2021.
 33. Shen Z, Sun J, Shao J, Xu J (2020) Ultraviolet B irradiation enhances the secretion of exosomes by human primary melanocytes and changes their exosomal miRNA profile. *PLoS ONE* 15(8): e0237023.
 34. Siahaan, Eva R, Pangkahila, Wimpie, Wiraguna, A A G P (2017) Krim ekstrak kulit delima merah (*Punica granatum*) menghambat peningkatan jumlah melanin sama efektifnya dengan krim hidrokuinon pada kulit marmut (*Cavia porcellus*) betina yang dipapar sinar UVB. *JURNAL BIOMEDIK (JBM)*.
 35. Sun M, Chen S, Adams SM, Florer JB, Liu H, Kao WWY, *et al*. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: Dysfunctional regulation of

- structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *Journal of Cell Science*. 2011;124(23):4096–105.
36. Chen, Li, Chen, Rui, Wang, Hua, Liang, Fengxia. (2015) Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*.
 37. Xiao Wu, Zhongyi Zeng, Kai Peng, Da Ren, Lei Zhang. Regulatory mechanism of DHRS2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes in prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Tissue and Cell* 2023;82:102078
 38. Xiaoning He, Zhiwei Dong, Yina Cao, Han Wang, Shiyu Liu, Li Liao, Yan Jin, Lin Yuan, Bei Li, "MSCS-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing", *Stem Cells International*, vol. 2019, Article ID 7132708, 16 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7132708>
 39. Xiu C, Zheng H, Jiang M, Li J, Zhou Y, Mu L, Liu W. MSCs-Derived miR-150- 5p-Expressing Exosomes Promote Skin Wound Healing by Activating PI3K/AKT Pathway through PTEN. *IJSC* 2022;15:359- 371. <https://doi.org/10.15283/ijsc21135>
 40. Yuzhen Xiao, Hexi Li, Junhui Zhang, Songyun Yang, Chunsen Zhang, Yizhou Huang, Xin Tang, Huiqi Xie. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: versatile nanomaterials for skin wound treatment. *Nano Res*. 2023
 41. Zasada M, Budzisz E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postep. Dermatologii i Alergol*. 2019. doi:10.5114/ada.2019.87443.
 42. Zabaglia, Luanna Munhoz, Sallas, Mayara Luciana, Santos, Mônica Pezenatto Dos, Orcini, Wilson Aparecido, Peruquetti, Rita Luiza, Constantino, Dulce Helena, Chen, Elizabeth, Smith, Marilia De Arruda Cardoso, Payão, Spencer Luiz Marques, Rasmussen, Lucas Trevizani. (2018) Expression of miRNA-146a, miRNA-155, IL-2, and TNF- α in inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection associated with cancer progression. *Annals of Human Genetics*.

43. Zhang B, Gong J, He L, Khan A, Xiong T, Shen H, Li Z. Exosomes based advancements for application in medical aesthetics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Dec 20;10:1083640. doi: 10.3389/fbioe.2022.1083640. PMID: 36605254; PMCID: PMC9810265.
44. Watson REB, Gibbs NK, Griffiths CEM, Sherratt MJ. Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antioxidants and Redox Signaling.* 2014.
45. Song L, Dong W, Gao M, Li J, Hu M, Guo N, *et al.* A novel role of IKK α in the mediation of UVB-induced G0/G1 cell cycle arrest response by suppressing Cyclin D1 expression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;
46. Naguib YW, Cui Z. *Nanomedicine : The Promise.* 2014; : 135–156.
47. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports* 2016; 2: 168–173.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.